



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE LA ACTIVIDAD DE  
NUCLEASA INDUCIDA POR LA MICOTOXINA FUMONISINA B1 (FB1) EN  
EMBRIONES DE MAÍZ DURANTE LA GERMINACIÓN

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:  
MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ

TUTOR: DR. F. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÁXICO, D.F. DICIEMBRE 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: Dra. Bertha González Pedrajo.

Vocal: Dra. Gladys Cassab López.

Vocal: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova.

Vocal: Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Secretaria: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño.

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), DGAPA-PAPIIT (IN220010) y de la Facultad de Química (PAIP 6290-08), así como la beca otorgada por CONACYT para los estudios de Doctorado (138459).

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

Sustentante: Lic. I.B.B. María Eugenia de la Torre Hernández

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A la Dra. Rocío Cruz Ortega y el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su valiosa participación en el comité tutorial y sus observaciones al proyecto que facilitaron que éste avanzara.

A las M.C. Mariana Rivas San Vicente y Nahieli Greaves Fernández, por su aportación en la publicación resultante.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, por sus observaciones, siempre acertadas, al trabajo y todo su apoyo.

A los Dres. Bertha González Pedrajo, Gladys Cassab López, Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Alejandro Zentella Dehesa y Martha Patricia Coello Coutiño por sus críticas y aportaciones al manuscrito final.

“Las simientes duermen en el secreto de la tierra hasta que una de ellas siente la fantasía de despertarse”

*El Principito*  
Antoine de Saint-Exupéry

## DEDICATORIAS

A Julieta, por ser la razón para mantenerme en pie... y caminando...

A mis papás (Ma. Eugenia y Felipe), por no dejarme caer, por ser siempre el apoyo que he necesitado para realizar mis sueños.

A Alejandro, mi hermano,... mi más duro crítico, mi mejor aliado, mi más grande apoyo...por darme motivos para seguir intentando.

A Luz María, por haberme abierto la puerta a una segunda oportunidad en la vida... por el tiempo y la complicidad...

A mi tía Lupita de la Torre, por su ejemplo de independencia y entereza, por estar siempre ahí allanándome el camino.

Al Dr. Javier Plasencia, con cuya guía, amistad e infinita paciencia he logrado realizar este proyecto de vida.

A mis compañeras de laboratorio: Andrea, Diana, Manuela y Mariana (en estricto orden alfabético), con quienes he compartido este largo trayecto académico y he tenido el honor y la dicha (a veces la tristeza) de compartir también aspectos de la vida personal que nos han marcado acercándonos y haciéndonos verdaderamente amigas. Gracias por el tiempo compartido, por su ayuda incondicional y por su cariño.

A Tere, Josune, Ireri e Iker, por ser una parte fundamental en cada aspecto y momento de mi vida...aunque no creo que existan las palabras exactas o suficientes para agradecer TODO lo que han hecho por mí.

A mi familia, en especial a mis tí@s Ana Rosa, Carlos, Carmela, Laura, Lucila y Martita; a mis abuelas Mary y Toña; a mis primos Ernesto, Gero y Rosana; a tod@s mis amig@s... los de antes, los de ahora, los que he ido haciendo en el camino, los que ya no están... los de siempre... muy especialmente a Adriana, Armida, Bety, Carmen Parra, Carmen Regueiro, Chelo, Doña Jose, Héctor, Leo, Lorna, Lucero, Mariana, Marina, Maru Reyes, Pepe, Rocío, Romina, Ruth, Sobeida, Víctor Chávez, Yemile... que con su ejemplo, su recuerdo, su solidaridad, su ayuda, su compañía y su cariño, son el estímulo que me impulsa para intentar ser una mejor versión de mí misma cada día.



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	4
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	5
<b>ABREVIATURAS</b>	6
<b>I. RESUMEN</b>	7
<b>II. ABSTRACT</b>	8
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	9
1. Estructura y germinación de la semilla de maíz.	9
2. Hongos patógenos del maíz.	13
2.1 <i>Fusarium verticillioides</i> , un patógeno ubicuo en maíz.	14
2.1.1 Proceso de infección del maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> .	14
2.2 Estructura y biosíntesis de las fumonisinas.	15
2.2.1 Blancos celulares y mecanismo de acción de la Fumonisina B1.	16
2.2.2 La Fumonisina B1 como factor de virulencia.	17
3. Estructura y función de los esfingolípidos.	18
3.1 Síntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos en plantas.	19
3.2 Actividad biológica en plantas.	21
3.2.1 En respuesta al estrés por sequía.	21
3.2.2 En la patogénesis.	21
3.2.3 En procesos de muerte celular programada (PCD).	22
4. Inmunidad innata en plantas.	23
4.1 Respuesta de hipersensibilidad.	25
4.1.1 Función del ácido salicílico en la respuesta de hipersensibilidad.	25
4.1.2 PAMPs derivados de patógenos que inducen la respuesta de hipersensibilidad.	28
4.2 Respuesta de defensa en la interacción del maíz con <i>F. verticillioides</i> .	29
5. Muerte celular programada (PCD) en plantas.	30
5.1 Moléculas participantes en la PCD.	31
5.1.1 Función de las metacaspasas en la PCD.	32
5.1.2 Proteasas vacuolares en la PCD.	33
5.1.3 Nucleasas en la PCD.	33
5.1.3.1 Función de las nucleasas en el desarrollo y respuesta a estrés.	35
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	37
<b>V. OBJETIVOS</b>	37
1. Objetivo general.	37
2. Objetivos particulares.	37
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	38
1. Material biológico.	38
1.1 Imbibición de semillas, embriones y/o ejes embrionarios.	38



## INDICE GENERAL

2. Medición de la pérdida de electrolitos para evaluar la muerte celular. ....	38
3. Extracción y análisis de DNA genómico. ....	39
4. Extracción y análisis de proteínas totales. ....	39
4.1 Geles de actividad de nucleasa. ....	40
4.2 Requerimiento de cationes de las nucleasas de maíz encontradas. ....	40
4.3 Geles bidimensionales de actividad. ....	41
5. Clonación del cDNA de ZmNUC1 y análisis de expresión génica. ....	41
6. Obtención y purificación de la proteína de fusión GST-ZmNUC. ....	41
7. Obtención y purificación del anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC. ....	43
7.1 <i>Western blots</i> . ....	44
7.1.1 Ensayos de competencia del anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC vs la proteína de fusión GST-ZmNUC. ....	45
7.2 Inmunoprecipitación. ....	46
<b>VII.RESULTADOS</b> .....	47
1. El tratamiento con FB1 provoca un incremento en la permeabilidad membranar en semillas de maíz. ....	47
2. El tratamiento con FB1 provoca degradación del DNA genómico en semillas de maíz y la inducción de la actividad de nucleasas. ....	47
3. La actividad de nucleasa se induce por el tratamiento con FB1, BCLs y SA. ....	48
4. Caracterización bioquímica de la nucleasa de maíz ZmNUC30. ....	50
4.1. Cálculo del punto isoeléctrico. ....	50
4.2. Uso de cationes divalentes como cofactores. ....	50
5. Clonación y análisis del cDNA de ZmNUC30. ....	52
6. La secuencia de cDNA AM710418 de GenBank codifica una nucleasa de la familia S1/P1. ....	54
7. El patrón de expresión de nucleasas de maíz se modifica en función del tiempo. ....	57
8. La nucleasa codificada por la secuencia AM710418 de GenBank es insoluble en extractos de <i>Escherichia coli</i> . ....	60
9. El anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC reconoce una proteína de aproximadamente 30 kDa en extractos proteicos totales de maíz y <i>Arabidopsis</i> .....	61
10. El anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC inmunoprecipita el doblete de actividad previamente identificado. ....	63





VIII. DISCUSIÓN	65
IX. CONCLUSIONES	78
X. PERSPECTIVAS	79
XI. BIBLIOGRAFÍA	80
XII. ANEXOS	92
<b>I. Técnicas de Biología Molecular.</b>	92
A. Extracción de RNA.	92
B. Obtención de cDNA por transcripción reversa (RT).	92
C. Amplificación del cDNA.	93
D. Clonación de fragmentos obtenidos por RT-PCR.	94
E. Preparación de la sonda radiactiva ZmNU.	95
F. <i>Northern blot</i> .	95
G. RT-PCRs semicuantitativos.	96
<b>II. Ensayo de competencia.</b>	98
<b>III. Actividad de RNAsa.</b>	99
<b>IV. Tabla de clasificación de nucleasas.</b>	102
<b>V. Tabla de valores de expresión de la nucleasa bifuncional de <i>Arabidopsis</i> (BFN1).</b>	103
<b>VI. ANEXO. VI. Estructura del gen de nucleasa de maíz GRMZM2G112968.</b>	104
<b>VII. Artículo.</b> de la Torre-Hernández, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernández, N., Cruz-Ortega, R., Plasencia, J. 2010. <i>FB1 induces nuclease activation and SA accumulation through LCB build-up in germinating maize. Physiological and Molecular Plant Pathology. 74: 337 - 345.</i>	105



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dibujo de la planta de maíz en sus diferentes partes. . . . .	9
<b>Figura 2.</b> Esquema de eventos celulares y metabólicos causados por acción de la toma de agua durante la germinación. . . . .	12
<b>Figura 3.</b> Estructura química de las fumonisinas del grupo B. . . . .	15
<b>Figura 4.</b> Comparación de las estructuras químicas de las SAMs y de las principales bases esfingoideas. . . . .	17
<b>Figura 5.</b> Biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos en plantas y mecanismo de acción de la FB1 como micotoxina análoga a la esfinganina (SAM). . . . .	20
<b>Figura 6.</b> Modelo <i>zig-zag</i> para ilustrar el sistema de inmunidad innata. . . . .	24
<b>Figura 7.</b> Localización y función de la muerte celular programada (PCD) en plantas. . . . .	31
<b>Figura 8.</b> Pérdida de electrolitos en radículas de semillas control y tratadas con FB1 10 $\mu$ M. . . . .	47
<b>Figura 9.</b> Análisis de la fragmentación del DNA genómico de maíz y las actividades de nucleasa presentes en extractos proteicos. . . . .	48
<b>Figura 10.</b> Actividad de nucleasa bajo diferentes tratamientos. . . . .	49
<b>Figura 11.</b> Gel bidimensional de actividad de nucleasa. . . . .	50
<b>Figura 12.</b> Geles de actividad de nucleasa en presencia de $\text{CaCl}_2$ 20 $\mu$ M, $\text{MgCl}_2$ 5 $\mu$ M y $\text{ZnCl}_2$ 20 $\mu$ M como cofactores. . . . .	51
<b>Figura 13.</b> Esquema de construcción de la secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1 a partir de fragmentos traslapados. . . . .	52
<b>Figura 14.</b> Secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1. . . . .	53
<b>Figura 15.</b> Producto de amplificación por RT-PCR obtenido a partir de RNA de semillas tratadas con FB1 durante 48 h. . . . .	54
<b>Figura 16.</b> Secuencia de aminoácidos de la proteína de maíz ZmNUC1. . . . .	55
<b>Figura 17.</b> Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de nucleasas vegetales reportadas, comparadas con la de ZmNUC1. . . . .	56
<b>Figura 18.</b> <i>Northern blot</i> de 20 $\mu$ g de RNA total de radículas de maíz control y tratadas con FB1 10 $\mu$ M durante 48 h. . . . .	58
<b>Figura 19.</b> <i>Northern blots</i> de 20 $\mu$ g de RNA total de radículas de maíz control y tratadas con PS 10 $\mu$ M, SN 10 $\mu$ M, FB1 10 $\mu$ M y SA 1 mM durante 24, 36 y 48 h. . . . .	59
<b>Figura 20.</b> RT-PCRs semicuantitativos del transcrito de nucleasa de maíz normalizados con ubiquitina. . . . .	59
<b>Figura 21.</b> Obtención de la proteína de fusión GST/NUC. . . . .	61
<b>Figura 22.</b> Ensayo de reconocimiento de la proteína de fusión GST/NUC con los anticuerpos anti-GST y anti-NUC. . . . .	62
<b>Figura 23.</b> Patrón de expresión de ZmNUC1 analizado por <i>Western blot</i> . . . . .	63
<b>Figura 24.</b> Inmunoprecipitación de nucleasas de maíz con el anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC, analizadas en geles de actividad. . . . .	64
<b>Figura 25.</b> Las nucleasas de maíz como parte de la señalización de la PCD inducida por FB1, BCLs y SA. . . . .	76
<b>Figura All.</b> Actividad de RNAsa de extractos proteicos totales de maíz. . . . .	98
<b>Figura Alll.</b> Ensayo de competencia de la proteína de fusión GST/NUC con las nucleasas relacionadas con la familia S1/P1 presentes en extractos proteicos de maíz. . . . .	100



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de inmunoprecipitación para la obtención del anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC. ....	<b>43</b>
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de identidad y similitud de la proteína ZmNUC1 respecto a otras nucleasas pertenecientes a la familia S1/P1 de hongos filamentosos y plantas. ....	<b>57</b>
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción para producir DNA por transcripción reversa. ....	<b>93</b>
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para RT-PCR. ....	<b>93</b>
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de los cebadores utilizados. ....	<b>94</b>
<b>Tabla 6.</b> Mezcla de reacción para ligaciones. ....	<b>94</b>
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para marcaje de la sonda radiactiva. ....	<b>95</b>
<b>Tabla 8.</b> Preparación de muestras de RNA para <i>Northern blot</i> . ....	<b>95</b>
<b>Tabla 9.</b> Mezcla de reacción para RT-PCRs semicuantitativos. ....	<b>97</b>



## ABREVIATURAS

<b>3-KSR</b>	3- cetoesfingina reductasa	<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>AAL</b>	Toxina producida por <i>Alternaria alternata</i>	<b>PB</b>	Cuerpo proteico
<b>ABA</b>	Ácido abscísico	<b>SAM</b>	Micotoxina análoga a la esfingina
<b>ACD</b>	Muerte celular acelerada	<b>SAR</b>	Respuesta sistémica adquirida
<b><math>\alpha</math>-ZmNUC</b>	Anticuerpo anti-ZmNUC	<b>SC</b>	Cloruro de sodio
<b>BCLs</b>	Bases esfingoides	<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>BFN1</b>	Nucleasa bifuncional de <i>Arabidopsis</i>	<b>PKS</b>	Poliquétido sintetasa
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>PR</b>	Proteína relacionada con patogénesis
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>PS</b>	Fitoesfingosina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>PTI</b>	Inmunidad desencadenada por patógenos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino-tetraacético	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>EGTA</b>	Ácido etilenglicól-tetraacético	<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>EPs</b>	Exopolisacáridos	<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno	<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
<b>ET</b>	Etileno	<b>SN</b>	Esfingina
<b>ETI</b>	Inmunidad desencadenada por efectores	<b>SPI</b>	Suero preinmune
<b>FB1</b>	Fumonisina B1	<b>SPT</b>	Serina palmitoiltransferasa
<b>GA</b>	Ácido giberélico	<b>TAE</b>	Tris/Acetato/EDTA
<b>GST/ZmNUC</b>	Glutación S-transferasa/nucleasa de maíz	<b>UBQ</b>	Ubiquitina
<b>C</b>		<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>HR</b>	Respuesta de hipersensibilidad	<b>VPEs</b>	Enzimas procesadoras vacuolares
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria 50	<b>ZmNU01</b>	Fragmento de cDNA (457 pb) utilizado como sonda
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque	<b>ZmNUC1</b>	Nucleasa de maíz deducida a partir de la secuencia de cDNA
<b>IRES</b>	Sitio interno de entrada al ribosoma	<b>ZmNUC30</b>	Nucleasa de maíz de 30 kDa
<b>JA</b>	Ácido jasmónico	<b>ZmNUC39</b>	Nucleasa de maíz de 39 kDa
<b>MAMP</b>	Patrones moleculares asociados a microbios		
<b>MAPK</b>	Cinasa activada por mitógeno		
<b>MeJA</b>	Metil jasmonato		
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato		
<b>NahG</b>	Hidroxilasa de SA		
<b>NPR1</b>	Nonexpresser of pathogenesis-related gene 1		



## I. RESUMEN.

*Fusarium verticillioides* es un hongo capaz de infectar varios órganos de la planta de maíz provocando pudrición, por lo que se le considera como el patógeno más importante de este cultivo en términos de su ubicuidad y por las pérdidas económicas que causa. Un factor de virulencia de este hongo es la fumonisina B1 (FB1), que es una “micotoxina análoga a esfinganina” (SAM) e inhibe la actividad enzimática de la esfinganina *N*-acil transferasa, provocando la acumulación de bases esfingoideas de cadena larga (BCLs), así como la disminución en los niveles intracelulares de ceramida y esfingolípidos complejos. Los esfingolípidos son componentes esenciales de las membranas que tienen importantes funciones estructurales y de señalización en procesos como la muerte celular programada (PCD) y la respuesta de defensa en plantas. Durante el proceso de muerte celular se activan múltiples hidrolasas como proteasas y nucleasas que sirven en la regulación y ejecución de este proceso. La degradación del DNA genómico es un evento central durante la muerte celular y ocurre por acción de distintas nucleasas.

Debido a que el maíz es el hospedero natural de *F. verticillioides* y en sus tejidos se acumula FB1, nuestra hipótesis fue que, en semillas de maíz, el incremento en los niveles intracelulares de BCLs ocasionado por el tratamiento con FB1, provocaría muerte celular e incremento en la actividad de nucleasa. Debido a que las BCL participan en la señalización durante la respuesta de defensa afectando la vía de señalización del ácido salicílico (SA), estudiamos si esta fitohormona participaba en la activación de las nucleasas.

En extractos proteicos de maíz se detectaron dos actividades de nucleasa, ZmNUC30 y ZmNUC39, que correlacionaron con una mayor pérdida de electrolitos así como degradación del DNA genómico, ambas, consideradas como marcadores de muerte celular. La actividad de ZmNUC30 se indujo por el tratamiento con FB1, BCLs y SA, además de presentar mayor actividad en presencia de  $Zn^{2+}$  y tener la capacidad de degradar tanto DNA como RNA. La mayor actividad de ZmNUC30 se observó a las 48 h, tiempo al que también ocurrió una mayor pérdida de electrolitos y degradación del DNA genómico. A partir de RNA total de maíz en germinación se aisló un cDNA que codificaría a una nucleasa de aproximadamente 30 kDa con características de la familia S1/P1. No se logró establecer ni por *Northern blot* ni por RT-PCR un patrón claro de activación transcripcional inducido por FB1, BCL o SA, por lo que también se estudiaron los niveles de proteína. Para esto se generó un anticuerpo que reaccionó con una proteína de aproximadamente 30 kDa en extractos proteicos de maíz en ensayos de *Western*, así se pudo determinar que los tratamientos con FB1, BCLs y SA provocaron un incremento, en promedio, de 135% en los niveles de esta proteína inmunoreactiva a las 48 h. Para establecer la identidad de la proteína inmunoreactiva, se hicieron experimentos de inmunoprecipitación analizados en geles de actividad en los que se detectaron dos bandas con actividad de DNAsa, cuyos pesos moleculares correlacionan con las actividades previamente descritas de 30 y 39 kDa. Estos resultados establecen que la FB1 provoca acumulación de BCLs, lo que activa alguna vía que conduce a muerte celular y en la que participa el SA, concluyendo con la activación de diversas hidrolasas, entre ellas la ZmNUC30 que participa en la última fase de degradación del DNA. A su vez, el SA podría contribuir en la regulación de la actividad de la nucleasa al modular el ambiente redox celular. De esta manera, la producción de FB1 favorece la muerte de los tejidos facilitando la colonización por un hongo necrófito.



## II. ABSTRACT.

*Fusarium verticillioides* is a fungal pathogen of maize capable of infecting various organs of the whole plant causing seed decay, damping-off and seedling blight, thus it is considered the most important pathogen of maize, in terms of its ubiquity and economic losses. Fumonisin B1 (FB1), a Sphinganine-Analog Mycotoxin (SAM), is a virulence factor produced by this fungus. This toxin inhibits sphinganine *N*-acyl-transferase activity thus it disrupts complex sphingolipid biosynthesis and causes free sphingoid long-chain bases (LCBs) build-up. Sphingolipids are essential components of cellular membranes and have important structural and signaling roles, specially during programmed cell death (PCD) and plant defense response events. During PCD, multiple hydrolases, such as proteases and nucleases, are activated and they participate in the regulation and execution of this process. The degradation of genomic DNA is a central event during cell death and occurs through the action of various nucleases.

Since maize is the natural host of *F. verticillioides* and FB1 accumulates in its tissues, our hypothesis was that, in maize seeds, the increase of LCBs intracellular levels induced by the FB1 treatment, causes cell death and increase in nuclease activity and because LCBs role as signal transducers during the plant defense response, we studied its association with the salicylic acid (SA) pathway.

We detected two nuclease activities, ZmNUC30 and ZmNUC39, in protein extracts from maize germinating seeds. ZmNUC30 activity was induced by FB1, LCBs and SA treatments and maximum activity was observed after 48h, that also coincided with maximal electrolyte leakage and genomic DNA degradation observed. ZmNUC30 required  $Zn^{2+}$  for full activity and was capable of degrading DNA as well as RNA. A cDNA coding for a 30kDa-nuclease was isolated from total RNA purified from germinating maize seeds. Sequence analysis placed this hydrolase within the S1/P1 nuclease family. Transcript levels of the ZmNUC30 gene were analyzed by Northern blot and RT-PCR but clearly transcriptional activation pattern could not be established in samples from FB1, LCBs or SA treatments. Recombinant protein from the cDNA was obtained in *Escherichia coli* and used to generate polyclonal antibodies. In Western blot, the antibodies detected a 30 kDa proteins in maize extracts that was induced up to 135%, with FB1, LCBs and SA treatments after 48 h. The antibodies immunoprecipitated two nuclease activities (30 and 39 kDa) that were detected in native gels. These results establish that FB1 causes accumulation of LCBs and triggers a cell-death pathway, probably mediated by SA that activates a nuclease. This way, FB1 production favors tissue death, facilitating colonization of the necrotrophic pathogen.



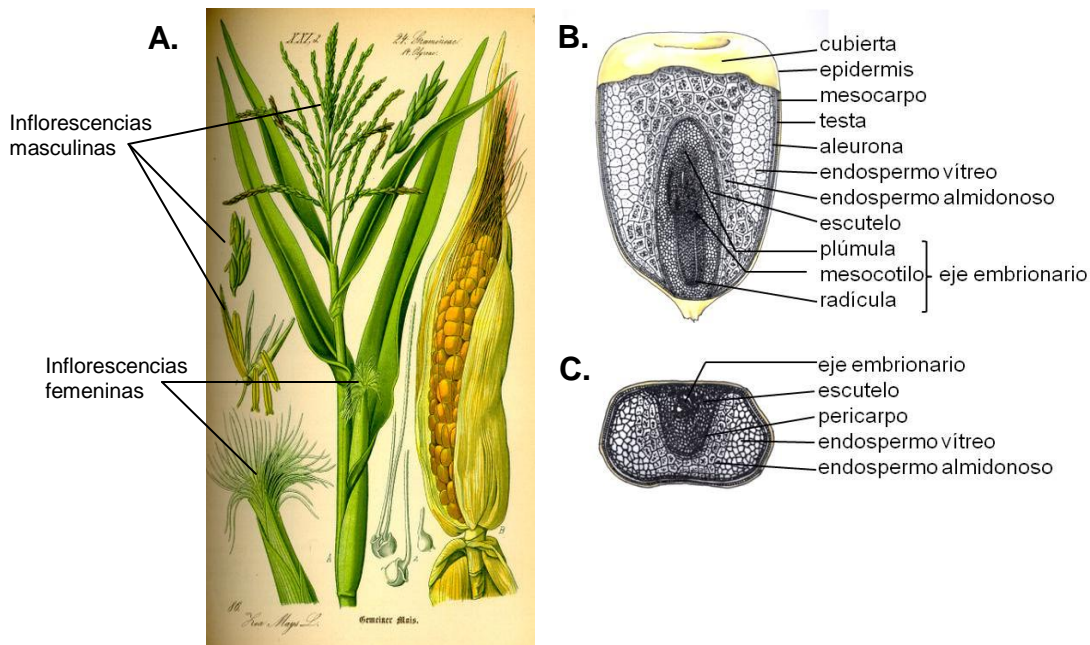
## III. INTRODUCCIÓN.

### 1. Estructura y germinación de la semilla de maíz.

El maíz (*Zea mays*) es una angiosperma monoica cuyas inflorescencias masculinas y femeninas están anatómicamente separadas en el mismo individuo (Fig. 1A). Es un cultivo anual, y dependiendo del genotipo y condiciones ambientales, la planta puede alcanzar hasta los 2.5 m de altura, con un tallo erguido, rígido y sólido.

Las hojas tienen una forma alargada y están enrolladas sobre el tallo del cual nacen las espigas que posteriormente darán origen a las mazorcas. Cada mazorca consiste en un olote que está cubierto por semillas dispuestas en filas.

Las semillas de maíz constan esencialmente de un **embrión**, el **escutelo** (estructura formada por el único cotiledón que posee) y una provisión de reservas nutricionales que se almacenan en el **endospermo**, que puede ser vítreo, caracterizado por un alto contenido de proteína, o almidonoso, en el que está enriquecido este polisacárido (Fig. 1B y 1C; Kiesselbach 1999). El eje embrionario del maíz está constituido por la *plúmula* que es un apéndice a partir del cual se desarrollarán las primeras hojas, el *mesocotilo* que es la zona de unión entre el eje embrionario, el escutelo y la *radícula* (Derek y Black 1994; Kiesselbach 1999).



**Figura 1.** **A.** Dibujo de las diferentes partes de la planta de maíz. Imagen tomada del sitio <http://www.biolib.de>, catalogada con el número 692, realizada por el Dr. O.W. Thomé en 1885. **B** y **C.** Dibujos esquemáticos de la semilla de maíz en el que señalan algunos de los componentes principales





## INTRODUCCIÓN

de la semilla. **B.** Corte longitudinal **C.** Corte transversal. Imagen realizada por el Mtro. Felipe de la Torre a partir de la imagen original de Kiesselbach, 1999.

La radícula está cubierta por la coleorriza y la plúmula por el coleoptilo (Fig. 1B y 1C), estas estructuras tienen la función de proteger a la plántula emergente (Derek y Black 1994). En la semilla de maíz madura, el endospermo es el principal tejido de almacenamiento de nutrientes, la mayoría de las células que lo conforman están muertas y su espacio citoplásmico ha sido reemplazado por reservas nutricionales que se sintetizaron durante el desarrollo de la semilla; en la parte exterior del endospermo se localiza una región de tejido vivo conocida como capa de aleurona (Fig. 1B y 1C), que tiene la función de secretar las enzimas hidrolíticas que facilitan la movilización de reservas en la semilla (Derek y Black 1994).

La *germinación* es la transición del embrión quiescente, que se ha desarrollado a partir del óvulo fertilizado, hacia un nuevo organismo fotosintéticamente activo, lo cual ocurre como resultado de la combinación de múltiples eventos celulares y metabólicos coordinados y que incluye la *dormancia*, que es la capacidad intrínseca que tienen las semillas para bloquear temporalmente la elongación de la radícula con el fin de optimizar el momento propicio para dar inicio a la germinación (Bewley 1997; Bove et al. 2001). En sentido estricto, la germinación comienza con la toma de agua por la semilla seca (imbibición) y culmina con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black 1994), por lo cual se requiere el debilitamiento del endospermo a través de la inducción de enzimas remodeladoras de la pared celular (CWRE; *Cell Wall Remodeling Enzymes*; Kucera et al. 2005) como son:  $\beta$ -1,3-glucanasas (Leubner-Metzger 2003), expansinas (Chen y Bradford 2000), endotransglucosilasas de xiloglucanos (Chen et al. 2002) metiltransferesas de pectina (Ren y Kermode 2000) y poligalacturonasas (Sitrit et al. 1999), entre otras. De esta manera, la protrusión de la radícula a través de la cubierta seminal, es el signo visible de que la germinación ha terminado (Bewley 1997; Bewley y Black 1994; Holdsworth et al. 2008).

Durante la imbibición de la semilla la toma de agua ocurre con un patrón trifásico (Fig. 2), con una toma inicial rápida (*fase 1*), seguida de una meseta (*fase 2*), presentando un incremento posterior en la toma de agua sólo en la fase de post-germinación (*fase 3*), conforme el eje embrionario se elonga (Bewley 1997; Bove et al. 2001).

El influjo de agua en las células de las semillas secas durante la fase 1 conduce a la perturbación estructural particularmente de las membranas, lo cual provoca la salida rápida e inmediata de solutos celulares y metabolitos de bajo peso molecular (Figura 2), evento





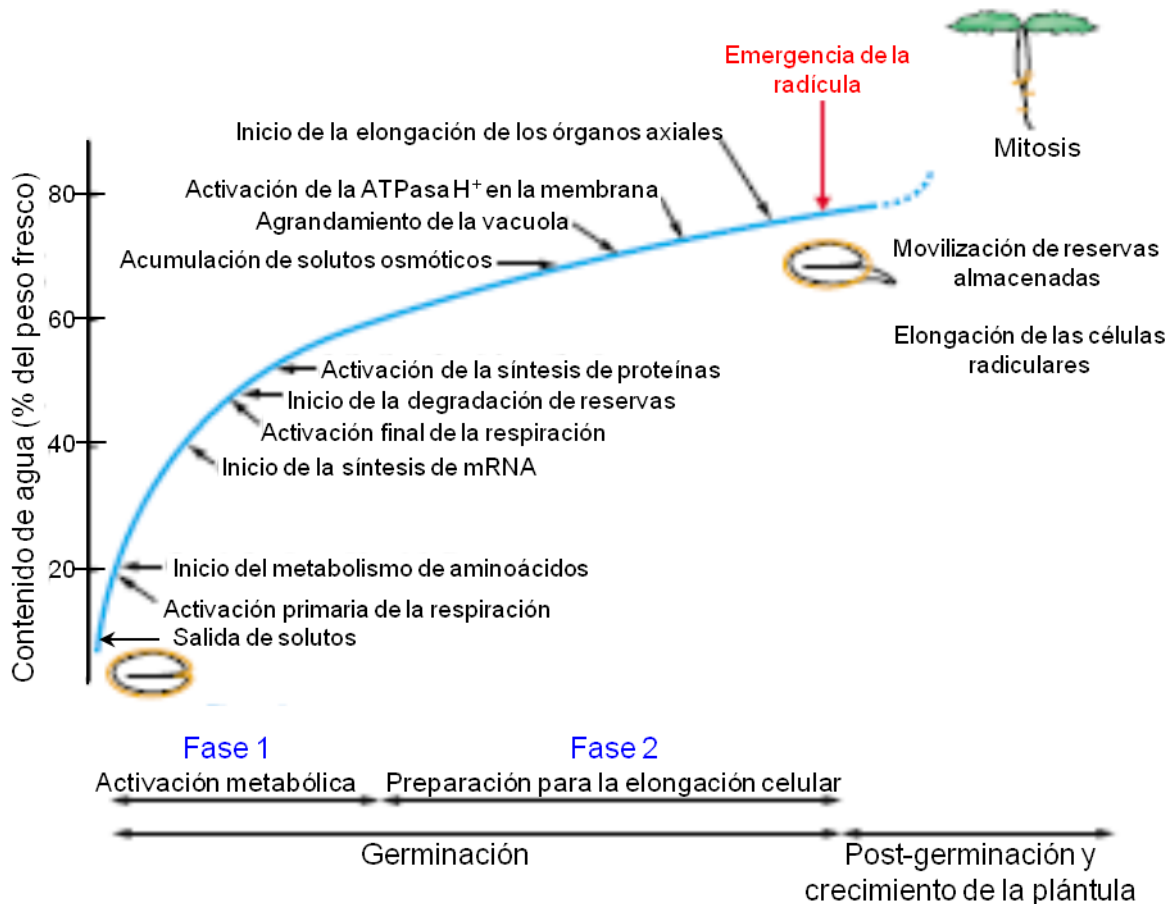
## INTRODUCCIÓN

sintomático de la transición que sufren los componentes fosfolipídicos de las membranas de una fase de gel a un estado hidratado de cristal líquido (Crowe y Crowe, 1992); tras un breve periodo de rehidratación las membranas regresan a su configuración más estable, en la cual ya no hay salida de solutos.

Después de la imbibición, la semilla quiescente reanuda rápidamente su actividad metabólica ya que las estructuras y enzimas necesarias para que esto ocurra están generalmente presentes en la semilla seca, habiendo subsistido durante la desecación que da fin a la maduración de la semilla (Bewley 1997). Uno de los primeros cambios observados posteriores a la imbibición es la reanudación de la actividad respiratoria (Figura 2), que se da con un brusco incremento inicial en el consumo de oxígeno que paulatinamente declina hasta que la radícula comienza a penetrar los tejidos circundantes, y es en este momento en el que ocurre una segunda activación de la actividad respiratoria (Bewley y Black 1994; Fig. 2). Las enzimas glicolíticas así como las de la fase oxidativa de la vía de las pentosas reanudan su actividad durante la fase 1, consecuentemente, las enzimas del ciclo de Krebs se activan (Salon et al. 1988) aunque en esta etapa existe una mayor producción de piruvato del que es utilizado, debido a la deficiencia interna de oxígeno provocada por la restricción en la difusión del oxígeno gaseoso a través de las densas estructuras de la semilla (Bewley 1997).

Todos los componentes necesarios para el restablecimiento de la síntesis de proteínas están presentes en las células de los embriones secos, aunque no hay presencia de polisomas; la síntesis inicial de proteínas depende de los ribosomas existentes, sin embargo, se van sintetizando y utilizando ribosomas nuevos para el ensamblaje de polisomas conforme progresa la germinación (Dommes y Van der Walle 1990). En los embriones secos también se pueden encontrar RNA mensajeros preexistentes y transcritos residuales del proceso de la embriogénesis (Comai y Harada 1990; Lane 1991), que son utilizados transitoriamente durante la etapa inicial, aunque los RNAm nuevos se transcriben conforme van siendo requeridos durante la germinación (Fig. 2).

La emergencia de la radícula es el evento terminal de la germinación, marca el comienzo del crecimiento de la plántula (Figura 2) y puede o no ir acompañada de división celular. Después de la imbibición, ocurren dos fases discretas de síntesis de DNA en las células de la radícula: la primera se lleva a cabo enseguida de la imbibición e involucra reparación del DNA dañado, así como la síntesis del DNA organelar; la segunda fase de síntesis está asociada a la división celular postgerminativa (Zlatnova et al. 1987; Bewley 1997).



**Figura 2.** Esquema de eventos celulares y metabólicos causados por acción de la toma de agua durante la germinación. En la fase conocida como imbibición física (*fase 1*), ocurre la activación paso a paso de las rutas metabólicas como resultado del incremento gradual en la hidratación de las semillas; cuando el nivel de hidratación excede el 60%, se reduce la velocidad de toma de agua (*fase 2*) y otros mecanismos fisiológicos preparan al eje embrionario para la expansión celular, culminando con el inicio de la emergencia de la radícula (*fase post-germinación*). Las flechas indican niveles particulares de hidratación que se pueden correlacionar con eventos metabólicos individuales. Modificado de Bove et al. 2001 y Bewley 1997.

Durante la germinación, la movilización de reservas no ocurre simultáneamente en todas las regiones, sino que las endo y exopeptidasas almacenadas en los cuerpos proteicos (*protein bodies*; PB), y que toleraron la desecación de los granos, degradan proteínas en zonas limitadas (Bewley y Black 1994; Müntz 1996; Müntz et al. 2001). Ejemplos de ellas son: las proteasas de cisteína similares a la papaína (CPRs) localizadas en cotiledones secos de pepino (Hara-Nishimura et al. 1982) y las legumaínas, una familia de CPRs cuyo sitio de corte es específico para el Asn en la posición 1 (Hara-Nishimura 1998), que están presentes en



vacuolas de almacenamiento de proteínas (*PSV*; *Protein Storage Vacuoles*) y se les clasificó como  $\beta$ VPEs por ser enzimas procesadoras vacuolares y tener esta localización específica, a diferencia de las  $\alpha$ - y  $\gamma$ -VPEs que se ubican en las vacuolas líticas de los órganos vegetativos (Hara-Nishimura et al. 1995). A esta misma familia pertenecen la proteinasa B de *Vicia sativa* L. (Becker et al. 1995) y la proteinasa similar a la legumánina de frijol rojo (LLP, *Legumain-Like Proteinase*; Senyuk et al. 1998), ambas participantes en el procesamiento de la globulina almacenada en los cotiledones de las plántulas después de la germinación (Müntz et al. 2001), así como una proteasa de aspártico localizada en los PB de las células de escutelo de semillas secas de cebada (Marttila et al. 1995). Las carboxipeptidasas son las únicas exopeptidasas encontradas en los cuerpos proteicos puesto que las aminopeptidasas están localizadas en el citoplasma de las células de los tejidos de almacenamiento (Shutov y Vaintraub, 1987).

Por tratarse de etapas con una elevada actividad metabólica, la germinación y el establecimiento de la plántula son momentos del desarrollo en los que las plantas, en este caso el maíz, son particularmente susceptibles a la infección por patógenos.

## 2. Hongos patógenos del maíz.

Durante su desarrollo, las plantas de maíz están expuestas al ataque de distintos microorganismos patógenos. Son de particular importancia los hongos que producen pudrición en las mazorcas, en los tallos y en otros órganos. Los hongos patógenos más importantes que causan pudrición de la mazorca son *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus* spp. (principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus* que producen aflatoxinas), *Nigrospora oryzae*, *Claviceps gigantea* (causa el cornezuelo o diente de caballo), *Macrophomina phaseolina* (provoca la pudrición carbonosa de la mazorca), *Bipolaris maydis* (causa del tizón foliar), *Ustilago maydis* y *Fusarium verticillioides* (White 2004). Este último, también es capaz de infectar raíz, tallo y granos, y es considerado el patógeno más importante de este cultivo en términos de su ubicuidad y por las pérdidas económicas que causa. Dado que está presente en las semillas, las plántulas provenientes de éstas tienen un crecimiento pobre, viéndose particularmente afectado el desarrollo de la raíz. Dado que el hongo se puede mover sistémicamente, tiene acceso al tallo, especialmente en los nudos, provocando que sean frágiles y fáciles de romper (White 2004). Este hongo produce enzimas con actividad lítica, así como toxinas que contribuyen al proceso de infección; dentro de las toxinas que produce están el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas. Éstas últimas son



metabolitos tóxicos producidos por la mayoría de las cepas y constituyen un factor de virulencia como se detallará más adelante.

### **2.1 *Fusarium verticillioides*, un patógeno ubicuo en maíz.**

*Fusarium verticillioides* es la forma asexual del género *Gibberella* que representa el ciclo sexual o forma perfecta de este ascomiceto. El estado asexual se caracteriza por la producción de macroconidas a partir de racimos denominados esporodocios y su abundancia varía entre las diferentes cepas. Además, *F. verticillioides* produce otras esporas asexuales en el micelio aéreo llamadas microconidias, que son unicelulares, abundantes y generalmente se agrupan en cadenas (Bakan et al. 2002; Leslie y Summerell 2006).

#### **2.1.1 Proceso de infección del maíz por *Fusarium verticillioides*.**

*F. verticillioides* es capaz de sobrevivir 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. Las conidias pueden ser depositadas en la superficie de las hojas por acción del viento, la lluvia o insectos y posteriormente penetran al tallo a través de los nodos, causando su pudrición (Nelson 1992). La infección sistémica inicia durante la germinación de la semilla, ya sea porque está infectada o porque esporas, conidias o fragmentos de micelio, que sobreviven en el suelo acceden a la semilla. El hongo invade los tejidos subterráneos de la planta ya que se localiza principalmente en las células del mesocotilo, y eventualmente accede al tallo, produciendo así una infección sistémica hasta la mazorca a través del tallo, para finalmente diseminarse en todos los granos que conforman la mazorca (Kedera et al. 1994; Munkvold et al. 1997; Oren et al. 2003). En ambos casos, el hongo está estratégicamente posicionado para colonizar la plántula durante la germinación y el establecimiento de la plántula y es capaz de desplazarse desde las semillas infectadas.

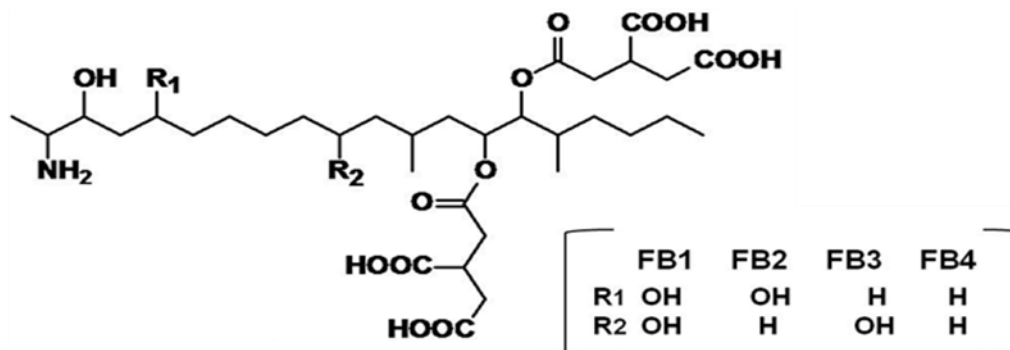
Además de la infección sistémica, este hongo puede infectar la mazorca a través del estigma, ya sea por heridas mecánicas en el tejido o, aún en ausencia de éstas, si las conidias son depositadas en el estigma, pueden acceder a las células del pericarpio penetrando a través de la parte inferior del canal estilar (Duncan y Howard, 2010). 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, así como las condiciones ambientales favorables para la infección (Desjardins et al. 1995; Kedera et al. 1994; Duncan y Howard, 2010).



## 2.2 Estructura y biosíntesis de las fumonisinas.

La producción de fumonisinas se ha asociado con la patogenicidad y virulencia del hongo en varios genotipos de maíz (Bacon et al. 1989; 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 en mayor cantidad (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 C2 y dos ácidos tricarbálicos esterificados en C14 y C15 (Figura 3). Las diferentes fumonisinas se caracterizan por los patrones de hidroxilación que presentan en C5 y C10. La FB1, FB2 y FB3 son las fumonisinas que se encuentran principalmente de manera natural en los tejidos infectados de maíz, siendo la FB1 la más abundante, ya que constituye alrededor del 75% del total de fumonisinas (Marín et al. 1995; Proctor et al. 2006).



**Figura 3.** Estructura química de las fumonisinas del grupo B.

La capacidad que tiene *F. verticillioides* de producir FB1 es una característica que puede variar entre cepas, puesto que algunas de ellas no la producen o lo hacen en niveles bajos (0.1 mg/g sustrato), mientras que otras cepas son capaces de producir niveles elevados (4 mg/g sustrato) (Desjardins et al. 1994; Nascimento et al. 2006; Sánchez-Rangel et al. 2005).

La biosíntesis y secreción de fumonisinas depende del locus *FUM*, ubicado en el cromosoma 1, y que abarca aproximadamente 46 kpb con 16 genes. Éstos codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de fumonisinas, así como de los transportadores que permiten su secreción (Picot et al. 2010). La biosíntesis de fumonisina se lleva a cabo por la acción de una poliquétido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1*, que incorpora grupos



acilo (Huffman et al. 2010). El grupo amino de la fumonisina proviene de *L*-alanina y lo incorpora una aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato, codificada por *FUM8*. Las actividades de monooxigenasas y de transportadores de ácidos tricarbóxicos son responsables de las modificaciones en C14 y C15 (Seo et al. 2001; Butchko et al. 2003).

### 2.2.1 Blancos celulares y mecanismo de acción de la Fumonisin B1.

En células vegetales, y en maíz en particular, se ha demostrado que la FB1 puede afectar directamente la actividad de tres actividades enzimáticas que son: la ATPasa de protones,  $\beta$ -1,3 glucanasas y la esfinganina *N*-acil transferasa.

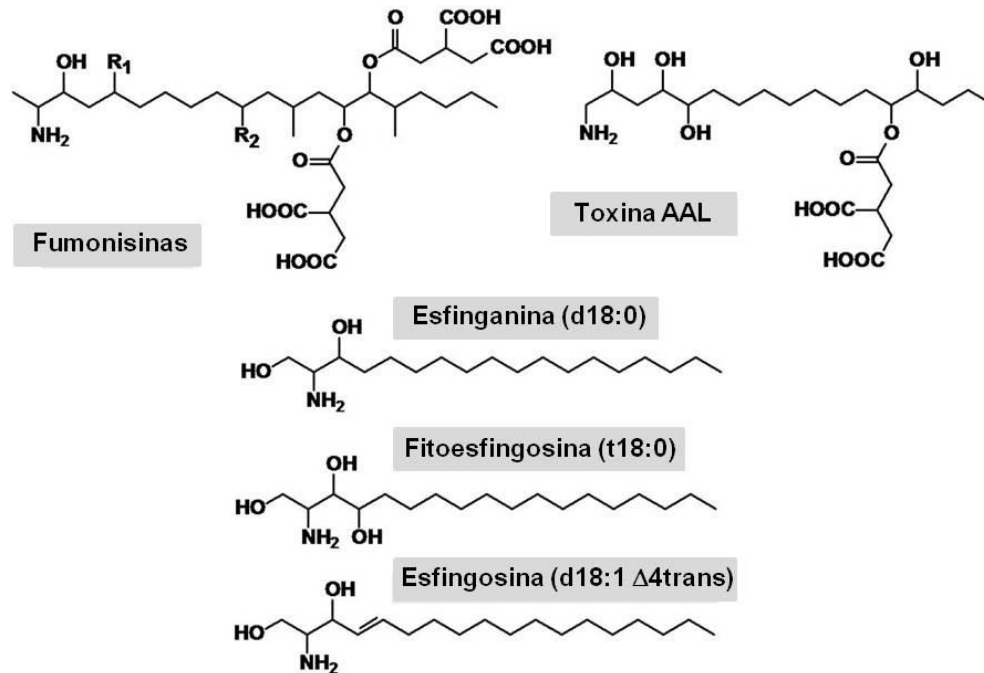
La FB1 inhibe a la ATPasa de protones de membrana plasmática de maíz de forma acompetitiva, con una  $K_i$  de 17.5  $\mu$ M (Gutiérrez-Nájera et al. 2005). Esta enzima, además de participar en la acidificación del medio que permite la elongación radicular, es un componente de algunas rutas de señalización en respuesta al ataque de patógenos. (Elmore y Coaker, 2011; Schaller y Oecking, 1999), por lo que su inhibición sería la responsable, al menos parcialmente, de la inhibición de la elongación radicular durante la infección (Gutiérrez-Nájera et al. 2005).

También, la FB1 modula la actividad de las  $\beta$ -1,3 glucanasas de maíz, enzimas involucradas en la respuesta de defensa en plantas, que hidrolizan la pared celular fúngica. La toxina tiene una función dual pues induce la actividad de una isoforma ácida pero suprime la actividad de las dos isoformas básicas, y la inhibición sugiere una interacción directa de la micotoxina con las enzimas. Experimentos hechos *in vitro*, con fracciones purificadas de las glucanasas básicas  $\beta$ -1,3, permitieron calcular una  $IC_{50}$  de 53  $\mu$ M (Sánchez-Rangel et al. 2012). La actividad inhibitoria de la FB1 sobre las glucanasas de maíz es un ejemplo de la relación antagónica existente entre la planta y el patógeno, en donde éste produce moléculas efectoras que suprimen la respuesta de defensa basal montada por la planta (Misas-Villamil y van der Hoorn, 2008; Sánchez-Rangel et al. 2012).

La esfinganina *N*-acil transferasa está localizada en el retículo endoplásmico y es responsable de catalizar la condensación de la esfinganina con un ácido graso para formar ceramida en la ruta de biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos (Wang et al. 1991). Debido a su similitud estructural con la esfinganina, la FB1 al igual que la toxina AAL de *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*, hongo patógeno del tomate- (Gilchrist 1997; Greengerg 1997), se catalogan como “micotoxinas análogas a esfinganina” (SAMs por sus siglas en inglés) (Fig. 4). Estas toxinas inhiben a la esfinganina *N*-acil transferasa, provocando la



acumulación de bases esfingoideas de cadena larga (BCL) y esto se ha demostrado en maíz y en otras especies vegetales (Abbas et al. 1994; Williams et al. 2007; de la Torre-Hernandez et al. 2010).



**Figura 4.** Comparación de las estructuras químicas de las SAMs y de las principales bases esfingoideas.

## 2.2.2 La Fumonisina B1 como factor de virulencia.

Ya que las fumonisinas son metabolitos secundarios, podría argumentarse que la FB1 se sintetiza en etapas tardías de la interacción planta-patógeno, en la etapa saprofítica de éste. Sin embargo, en estudios recientes se ha observado que la FB1 se produce *in planta* en etapas tempranas de la infección (Williams et al. 2006; Williams et al. 2007; Sánchez-Rangel et al. 2012), e incluso durante el estado endofítico de *F. verticillioides* (Bacon et al. 2001).

Se considera como factor de virulencia a una molécula producida por un patógeno y que le permite a éste incrementar su potencial para causar daño al hospedero, interfiriendo con funciones específicas de su metabolismo y facilitando así el proceso de colonización. Se ha debatido durante años si la FB1 deber ser o no considerada de esta forma. Sin embargo, la mayor evidencia que postula a la toxina como un factor de virulencia es que tiene efectos fitotóxicos en tejidos de maíz, la mayoría asociados con el mecanismo de acción de la FB1





que provoca el desbalance en los niveles intracelulares tanto de esfingolípidos complejos como de sus intermediarios.

En callos de maíz en cultivo, la FB1 en una concentración de 13  $\mu\text{M}$ , provoca una reducción del 50% (van Asch et al. 1992); e inhibe en 75% la elongación radicular en semillas de maíz durante la germinación (Doehlert et al. 1994). En plántulas de maíz, la adición de concentraciones crecientes de FB1 (0.1 a 100  $\mu\text{M}$ ), causa la reducción del 80% en la longitud de tallo y del 95% de las raíces (Lamprecht et al. 1994). Por otro lado, las plántulas regadas con una solución de FB1 23  $\mu\text{M}$ , presentan lesiones en las hojas y reducción del 23% en la longitud del tallo y del 59% en el peso total de las raíces (Williams et al. 2007).

La evidencia genética del papel de la FB1 en la virulencia y patogenicidad fue aportada por Glenn y cols. (2008) al transformar una cepa de *Fusarium musae*, aislado de plátano, que no produce FB1 y es incapaz de colonizar plantas de maíz; con una clona genómica que contiene el grupo de genes *FUM*. La cepa transformada produce FB1 y tiene capacidad de infectar plántulas de maíz reproduciendo todos los síntomas de la infección como retardo del crecimiento y lesiones necróticas.

La mayoría de los efectos fitotóxicos de la FB1 se han asociado con la acumulación de BCLs que sirven como mediadores en las respuestas celulares que conducen a procesos de muerte celular programada. En plántulas de maíz tratadas con FB1, las BCLs acumuladas se translocan desde las raíces hasta las hojas, a diferencia de lo que ocurre con la FB1 que permanece en las raíces. La esfinganina aumenta entre 50 y 150 veces y la fitoesfingosina entre 2 y 6 veces entre la primera y la tercera hoja (Zitomer et al. 2010).

En semillas de maíz germinadas en presencia de FB1 10  $\mu\text{M}$ , se induce la acumulación de ácido salicílico (SA) así como la acumulación de BCLs, particularmente esfinganina, cuyos niveles aumentan 6 veces en concordancia temporal con la máxima acumulación de SA. Así, *F. verticillioides*, durante la infección al maíz, al producir FB1 induce la acumulación de BCLs que, a su vez, activan la vía de SA, lo que conduce a un proceso de muerte celular que, finalmente, favorecerá la proliferación del patógeno necrótrofo (de la Torre-Hernandez et al. 2010).

### **3. Estructura y función de los esfingolípidos.**

Los esfingolípidos son moléculas anfifílicas que son constituyentes fundamentales de las membranas celulares y se ha estimado que componen más del 40% de los lípidos de la membrana plasmática (Sperling et al. 2005). Son esenciales para el mantenimiento de la



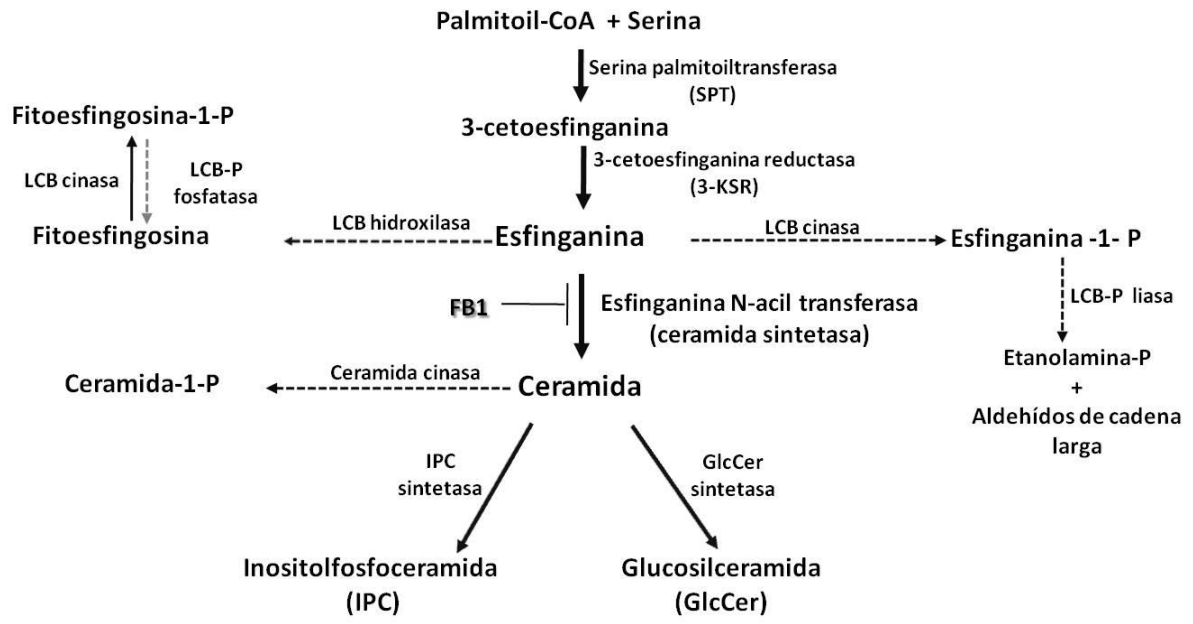


estructura de la célula así como para la progresión del ciclo celular, el reconocimiento entre una célula y otra, además de desempeñar un importante papel como segundos mensajeros (Berkey et al. 2012; Merrill et al. 2001; Riley et al. 2001; Saucedo-García et al. 2011a; Saucedo-García et al. 2011b).

La estructura básica de los esfingolípidos está constituida por una BCL (Fig. 4; Pruett et al. 2009), que es un aminoalcohol de cadena hidrocarbonada (2-amino-1,3-hidroxicano); el grupo amino en la posición C2 y el hidroxilo en C1 provienen de la serina, mientras que el hidroxilo en la posición C3, del palmitoil-CoA (Chen et al. 2009). Hay una gran diversidad estructural de BCLs puesto que pueden presentar insaturaciones entre las posiciones C4 y C5 así como entre las posiciones C8 y C9, además de que pueden estar o no hidroxiladas en la posición C4.

### **3.1 Síntesis *de novo* de esfingolípidos en plantas.**

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 (Chen et al. 2009), formando la 3-cetoesfinganina (Fig. 5). Esta reacción es catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT), perteneciente a la familia de las  $\alpha$ -oxoamino sintasas dependientes de piridoxal fosfato. La SPT está constituida por dos subunidades: LCB1 - esencial para estabilizar al heterodímero SPT- y LCB2 -donde se ubica el sitio catalítico- (Tamura et al. 2001; Gable et al. 2002). La 3-cetoesfinganina se reduce a esfinganina por acción de la enzima 3-cetoesfinganina reductasa (3-KSR) en una reacción dependiente de NADPH (Chen et al. 2009) (Fig. 5). La esfinganina generada se *N*-acila con un ácido graso activado por CoA, produciendo ceramida; esta reacción la cataliza la enzima esfinganina *N*-aciltransferasa, blanco celular de la FB1 (Fig. 5).



**Figura 5.** Biosíntesis *de novo* de esfingolípidos complejos en plantas y mecanismo de acción de la FB1 como micotoxina análoga a la esfinganina (SAM).

A la mayoría de las ceramidas producidas en células vegetales, se les incorpora un grupo polar, como glucosa o fosforil-inositol, en la posición C1, para dar origen a los esfingolípidos complejos (Fig. 5). La enzima glucosil ceramida sintetasa se localiza en retículo endoplásmico (Hillig et al. 2003) y utiliza UDP-glucosa como donador de glucosa en la formación de glucosilceramidas. La transferencia de un grupo fosforil-inositol a la posición C1 de la ceramida, genera inositolfosfoceramida en una reacción catalizada por la inositol fosforil ceramida sintasa, que se localiza en el aparato de Golgi (Bromley et al. 2003).

Los ácidos grasos que componen a las ceramidas pueden ir desde los 16 hasta los 26 átomos de carbono (VLCFAs, *very long-chain fatty acids*), lo que contribuye a la diversidad estructural que tiene la ceramida. Debido a que en *Arabidopsis* y otras especies hay más de una isoforma de *N*-acil transferasa, éstas podrían tener especificidad de sustrato, de manera que una de ellas podría unir BCLs dihidroxiladas con ácidos grasos de 16 carbonos de manera preferente, mientras que otras isoformas podrían favorecer la unión entre BCLs trihidroxiladas con ácidos grasos de cadena más larga (Chen et al. 2009).

Además, las BCLs pueden ser fosforiladas en la posición C1 por cinasas específicas (Mao et al. 1999; Fig. 5), para ser procesadas por una liasa, dando lugar a la formación de un aldehído de cadena larga, mismo que puede ser subsecuentemente transformado en un ácido



graso y etanolamina fosfato, un precursor de la fosfatidiletanolamina (Saba et al. 1997; Dickson y Lester, 1999a; 1999b; Dobrosotskaya et al. 2002)

### **3.2 Actividad biológica en plantas.**

Una serie de estudios recientes ha documentado que los esfingolípidos participan en procesos fisiológicos como estrés por sequía, patogénesis y muerte celular programada (PCD) en plantas.

#### **3.2.1 En respuesta al estrés por sequía.**

La esfingosina-1-fosfato participa en procesos de señalización en células guarda que conducen al cierre de los estomas ante una situación de estrés por sequía. En plantas de *Commelina communis* sometidas a estrés hídrico, ocurre un incremento en los niveles de esfingosina-1-P, efecto que se puede simular con la aplicación exógena de ésta (4 – 6  $\mu\text{M}$ ), induciendo el cierre estomatal. Se ha propuesto que el ácido absísico (ABA) estimula la producción del derivado fosforilado que, a su vez, induce un incremento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  así como una mayor salida de  $\text{K}^+$ , produciendo la pérdida de turgencia que conduce finalmente al cierre de los estomas. Se ha reportado que esta vía de señalización está mediada por proteínas G heterotriméricas puesto que las mutantes de *Arabidopsis thaliana* que carecen de la subunidad  $\alpha$  del heterotrímero son incapaces de responder al estímulo de la esfingosina-1-fosfato (Ng et al. 2001; Coursol et al. 2003).

#### **3.2.2 En la patogénesis.**

En plantas de arroz, la aplicación exógena de esfingolípidos complejos purificados del hongo *Magnaporthe grisea*, induce la producción de peróxido de hidrógeno, así como la expresión de genes PR y la síntesis de fitoalexinas (Umemura et al. 2000; Suharsono et al. 2002). Se ha sugerido que la presencia de un receptor capaz de reconocer al elicitador de naturaleza esfingoidea es capaz de transducir 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).

Los fenotipos mutantes de *A. thaliana* en los que se ha comprometido algún paso del metabolismo de los esfingolípidos, han mostrado que estas moléculas son señalizadores importantes durante la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos.



La mutante *acd11*, tiene un fenotipo de muerte celular acelerada que se caracteriza por la expresión constitutiva de genes PR, así como la producción de fitoalexinas y la deposición de callosa en las paredes celulares. El gen *ACD11* codifica una proteína transportadora de esfingosina, cuya actividad se ha observado *in vitro*, sugiriendo que la modificación en la distribución de las BCLs en los compartimentos celulares o en las membranas provoca alteraciones en los mecanismos de señalización asociados con la defensa de la planta (Brodersen et al. 2002).

Por su parte, la mutante *acd5*, presenta un desarrollo normal pero manifiesta un fenotipo de muerte celular exacerbada ante la infección con *Pseudomonas syringae*, mediada por ácido salicílico (SA) (Greenberg et al. 2000). El gen *ACD5* codifica una ceramida cinasa, sugiriendo que se requiere un balance entre los niveles de ceramida y su derivado fosforilado para activar o suprimir las señales de muerte celular (Liang et al. 2003).

### **3.2.3 En procesos de muerte celular programada (PCD).**

Se ha revelado la importancia que tienen los compuestos esfingoideos como mediadores de la muerte celular programada en plantas a través de su adición exógena en cultivos celulares y tejidos.

La adición de ceramida (50  $\mu\text{M}$ ) en cultivos celulares de *Arabidopsis* induce el incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que precede a la producción de especies reactivas de oxígeno y a la muerte celular (Townley et al. 2005). En plantas de *Arabidopsis* la aplicación exógena de esfinganina, fitoesfingosina y/o esfingosina en una concentración 2  $\mu\text{M}$ , provoca la producción de especies reactivas de oxígeno así como muerte celular (Shi et al. 2007).

Recientemente se demostró la participación de la esfinganina y de la proteína MPK6 (cinasa activada por mitógeno 6) como transductores de la misma ruta de señalización durante la respuesta de defensa en plántulas de *A. thaliana*, vía que conduce a un proceso de muerte celular programada inducida por el tratamiento con FB1 y que produce el incremento endógeno principalmente de esfinganina, aunque se pueden observar también incrementos importantes en las cantidades de fitoesfingosina y de los derivados fosforilados de ambas bases, sugiriendo que las bases dihidroxiladas podrían ser los mediadores primarios en la PCD mediada por BCLs (Saucedo-García et al. 2011a).



## 4. Inmunidad innata en plantas.

Los patógenos (hongos, oomicetos, bacterias y virus) tienen acceso a los tejidos mediante múltiples vías y mecanismos que van desde penetración directa de los tejidos, hasta el aprovechamiento de aperturas naturales (estomas o lenticelas), incluyendo heridas mecánicas. Debido a que las plantas son organismos sésiles han evolucionado una amplia capacidad de respuesta para enfrentar todo tipo de estrés, y en el caso de microorganismos patógenos, la eficiencia se basa en su reconocimiento (Ausubel 2005; Dangl y Jones 2001; Jones y Dangl 2006). A esta respuesta se le ha dado el nombre de **inmunidad innata** y se ha definido como la interacción establecida entre una planta y un patógeno, que limita a éste y previene la colonización de la planta.

La respuesta de inmunidad de las plantas puede ser dos tipos (Chisholm et al. 2006; Dangl y Jones 2001; Jones y Dangl 2006):

- basal (mediada por **Patrones Moleculares Asociados a Microbios o Patógenos: MAMPs o PAMPs**)
- específica (mediada por efectores)

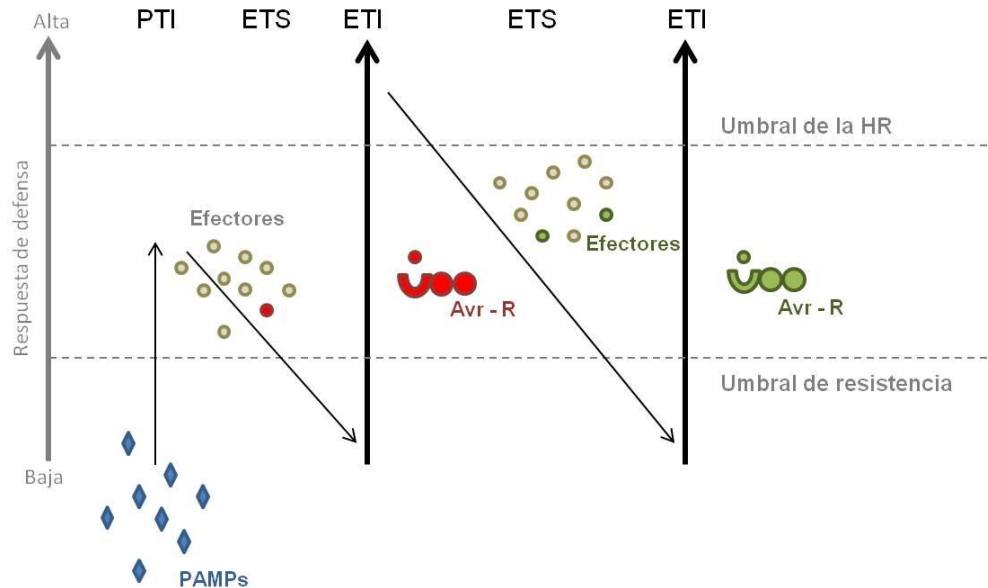
La respuesta basal mediada por PAMPs se activa en tiempos tempranos de la interacción planta-patógeno (entre 10 y 30 minutos después del contacto). Esta es la respuesta a la percepción de las moléculas elicitoras provenientes del patógeno y que tienen una amplia diversidad química pues pueden ser lipopolisacáridos, peptidoglicanos, glucanos, quitinas y proteínas. Estos son reconocidos por Receptores de Patrones de Recognición (PRRs) localizados en las membranas plasmáticas de las células del hospedero. (Ausubel 2005; Nurnberger et al. 2004; Zipfel et al. 2005).

Al ser percibido el patógeno en la superficie celular, se inicia el proceso que se conoce como **PTI (Pathogen-Triggered Immunity; Figura 6)**, y normalmente provoca el arresto de la infección antes de la colonización (Chisholm et al. 2006). Se activan cascadas de fosforilación y la producción de compuestos antimicrobianos, como las especies reactivas de oxígeno (EROs; Ausubel 2005), que inducen la resistencia basal temprana, diseñada para prevenir la progresión de la colonización. Durante la coevolución de esta interacción, algunos patógenos son capaces de producir moléculas que suprimen la PTI ya sea interfiriendo en el reconocimiento a nivel de la membrana plasmática o modificando las respuestas señalizadoras de resistencia o las manifestaciones de estas respuestas. Estas moléculas, denominadas efectores son eventualmente reconocidas por las células vegetales que han



## INTRODUCCIÓN

evolucionado esta inmunidad desencadenada por efectores (**ETI**, **Effector-Triggered Immunity**; Fig. 6). En esta “carrera” no resulta sorprendente que los patógenos hayan desarrollado a lo largo de la evolución efectores capaces de suprimir la ETI (Jones y Dangl 2006; Chisholm et al. 2006).



**Figura 6.** Modelo *zig-zag* para ilustrar el sistema de inmunidad innata. Inicialmente, las células vegetales detectan la presencia del patógeno a través del reconocimiento de PAMPs (rombos azules) por su interacción con los Receptores de Patrones de Reconocimiento (PRRs), desencadenando la inmunidad inducida por patógenos (PTI). Los patógenos evolucionan de tal manera que sintetizan y liberan efectores que interfieren con la PTI (círculos grises) a distintos niveles, provocando la susceptibilidad de las plantas ante la infección (ETS). Generalmente estos efectores son proteínas pero su naturaleza química es diversa en distintos patógenos. En la fase 3, algún efector (círculo rojo) es reconocido por una proteína R, estableciéndose la inmunidad activada por efectores (ETI). En la fase 4, algunos patógenos usan como estrategia la pérdida de efectores para evitar su reconocimiento por el hospedero y ganan otros (círculos verdes) que les ayudan a suprimir la ETI, produciendo susceptibilidad de la planta al patógeno, provocando un nuevo episodio de ETI. Modificada de Jones y Dangl 2006.

Tanto la PTI como la ETI, resultan en una respuesta caracterizada por la formación de una zona de células muertas alrededor del sitio de entrada del patógeno, lo que permite limitar la colonización, proliferación y diseminación del invasor (Greenberg y Yao 2004; Lam 2004; de Wit 2007), pero que pueden tener una cinética de inducción distinta, siendo más rápida, más intensa y más prolongada la respuesta en el caso de ETI. Esta reacción se conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR).



## **4.1 Respuesta de hipersensibilidad.**

La HR es un tipo de muerte celular programada (PCD) que tiene características morfológicas y/o bioquímicas compartidas con los procesos que canónicamente se han descrito en células de mamíferos y que son la apoptosis y la autofagia. Con la apoptosis comparte la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA en oligómeros de aproximadamente 180 pb y la pérdida del potencial mitocondrial de membrana (Lam et al. 2001; Greenberg y Yao 2004), mientras que con la autofagia, la formación de vesículas de doble membrana y la permeabilización o ruptura del tonoplasto (Greenberg 2005; van Doorn 2005). La principal diferencia entre estas dos formas de muerte celular es que en la autofagia, la célula que lleva a cabo el proceso se encarga de su propia y completa eliminación, mientras que en la apoptosis se requiere de la intervención de otras células que fagociten y eliminen los residuos celulares.

Una vez que se han activado las respuestas de defensa en el sitio de la infección, se desencadena una respuesta sistémica en partes distales del sitio inicial de entrada del patógeno para protegerse de invasiones subsecuentes; a esta resistencia de amplio espectro y larga duración se le conoce como respuesta sistémica adquirida (SAR; Durrant y Dong 2004). La SAR resulta altamente efectiva contra una gran variedad de patógenos biótros y necrótrofos, dependiendo de la fitohormona (o la combinación de ellas) implicada en la vía de señalización (de Wit 2007); sin embargo, se asocia con niveles incrementados de ácido salicílico tanto en el sitio de la infección como en tejidos distales (Mishina y Zeier 2007; Tsuda et al. 2008).

### **4.1.1 Función del ácido salicílico en la respuesta de hipersensibilidad.**

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona cuya función no está restringida a la respuesta a estrés biótico sino que regula muchos procesos fisiológicos durante el desarrollo, que incluyen la germinación de las semillas, el establecimiento de la plántula, el ciclo celular, la respiración, la fotosíntesis, la protección contra el estrés oxidativo, el cierre estomatal, la expresión de genes asociados con la senescencia, la respuesta al estrés abiótico, la termotolerancia basal, la nodulación, la floración y la producción de los frutos (Clarke et al. 2004; Klessig y Malamy, 1994; Mateo et al. 2004; Metwally et al. 2003; Morris et al. 2000; Norman et al. 2004; Rajou et al. 2006; Rate et al. 1999; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011; Stacey et al. 2006); aunque su efecto sobre algunos de estos procesos puede ser indirecto ya





## INTRODUCCIÓN

que el SA modifica la síntesis y/o la señalización mediada por otras hormonas como JA, ET y auxinas (Vlot et al. 2009).

Durante la HR el SA se acumula en células que están en contacto con el patógeno y se establece un gradiente hacia las células adyacentes que contribuye a la regulación de la muerte celular y a la promoción de la respuesta de defensa sistémica (Draper 1997) a través de la inducción de la expresión de genes de defensa, la interacción directa con algunas proteínas y/o la promoción de la interacción entre proteínas (Vlot et al. 2009). Se ha demostrado que el SA es esencial para la activación de la muerte celular a través de la sobreexpresión de la hidroxilasa de SA (*NahG*) ya que estas plantas muestran una reacción reducida y mayor susceptibilidad. Tal es el caso de las mutantes en *NPR1*, insensibles a SA, que muestran este fenotipo de HR suprimido (Lam 2004; Lorrain et al. 2003).

Asimismo, la sobreexpresión de las enzimas involucradas en el metabolismo de SA como la glicosil transferasa-1 de *Arabidopsis* (*AtSGT1*) o la metiltransferasa de arroz (*OsBSMT1*) en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, provoca la reducción en los niveles endógenos de SA, reducción en la expresión de PRs y un incremento en la susceptibilidad a patógenos (Koo et al. 2007; Song et al. 2008). En contraste, la sobreexpresión de genes bacterianos de la ruta biosintética de SA en plantas transgénicas de tabaco, produce niveles elevados de SA, expresión constitutiva de PRs y resistencia exacerbada (Verberne et al. 2000).

Aunque el papel que desempeña el SA como señal de defensa está bien establecido en dicotiledóneas, en monocotiledóneas aún no está del todo entendido. Se ha visto que SA y sus análogos sintéticos INA y BTH, inducen la expresión de PRs y/o resistencia en maíz (Morris et al. 1998), arroz (Hwang et al. 2008; Schweizer et al. 1999), cebada (Kogel et al. 1994; Muradow et al. 1993) y trigo (Anand et al. 2003; Görlach et al. 1996). En plantas de cebada resistentes a la infección por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, se incrementan los niveles endógenos de SA (Vallélian-Bindschedler et al. 1998), al ser inoculadas con la bacteria. Por otro lado, en plantas de arroz los niveles de SA no aumentan después de inocular con *P. syringae*, *Magnaporthe grisea* o *Rhizoctonia solani* (Silverman et al. 1995) y la expresión de PRs no se ve afectada en plantas transgénicas que expresan *nahG* y son, por consiguiente, deficientes en SA (Yang et al. 2004). En vista de que en condiciones naturales las plantas de arroz producen constitutivamente niveles elevados de SA, la señalización mediada por esta fitohormona debe ocurrir a través de la sensibilidad alterada a los componentes de la vía río abajo del SA, más que a los cambios en los niveles de la





fitohormona *per se* (Chen et al. 1997). Los resultados de estudios hechos en trigo, han llevado a postular que el SA podría mediar la respuesta de defensa en esa planta ya que existe una correlación positiva entre los niveles elevados de SA y la expresión constitutiva de PRs en mutantes de trigo que simulan lesiones (Anand et al. 2003), además de que la sobreexpresión de NPR1 (*Nonexpresser of Pathogenesis-Related genes-1*) de *Arabidopsis* en arroz, produce un incremento en la resistencia a *Fusarium graminearum* (Makandar et al. 2006). Todos estos resultados en conjunto, sugieren que SA es una señal de la respuesta de defensa en algunas monocotiledóneas y que varios de los componentes de la vía de señalización mediada por SA son análogos a los que se han caracterizado en dicotiledóneas.

Las especies reactivas de oxígeno aparentemente actúan en conjunto con el SA en un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la muerte celular programada en la reacción de hipersensibilidad. Se ha estudiado y caracterizado la función de NPR1 en varias especies vegetales, sin embargo, no es un receptor de SA puesto que no se une directamente a él (Fu et al. 2012), pero es capaz de regular su fosforilación, misma que permite a NPR1 reclutar a la ligasa E3 de culina-3 (CUL3) y, subsecuentemente, promover la degradación mediada por el proteasoma (Spoel et al. 2009). Recientemente se ha demostrado que NPR3 y NPR4, parálogos de NPR1, son proteínas adaptadoras de la ligasa E3 CLU3 que tiene como blanco celular a NPR1, para ser degradada de manera dependiente de la concentración de SA (Fu et al. 2012).

La señalización río abajo del SA es a través de NPR1 (Dong 2004; Durrant y Dong 2004; Pieterse y Van Loon 2004). Los oligómeros citosólicos de NPR1 se mantienen juntos a través de puentes disulfuro y se monomerizan en respuesta a los cambios en el estado redox de la célula producidos por SA, reduciéndose las cisteínas en las posiciones 82 y 216 por acción de la tiorredoxina H5 y/o la tiorredoxina H3 (Mou et al. 2003; Tada et al. 2008); una vez monomerizada, NPR1 se transloca del citosol al núcleo en donde activa la transcripción de genes de defensa (Mou et al. 2003). Tanto la monomerización como la re-oligomerización de NPR1 se requieren para completar los mecanismos de respuesta mediados por SA y proveen un vínculo entre el SA y la señalización mediada por EROs, puesto que la re-oligomerización de NPR1 está facilitada por la S-nitrosilación de la cisteína en la posición 156 (Tada et al. 2008).

El gen más estudiado de los que se inducen por SA en la fase tardía, es *PR-1*; su promotor contiene un elemento regulatorio negativo y al menos un elemento positivo, además de *AS-1* que es reconocido por los factores TGA (Lebel et al. 1998). Cuatro de los factores



TGA que interactúan con NPR1 regulan diferencialmente la expresión de PR-1 en *Arabidopsis* (Kesarwani et al. 2007), de los cuales, TGA3 aumenta la expresión de PR-1 inducida por SA (Kesarwani et al. 2007) y TGA2 actúa como represor transcripcional (Rochon et al. 2006).

Además de los elementos TGA, varios miembros de la familia de factores de transcripción WRKY regulan diferencialmente la señalización por SA (Eulgem 2005; Eulgem y Somssich 2007). Algunos de estos factores (como WRKY-7, -11, -17, -38 y -62), inducidos ya sea por SA o por la infección por patógenos, reprimen la respuesta de defensa mediada por SA (Eulgem y Somssich 2007; Kim et al. 2008).

### **4.1.2 PAMPs derivados de patógenos que inducen la respuesta de hipersensibilidad.**

Además de las proteínas efectoras secretadas por los patógenos, otras moléculas como las toxinas, moléculas con actividad hormonal y exopolisacáridos (EPS), son producidos por fitopatógenos como factores de virulencia. Las toxinas bacterianas como la coronatina, la syringomicina, la syringopeptina, la tabtoxina y la faseolotoxina (Bender et al. 1999) tienen diversos mecanismos de acción, incluyendo la simulación de hormonas vegetales, la formación de poros en las membranas de los hospederos o la inhibición de enzimas metabólicas que provoquen necrosis o clorosis (Abramovitch et al. 2006). Las bacterias patogénicas de las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución factores de virulencia que causan la reapertura de los estomas como un mecanismo de patogénesis (Melotto et al. 2006).

Los hongos fitopatógenos producen metabolitos secundarios de bajo peso molecular que participan activamente en el proceso de infección de la planta (Möbius y Hertweck 2009) y funcionan como factores de virulencia para promover la enfermedad; ensayos *in vitro* con estas fitotoxinas, han mostrado que reproducen la mayoría de los síntomas de enfermedad que causa el hongo durante la infección en condiciones naturales (Oliver y Solomon 2008).

Los mecanismos de acción de las toxinas para causar enfermedad en las plantas son muy diversos, entre ellos destacan la alteración de la expresión génica y/o de la integridad de las membranas, así como la inhibición de la actividad de enzimas que sintetizan metabolitos indispensables para la planta (Möbius y Hertweck 2009). En algunas interacciones planta-patógeno, la muerte celular programada (PCD) juega un papel importante en la promoción del crecimiento de los patógenos que secretan toxinas capaces de matar rápidamente a las células hospederas, tal es el caso de la toxina AAL, secretada por *Alternaria alternata*, y de la Fumonisina B1, producida por *Fusarium verticillioides*, que son micotoxinas análogas a la



esfinganina (SAMs; Fig. 4) e inducen muerte celular en sus hospederos al inhibir competitivamente la actividad de esfinganina N-aciltransferasa o ceramida sintasa, enzima clave en la biosíntesis de esfingolípidos (Abbas et al. 1994).

#### 4.2. Respuesta de defensa en la interacción maíz *F. verticillioides*.

La alta incidencia de infección por *F. verticillioides* durante la germinación del maíz se explica por la presencia del hongo en las semillas y su capacidad de sobrevivir como saprófito en el suelo, lo que compromete el óptimo establecimiento de la plántula. La respuesta del hospedero se ha estudiado principalmente durante las etapas de germinación y establecimiento de la plántula.

A las 48 h de germinación, en semillas de maíz inoculadas con una suspensión de esporas de *F. verticillioides*, ocurre un aumento en los niveles del transcrito de una proteína relacionada a la patogénesis (PR) localizada principalmente en el escutelo (Casacuberta et al. 1991; Casacuberta et al. 1992). De igual forma, a las 20 h de germinación, en semillas de maíz inoculadas con 50,000 esporas de *F. verticillioides*, se acumula una PR en la capa de aleurona y en el escutelo, además de presentarse una abundante deposición de callosa en la pared celular (Murillo et al. 1999).

En los primeros minutos de la infección de embriones de maíz con *F. verticillioides*, se activa la transcripción de una cinasa membranal dependiente de  $Ca^{2+}$  (*ZmCPK10*), alcanzando un máximo a los 30 min después del tratamiento y este aumento coincide con el incremento en la acumulación de transcritos de otras PRs sugiriendo que esta proteína participa en la cascada de transducción de señales desencadenada por el reconocimiento del patógeno a nivel de la membrana celular (Murillo et al. 1997; 2001).

A través de estudios de proteómica en embriones de maíz infectados por *F. verticillioides* durante la germinación se observó la inducción de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa Cu/Zn, glutatión S-transferasa y catalasa), de proteínas involucradas en el inicio de la síntesis de proteínas, así como aquéllas que participan en el plegamiento y/o estabilización como otras proteínas (HSPs, *proteínas de choque térmico*; Campo et al. 2004).

La infección de este hongo también induce a las proteínas PR,  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas aunque estas dos últimas enzimas también se expresan constitutivamente (Campo et al. 2004). La actividad de una isoforma ácida de  $\beta$ -1,3 glucanasa de maíz se induce *in vitro* por acción de la micotoxina FB1, a la vez que suprime la actividad de las dos isoformas



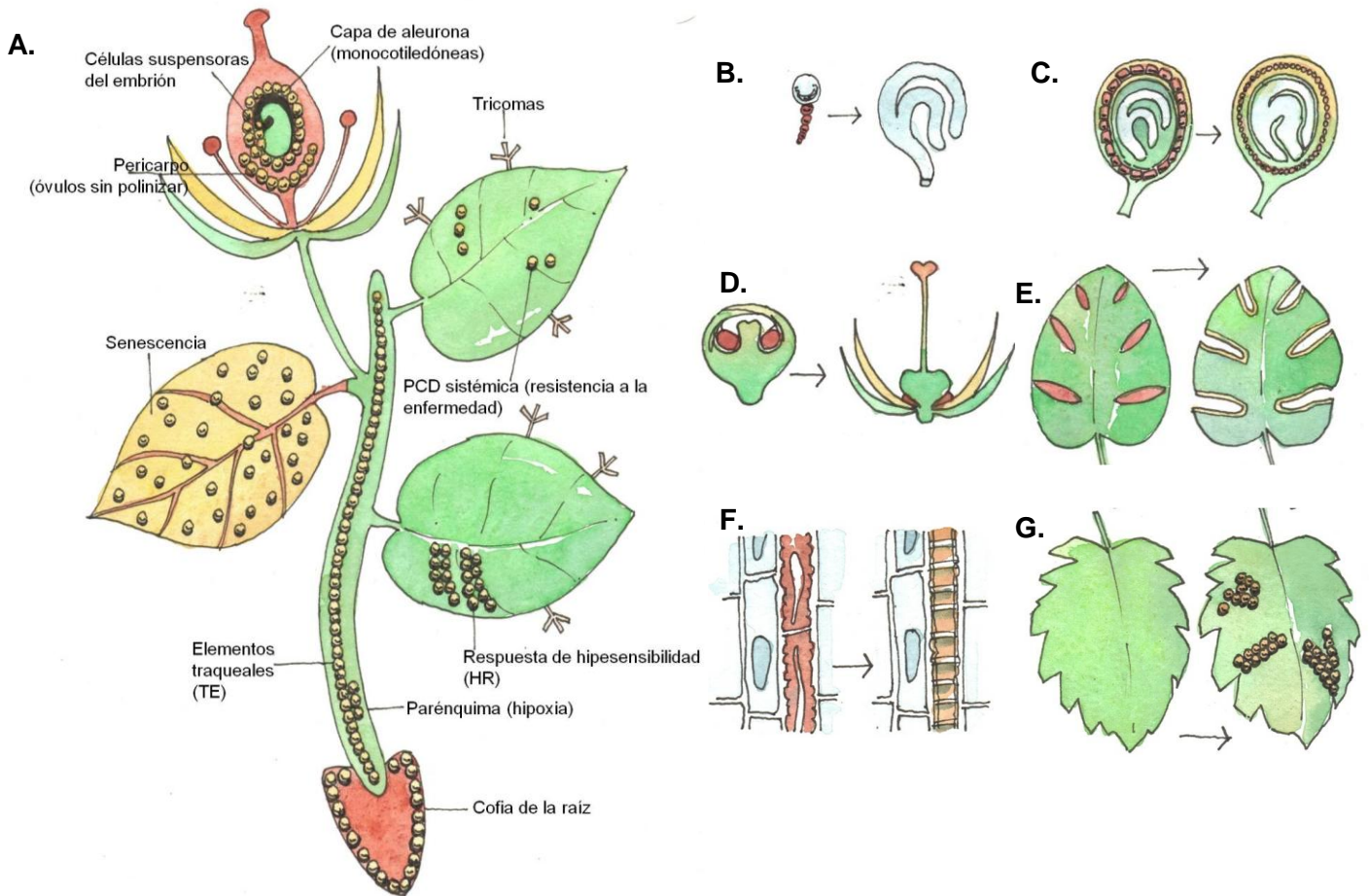
básicas, sugiriendo una interacción directa entre la micotoxina y las enzimas (Sánchez-Rangel et al. 2012).

Entre los 7 y los 21 días de infección de plantas con *F. verticillioides*, ocurre una reducción significativa de la parte aérea así como de la raíz primaria en un híbrido sensible de maíz, a diferencia de lo ocurrido con el genotipo resistente, en donde se observa la inducción del crecimiento tanto de tallos como de raíces (Arias et al. 2012).

### **5. Muerte celular programada (PCD) en plantas.**

La muerte celular programada (PCD) es un proceso de destrucción organizada de las células, esencial como parte del ciclo de la vida de plantas y animales multicelulares porque permite controlar el número de células que conforman al organismo así como su recambio, eliminando las células innecesarias, dañadas o infectadas, manteniendo así el equilibrio tisular y celular así como la especialización y forma de los tejidos (Danial y Korsmeyer 2004).

En las plantas, además de su participación en la HR, la PCD es necesaria en el proceso de muerte celular selectiva para el crecimiento y supervivencia del organismo y puede presentarse localmente o a gran escala (Fig. 7A; Barlow 1982; Pennell y Lamb 1997). La PCD ocurre tanto en etapas vegetativas como reproductivas, como parte de la respuesta al estrés ambiental (Pennell y Lamb 1997; Greenberg y Yao 2004; Lam 2004). Por ejemplo, se requiere para la eliminación de las células suspensoras del embrión y de las que conforman la capa de aleurona, cuya función es temporal durante el desarrollo (Figs. 7A, 7B y 7C; Fath et al. 2000; Pennell y Lamb 1997; Yeung y Meinke 1993), sirve también para eliminar los primordios de estambres en flores femeninas de especies unisexuales (Figs. 7A y 7D; Dellaporta y Calderon-Urrea 1994; Pennell y Lamb 1997; Rogers 2005), para formar perforaciones y lóbulos en hojas (Fig. 7E; Greenberg 1996; Rogers 2005), para la formación de los elementos traqueales (TEs; Figs. 7A y 7F; Fukuda 2000), es esencial para la especialización de las células que conforman ciertos tipos de tricomas (Fig. 7A; Mittler y Lam 1995; Greenberg 1996; Fukuda 1997), para la formación de espacios que facilitan la transferencia de oxígeno en el parénquima durante condiciones de hipoxia (Fig. 7A; Drew et al. 2000; Evans 2004; Rogers 2005), en las células de la cofia que protegen el meristemo apical durante la germinación y el crecimiento de la plántula (Fig. 7A; Rogers 2005), en la senescencia (Fig. 7A; Bleecker y Patterson 1997; Lim et al. 2003; Rogers 2005) y en la respuesta de hipersensibilidad (HR) montada frente al ataque de patógenos (Figs. 7A y 7G; Lamb y Dixon 1997; Pennell y Lamb 1997).



**Figura 7.** Localización y función de la muerte celular programada (PCD) en plantas. **A.** Localización de PCD en diferentes tejidos de la planta; las esferas amarillas representan células muertas. **B – G.** Función deletera de la PCD en diferentes tejidos. **B.** Células suspensoras del embrión. **C.** Células de la capa de aleurona. **D.** Primordios de estambres en flores unisexuales. **E.** Formación de lóbulos y perforaciones. **F.** Formación de elementos traqueales (TE). **G.** Respuesta de hipersensibilidad (HR). Las zonas en rojo representan las células que desarrollarán PCD, mientras que las zonas amarillas representan las células que han muerto. Imagen modificada de Pennell y Lamb 1997, realizada por el Mtro. Felipe de la Torre.

## 5.1. Moléculas participantes en la PCD.

Algunas de las características de la PCD en plantas, incluyendo los cambios en la morfología celular y la degradación del DNA, son similares a las observadas y caracterizadas en los diferentes tipos de muerte celular en animales, y en este sentido se pueden comparar las moléculas participantes.



## 5.1.1. Función de las metacaspasas en la PCD.

De los reguladores apoptóticos mejor caracterizados es la familia de proteasas de cisteína conocidas como **caspasas**; aunque no se han encontrado los homólogos de las caspasas de mamíferos en plantas, en el genoma de *Arabidopsis* se identificó una familia de nueve miembros de proteasas relacionadas con las caspasas, que se denominaron metacaspasas (Lam y Zhang 2012; Uren et al. 2000). Éstas se dividieron en dos subclases basándose en sus regiones de similitud con las caspasas o en la predicción de la estructura de sus dominios (Lam y Zhang 2012).

- Las de **tipo I**, *AtMCP1a*, *AtMCP1b* y *AtMCP1c*, contienen un prodominio amino terminal con una región rica en prolina y un motivo de dedos de zinc seguido de una región rica en prolina (*AtMCP1b* y *AtMCP1c*) o en prolina y glutamina (*AtMCP1a*), en su extremo carboxilo terminal tienen un dominio parecido a una caspasa.
- Las de **tipo II**, *AtMCP2a* a la *f*, poseen inserciones conservadas de alrededor de 180 residuos entre las regiones correspondientes a las subunidades p20 y p10 de las caspasas activadas.

Los niveles de transcrito de las metacaspasas de *Arabidopsis* de tipo I así como los de tipo II b y d, aumentan después de la infección de hojas con patógenos bacterianos (Watanabe y Lam 2005); de la misma forma, la metacaspasa *LeMCA1* de tomate, está regulada positivamente en hojas infectadas con patógenos necrótrofos, lo que sugiere una relación entre las metacaspasas y la inducción de la muerte celular programada (Hoeberichts et al. 2003). La metacaspasa *AtMCP2e* (*AtMC8*) es el único miembro de la familia que se induce específicamente con el tratamiento de luz UV en plántulas (He et al. 2008), además de que puede ser inducida por estrés oxidativo (Lam y Zhang 2012).

## 5.1.2. Proteasas vacuolares en la PCD.

Además de las metacaspasas, hay otras proteasas que participan en distintos eventos de PCD en plantas. Proteasas similares a subtilisina se activan durante la PCD en *Avena sativa* por tratamiento con la micotoxina victorina (Coffeen y Wolpert 2004), en una cascada proteolítica que conduce a la degradación de la Rubisco en los cloroplastos. Esta proteólisis aparentemente se lleva a cabo por un conjunto de proteasas entre las que destacan dos endopeptidasas de serina que son específicas para aspartato, nombradas como saspasas, que están presentes constitutivamente en forma activa en avena pero son translocadas al





apoplasto en respuesta al tratamiento con victorina, esto precede a los eventos tempranos de la inducción de la PCD, incluyendo la fragmentación del DNA y la ruptura de la Rubisco (Coffeen y Wolpert 2004).

Las enzimas procesadoras vacuolares (VPEs; *Vacuolar Processing Enzymes*) pertenecen a una familia de proteasas de cisteína con especificidad de corte en residuos de asparagina, a pesar de la relativamente baja similitud de secuencias entre estas proteasas y las caspasas (Hatsugai et al. 2006). La muerte celular mediada por VPEs se asocia con el colapso vacuolar, mientras que la muerte mediada por el proteasoma se asocia con la fusión de la membrana plasmática con la vacuola (Woltering 2010).

La muerte celular inducida por FB1 en plantas de *Arabidopsis* está acompañada de la pérdida de la integridad vacuolar así como de la formación de lesiones, misma que puede ser abolida por un inhibidor de la caspasa-1 o por un inhibidor de VPEs. Las características de la muerte celular inducida por FB1 se pueden eliminar completamente en una mutante que carezca de los cuatro genes de VPEs puesto que no tiene actividades detectables de VPEs ni similares a la caspasa-1 (Kuroyanagi et al. 2005).

### 5.1.3. Nucleasas en la PCD.

Además de las proteasas, otras hidrolasas que participan en los procesos de PCD son las nucleasas. Los cereales se han convertido en modelo para estudiar la PCD en plantas ya que este proceso ocurre en sus diferentes tejidos durante distintas etapas del desarrollo. Durante los eventos tempranos, posteriores a la fertilización, en el tejido materno que envuelve al endospermo en desarrollo conocido como nucela, ocurre PCD (Domínguez et al. 2001); durante la maduración de los granos las células del endospermo, a excepción de la aleurona, también ejecutan eventos de PCD (Young y Gallie 1999; 2000); las células de aleurona desempeñan un papel esencial en la secreción de enzimas hidrolíticas que ayudan a la movilización del endospermo almidonoso y después de la germinación inician un proceso de muerte activado por giberelinas (Fath et al. 2002).

Uno de los eventos canónicos de la PCD es la degradación del DNA nuclear que, aparentemente, está llevada a cabo por diferentes nucleasas que participan (Peitsch et al. 1993; 1994) en dos fases (Domínguez et al. 2001; 2004):

- En la **primera fase**, el citoplasma se vacuolariza progresivamente y muestra signos de degradación, el núcleo adopta una morfología irregular y el DNA es cortado en fragmentos de alrededor de 300 y/o 50 kpb (Bortner et al. 1995; Mittler y Lam 1997).



- En la **segunda fase**, se desorganiza la envoltura nuclear, la cromatina se condensa y los fragmentos internucleosomales generados previamente son digeridos por nucleasas capaces de cortar DNA de cadena doble o sencilla, dando como resultado la formación de multímeros de 180 pb aproximadamente (Wyllie et al. 1984).

En los años recientes se han identificado en plantas una gran cantidad de enzimas capaces de digerir DNA de forma endonucleolítica y se han catalogado en dos clases con base en su requerimiento de cationes divalentes (Sugiyama et al. 2000):

- **Endonucleasas dependientes de zinc** (Pérez-Amador et al. 2000; Ito y Fukuda 2002): son glicoproteínas monoméricas con pesos moleculares que van desde los 33 hasta los 44kDa y que se caracterizan por su requerimiento de  $Zn^{2+}$ , además de que su actividad catalítica es óptima a pH ácido.
- **Endonucleasas dependientes de calcio** (Mittler y Lam 1995): se distinguen de las de la clase anterior por su requerimiento de  $Ca^{2+}$  y/o  $Mg^{2+}$  y son fuertemente inhibidas en presencia de  $Zn^{2+}$ . Su actividad catalítica es óptima a pH neutro y prefieren como sustrato al DNA de cadena sencilla por encima del RNA.

Hay relativamente pocos reportes que demuestren con claridad la existencia de endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$  en plantas en comparación con los reportes de nucleasas dependientes de  $Zn^{2+}$ , sin embargo, enzimológicamente las primeras tienen propiedades similares a las endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  presentes en mamíferos, como la DNasa I y la DNasa  $\gamma$  (Sugiyama et al. 2000).

Las nucleasas dependientes de zinc, a las que también se les ha llamado tipo S1/P1, hacen cortes en DNA preferentemente de cadena sencilla y son capaces de degradar también RNA; se han descrito en gran variedad de eucariontes, desde hongos filamentosos, plantas y mamíferos (Desai y Shankar 2003).

### **5.1.3.1. Función de las nucleasas en el desarrollo y en respuesta al estrés.**

Se han caracterizado parcialmente distintas nucleasas en plantas que se activan en algún momento durante el desarrollo o en respuesta a un estímulo. Durante la PCD inducida por manosa en un cultivo de células de maíz, se activa una endonucleasa de 35 kDa dependiente de  $Ca^{2+}$ , responsable de la fragmentación del DNA (Stein y Hansen 1999). También en células de nucela de trigo en proceso de PCD se activan dos endonucleasas, una





## INTRODUCCIÓN

de 35 kDa presente en citoplasma y otra de 50 kDa, en núcleo, ambas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , sin embargo, sólo la nucleasa presente en el núcleo es esencial para la fragmentación del DNA y para propiciar otros cambios morfológicos de el organelo durante este evento (Domínguez y Cejudo 2006).

La mayoría de las nucleasas relacionadas con la PCD se han estudiado en procesos propios del desarrollo vegetal como la muerte celular de la aleurona (Fath et al. 1999; Domínguez et al. 2004), la diferenciación de los elementos traqueales (Thelen y Northcote 1989; Aoyagi et al. 1998), el desarrollo del endospermo (Young y Gallie 1999; 2000) y la senescencia en hojas (Pérez-Amador et al. 2000), o en eventos de estrés biótico como la respuesta de hipersensibilidad (Mittler y Lam, 1997). En *Zinnia*, la nucleasa ZEN1 es la responsable de la degradación del DNA nuclear durante la PCD asociada al desarrollo del xilema aunque no forma el patrón internucleosomal característico (Ito y Fukuda 2002), en contraste con lo observado en las células de aleurona que ejecutan un programa de muerte celular, ya que presentan este patrón de fragmentación del DNA (Domínguez et al. 2004).

También durante la respuesta a estrés abiótico se activan nucleasas. En células de raíz de arroz tratadas con NaCl 500 mM, se activan dos endonucleasas, una citoplásmica de 20 kDa, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , cuya actividad óptima se observa a pH neutro, y una nuclear de 37 kDa dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$  con actividad óptima en un intervalo de pH de 4.5 a 6. Ambas nucleasas se inducen a partir de las 2 horas de tratamiento con NaCl, y muestran una actividad máxima a las 4 horas de tratamiento, pudiéndose relacionar esta actividad con la formación del patrón internucleosomal en el DNA.

La nucleasa de plantas mejor caracterizada es la nucleasa bifuncional (BFN1) de *A. thaliana*. Es una nucleasa del tipo S1 y está asociada con procesos de senescencia y con otros eventos de muerte celular programada. Se expresa en hojas senescentes, en xilema en diferenciación y en la zona de abscisión en las flores así como en anteras y semillas (Farage-Barhom et al., 2008). Recientemente se ha reportado su localización subcelular putativa a través del análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la construcción BFN1-GFP, en cuyas hojas jóvenes se localiza dispersa en el citosol, en células en las que comienza la senescencia se reorganiza alrededor del núcleo y en células que atraviesan por etapas avanzadas de senescencia, se encuentra dentro de vesículas membranosas cuyo origen parece ser el retículo endoplásmico, en conjunto con residuos nucleares y material genético. Estos datos sugieren que, al menos en *Arabidopsis*, podría existir un compartimento celular dedicado a mediar la degradación de los ácidos nucleicos durante los procesos de PCD,



## INTRODUCCIÓN

especialmente relacionados con la senescencia (Farage-Barhom et al. 2011), aunque, como la nucleasa BFN1 se expresa en diversos tejidos, etapas del desarrollo y condiciones de estrés, podría darse el caso de que el compartimento en el que putativamente está presente, fuera funcional en otros eventos de PCD, además de la senescencia.



## IV. HIPÓTESIS.

El incremento en los niveles intracelulares de bases esfingoideas libres, ocasionado por el tratamiento con Fumonisina B1, provoca un incremento en la actividad de nucleasa en semillas de maíz, posiblemente mediado por la vía de ácido salicílico.

## V. OBJETIVOS.

### 1. Objetivo general.

Caracterizar la inducción de la actividad de nucleasa por la Fumonisina B1 (FB1) en embriones de maíz durante la germinación y su asociación con la elevación de los niveles de bases esfingoideas y de ácido salicílico.

### 2. Objetivos particulares.

- Estudiar la actividad de las nucleasas que degradan el DNA genómico de maíz y el efecto que tienen sobre ellas la FB1, las bases esfingoideas y el ácido salicílico.
- Caracterizar bioquímicamente las nucleasas inducidas por estos tratamientos.
- Generar herramientas para estudiar si la regulación de este tipo de nucleasas a nivel de transcrito, proteína o actividad.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Material biológico.

Se utilizaron semillas de maíz de la variedad Chalqueño de las cosechas 1998 a 2003 con un porcentaje de germinación superior al 90%. Para algunos experimentos se utilizaron las semillas completas mientras que para otros se extrajo manualmente el embrión o el eje embrionario. Todo el material se almacenó a 4°C.

#### 1.1. Imbibición de semillas, embriones y/o ejes embrionarios.

Tanto las semillas completas como los embriones y los ejes embrionarios se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 10 minutos, posteriormente se hicieron cuatro lavados sucesivos con agua estéril hasta eliminar por completo la solución desinfectante. Se retiró el exceso de agua y se sembraron en cajas Petri con 25 mL de agar (Invitrogen) al 1.2%; en cada caja se distribuyeron 12 semillas o 40 embriones o ejes embrionarios. Se incubaron en diferentes tiempos (de 6 a 72 horas) en presencia de luz fluorescente a 29°C y bajo diferentes tratamientos (control; fumonisina B1, [FB1]; fitoesfingosina, [PS]; esfinganina, [SN]; y ácido salicílico [SA]; Sigma). Este material se utilizó para la extracción de DNA, proteínas y RNA.

Se hizo una solución madre de FB1 1 mM disuelta en acetonitrilo:agua (1:1 v/v); las soluciones madre de las bases esfingoideas fueron 1 mM, disueltas en etanol absoluto; la solución madre de SA fue 150mM en agua estéril.

Para preparar las placas con FB1 y bases esfingoideas (Sigma), al agar a una temperatura entre 40 y 45 °C, se agregaron los volúmenes necesarios para alcanzar una concentración final de 10 µM y de 1mM en el caso del SA. Una vez solidificado el agar, las cajas se mantuvieron abiertas en la campana de flujo laminar para permitir la evaporación del etanol antes de sembrar el material biológico. Después de 24 horas, las semillas se transfirieron a placas de agar nuevas con el fin de evitar que se agotara el suministro de FB1, bases esfingoideas o SA.

### 2. Medición de la pérdida de electrolitos para evaluar la muerte celular.

Los embriones de semillas control y tratadas con FB1 durante 24 y 48 horas, se disecaron manualmente y se transfirieron a tubos que contenían agua desionizada; se determinó la conductancia con un conductímetro Conmet1 (Hanna Instruments) a 22°C en



intervalos de 1 min. Después de que se hizo la última lectura, cada tubo se incubó en un baño de agua hirviendo durante 10 min y se enfriaron lentamente hasta alcanzar nuevamente 22 °C. La conductancia se midió nuevamente, lectura que correspondió al 100% de pérdida de electrolitos.

### **3. Extracción y análisis de DNA genómico.**

Se colocaron 12 embriones de maíz o las radículas de las semillas imbibidas durante más de 24 horas en un mortero, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo. El polvo se vertió a un tubo eppendorf de 1.5ml al que se le agregó 1ml de DNAzol (Invitrogen), se homogenizó agitando por inversión, procurando no agitar muy fuerte para no fragmentar el DNA. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para eliminar los restos de tejido, el sobrenadante se recolectó y se colocó en un tubo eppendorf al que se le agregaron 500µl de isopropanol a -20°C, se incubó a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó nuevamente a 10,000rpm durante 10 min; el precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 10,000rpm durante 2 min. El precipitado se dejó secar con el tubo abierto en posición invertida a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min. El botón de DNA genómico se resuspendió en 50µl de NaOH 10mM y se incubó a 37°C durante 15 min para disolver el material insoluble, se centrifugó a 10,000rpm durante 5 min. Se colectó el sobrenadante y se neutralizó con 1/20 de volumen de Tris 1M pH 8.0. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Para hacer el análisis electroforético del DNA genómico, se prepararon geles de agarosa al 0.8% (p/v) a los que se les adicionó RNAsa; se cargaron entre 2 y 30µg de DNA genómico y se corrieron a 80V durante 40 min en amortiguador TAE (Acetato Tris 40 mM, EDTA 2 mM). Después de la corrida, los geles se tiñeron con bromuro de etidio para ser visualizados en el transiluminador de luz UV y ser fotografiados.

### **4. Extracción y análisis de proteínas totales.**

El tejido vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se molió en mortero hasta formar un polvo fino que se transfirió a un tubo de ultra centrifuga Beckman TL-100; se le agregó 1mL de amortiguador de extracción de proteínas (Tris 70 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; KCl 25 mM; sacarosa 0.25 mM; 2-mercaptoetanol 15 mM; Triton X-100 0.1%) adicionado con una tableta de coctél de inhibidores de proteasas (Complete <sup>TM</sup>, Boehringer) por cada 50 mL de amortiguador de extracción. Se mezcló con la punta de una espátula hasta obtener



una suspensión homogénea y se centrifugó a 60,000rpm durante 30 min a 4°C; se tomó el sobrenadante y se repartió en alícuotas de 1 mL que se almacenaron a -20°C. La cuantificación de proteína total en los extractos crudos se hizo con el método de Bradford et al. (1976) en el que se mezclaron de 2 a 5  $\mu$ L de extracto proteico, 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) y cbp 1 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. La absorbancia se determinó a una  $\lambda=595$  nm utilizando albúmina sérica bovina (BSA 3 mg/mL) como estándar y construyendo una curva patrón en un intervalo de 3 a 30  $\mu$ g.

### **4.1. Geles de actividad de nucleasa.**

La actividad de nucleasa se determinó en geles de poliacrilamida de 0.75mm de espesor al 16%, polimerizados en presencia de DNA (50  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón/mL) sin SDS ni agentes reductores. En cada carril se cargaron 5  $\mu$ g de proteína total de los diferentes tiempos y tratamientos, los geles se corrieron durante 45 min a 250V en una cámara Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster) en amortiguador de corrida de Laemmli (1970; Tris 24.8mM, Glicina 192mM, SDS 1%). Después de la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces durante 10 min con una solución de isopropanol al 25% en Tris 10 mM pH 8.0 a temperatura ambiente, y una vez con ZnCl<sub>2</sub> 2 mM en succinato de sodio pH 6.0. Los geles se incubaron en amortiguador de actividad (KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ M, ZnCl<sub>2</sub> 40  $\mu$ M y succinato de sodio 100 mM a pH 6.0) durante una hora a 55°C con agitación suave y constante. La actividad de nucleasa se reveló tiñendo los geles durante 10 min con una solución de bromuro de etidio 0.25 mg/mL, posteriormente se visualizaron en un transiluminador de luz UV en donde se identificaron bandas oscuras, en las que el DNA ha sido degradado, cuyas señales relativas se cuantificaron por densitometría en el Fluor-S Multilmager (Bio-Rad). Este protocolo se adaptó del método reportado por Muramoto y colaboradores en 1999.

Para cada gel de actividad, se realizó un gel de calibración; se hicieron geles de poliacrilamida de 0.75mm de espesor al 16%, sin DNA, SDS ni agentes reductores; en cada carril se cargaron 5 o 20  $\mu$ g de proteína total de los diferentes tiempos y tratamientos, los geles se corrieron durante 45 min a 250V y se tiñeron con 20 mL de *SimplyBlue*<sup>TM</sup> *SafeStain* (Life Technologies).

### **4.2. Requerimiento de cationes de las nucleasas de maíz estudiadas.**

Para determinar el requerimiento de iones divalentes como factores de las nucleasas de maíz, se prepararon geles de actividad como se describió previamente.



Después de la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces durante 10 min con una solución de isopropanol al 25% en Tris 10 mM pH 8.0 a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron en Tris 10 mM pH 8.0 suplementado con  $\text{CaCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{ZnCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ), a temperatura ambiente durante la noche. La actividad de nucleasa se reveló y documentó como ya se describió.

Para evaluar la acción de los agentes quelantes EDTA y EGTA sobre la actividad de las nucleasas de maíz, se hicieron geles de actividad en la solución amortiguadora o bien, suplementada con EDTA 100 $\mu\text{M}$ , EGTA 100 $\mu\text{M}$  o la mezcla de ambos (EDTA 100  $\mu\text{M}$  / EGTA 100  $\mu\text{M}$ ), durante 3.5 horas a 55°C con agitación suave y constante. Para recuperar la actividad, se adicionó a cada gel  $\text{ZnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  y se incubó durante la noche a temperatura ambiente, con agitación constante antes de revelar la actividad.

### **4.3. Geles bidimensionales de actividad.**

La electroforesis bidimensional se realizó en un equipo Bio-Rad Mini-Protean II Gel System. Se tomó un volumen de la muestra equivalente a 350  $\mu\text{g}$  de proteína total y se mezcló con un volumen igual de amortiguador de muestra (glicerol: anfolinas pH=3-10:  $\text{H}_2\text{O}$  60: 4: 36 v/v/v), siguiendo el protocolo de O'Farrell (1975). Las proteínas se separaron en la primera dimensión de acuerdo a su punto isoeléctrico en geles de acrilamida/bis-acrilamida 5% que contenían anfolinas al 2.4% en un rango de pH de 3 a 10 (Bio Rad 163-112). Se cargaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína en el gel y se corrió a 200V durante 90 min, posteriormente se corrió a 400V durante 90 min más. El amortiguador del ánodo fue ácido fosfórico 10 mM y el del cátodo, hidróxido de sodio (NaOH) 20 mM. Después del isoelectroenfoco, el gel se cortó en sus respectivos carriles y se cargó en geles preparativos polimerizados en presencia de DNA, como se describe en la sección previa.

### **5. Clonación del cDNA de ZmNUC1 y análisis de expresión génica.**

Se emplearon técnicas de Biología Molecular convencionales que se describen en el Anexo I.

### **6. Obtención y purificación de la proteína de fusión GST-ZmNUC.**

Para poder sobreexpresar la proteína en *E. coli*, se subclonó el cDNA aislado (ver Anexo I) en el vector pGEX 4T-2 (Invitrogen). Tanto el plásmido pGEX 4T-2 como la construcción ZmNUC/pGEM-T se trataron con la enzima *Bam*HI en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  y después de purificarlos, con la enzima *Sma*I por 1 h a 37°C. El plásmido linearizado y



## MATERIALES Y MÉTODOS

el fragmento de cDNA de 1044 pb se separaron en un gel de agarosa (1.5%). Con esta construcción (pGEX-ZmNUC) se transformaron células *E. coli* BL21.

Se plaqueó una asada de las células *E. coli* BL21 transformadas con la construcción pGEX-ZmNUC en cajas de LB/agar y ampicilina (100 µg/mL), se incubaron las células durante 12 horas a 37°C. Se tomó una colonia aislada y se inocularon con ella 3.5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), este cultivo se dejó incubando a 30°C con agitación constante durante la noche, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Se tomaron 160 µL de este cultivo para inocular 125 mL de medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL) en un matraz de 500 mL, lo que permite una mejor aeración. Este cultivo se mantuvo a 30°C durante 5 horas con agitación constante de 250rpm hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.5 y 0.6 a 600 nm. La inducción de la proteína de fusión GST-ZmNUC se realizó adicionando IPTG (0.25 mM), durante 3 horas a 30°C. Las bacterias se centrifugaron por 10 min a 8,500rpm. La pastilla de bacterias se puede conservar a -70°C o ser lisada inmediatamente para obtener el extracto proteico total.

El paquete celular se lavó con 8 mL de PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO 10 mM, KH<sub>2</sub>PO 2mM, pH 7.3), se centrifugó (5,000 rpm; 10 min) y las células se resuspendieron nuevamente en 8mL de PBS 1X suplementado con una tableta de coctél de inhibidores de proteasas (Complete™, Boehringer). Las células se lisaron con un sonicador de punta a 15kHz durante 40 minutos, distribuidos en intervalos de 30 segundos de sonicación por 1 minuto de descanso en baño de hielo. Se agregó al sonificado Tritón X-100 en una concentración final del 1% y se incubó con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó la mezcla a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C para separar los restos celulares. Se desechó el sobrenadante ya que la proteína de fusión GST-ZmNUC no se solubilizó y se encontró en cuerpos de inclusión, por lo que a la pastilla de residuos celulares se le agregó amortiguador desnaturizante de muestra, se llevó a ebullición durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente durante 15 min; se cargaron 250 µL de esta mezcla en geles preparativos de poliacrilamida al 12%.

Para separar la proteína de fusión GST-ZmNUC del resto de las proteínas bacterianas presentes en los residuos celulares, se utilizó un método manual que involucró la disección con bisturí de la banda de proteína sobreexpresada a partir de geles preparativos de poliacrilamida. Se corrieron 60 geles de poliacrilamida en condiciones





desnaturalizantes durante 45 min a 250V. Posteriormente, la banda de proteína de aproximadamente 60kDa correspondiente a la proteína sobreexpresada, se cortó de cada uno de los geles. Ya que se habían obtenido todas las bandas de proteína, se cortaron en fragmentos pequeños y se colocaron en los tubos del electroelutor (BioRad, modelo 422), se electroeluyeron durante 5 horas con una corriente de 10 mA/tubo, en amortiguador de corrida de Laemmli (1970; Tris 24.8mM, Glicina 192mM, SDS 1%); se obtuvieron aproximadamente 5mL de proteína, mismos que se concentraron en tubos Amicon Ultra 30,000 MWCO centrifugando a 3,500 rpm durante 15 min en intervalos de 5 min.

### 7. Obtención y purificación del anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC.

Una vez que la proteína recombinante GST-ZmNUC estuvo parcialmente purificada, se conjugó con hemocianina (Herrera et al. 2000) para obtener un mejor inmunógeno. La hemocianina (10 mg) se disolvió en 500  $\mu$ L de agua, se diluyó con 100  $\mu$ L de la mezcla A (10  $\mu$ L glutaraldehído 25%, 90  $\mu$ L PBS 5X) y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. El glutaraldehído se eliminó mediante filtración en tubos Amicon Ultra 30,000 MWCO lavando cuatro veces con PBS 1X y centrifugando a 3,500rpm en intervalos de 5 min por el tiempo necesario para obtener el volumen original. La hemocianina activada se mezcló con 300  $\mu$ g de la proteína recombinante y se incubó a temperatura ambiente durante la noche; este conjugado se usó como inmunógeno.

Para la obtención del anticuerpo específico contra nucleasas de maíz, se inmunizó un conejo hembra de 1.2 kg al inicio del tratamiento con el esquema de inmunización detallado en la Tabla 1:

Tabla 1. Esquema de inmunización para la obtención del anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC.

Día	Procedimiento
0	Sangría suero pre-inmune (6 mL)
0	1 <sup>ra</sup> inoculación (100 $\mu$ g proteína recombinante conjugada con hemocianina + ACF)
15	2 <sup>da</sup> inoculación (100 $\mu$ g proteína recombinante conjugada con hemocianina + AIF)
30	3 <sup>ra</sup> inoculación (100 $\mu$ g proteína recombinante conjugada con hemocianina + AIF)
37	Primera sangría de prueba (6 mL)
40	4 <sup>ta</sup> inoculación (100 $\mu$ g proteína recombinante conjugada con hemocianina + ACF)



---

55 Segunda sangría de prueba (6 mL)

---

64 Sangría total (44 mL suero)

---

Para purificar las inmunoglobulinas se hicieron dos precipitaciones consecutivas tanto del suero obtenido de la sangría total así como del suero preinmune (PIS) con una solución saturada de sulfato de amonio (Harlow y Lane 1988).

## 7.1 *Western blots.*

Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 16% que se corrieron a 250V durante 90 min en amortiguador de corrida (Tris 24.8mM, Glicina 192mM, SDS 1%); en cada carril se cargaron 20 $\mu$ g de los extractos proteicos totales de maíz provenientes de los diferentes tratamientos con FB1 10 $\mu$ M, SN 10 $\mu$ M, PS 10 $\mu$ M y SA 1mM y tiempos (6 a 72 horas). Al terminar la corrida, los geles se lavaron en amortiguador de transferencia (Tris 24.8 mM, Glicina 192 mM, Metanol 10%) y enseguida se transfirieron a membranas Immobilon-P<sup>TM</sup> (Millipore) utilizando una cámara de electroforesis vertical Mini-V8-10 (Life Technologies) a 100V durante 1.5 horas, con amortiguador de transferencia, en frío.

Para hacer el *Western blot* de geles bidimensionales, el isoelectroenfoco (IEF) se hizo en tiras de gel de 7 cm de largo, con gradiente de pH inmovilizado de 4 a 7 (*ReadyStrip<sup>TM</sup> IPG Strip*, Bio-Rad); las tiras se hidrataron durante la noche en amortiguador de hidratación (urea 8M, CHAPS 2%, DTT 0.2%, *ReadyStrip buffer* 1X, azul de bromofenol 0.001%). Se tomaron 50  $\mu$ g de extractos proteicos totales de los tratamientos con SN y FB1 de 36 y 48 horas, se les adicionó el volumen necesario de amortiguador de hidratación para alcanzar un volumen final de 125  $\mu$ L. Los IEFs se corrieron a 50 mA/tira en el equipo PROTEAN IEF (Bio-Rad) con el siguiente programa: 15 min de 0 a 250V a 20°C y 1 hora de 250V a 8,000V a 20°C. Una vez terminada la corrida, las tiras se almacenaron a -20°C inmersas en aceite mineral. Para hacer la segunda dimensión, se eliminó el exceso de aceite de las tiras y se sumergieron en amortiguador de muestra con SDS y sin agentes reductores, se cargaron en geles preparativos de poliacrilamida al 16% y se corrieron durante 45 min a 250V en una cámara Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster) en amortiguador de corrida de Laemmli (1970; Tris 24.8mM, Glicina 192mM, SDS 1%). Posteriormente, se transfirieron a membranas Immobilon-P<sup>TM</sup> (Millipore), como se describe previamente.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Para bloquear las membranas se utilizó una solución de leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.6% en PBS 1X, se incubaron en esta solución durante 2 horas a temperatura ambiente en constante agitación orbital. Se eliminó la solución de bloqueo y se reemplazó con solución fresca a la que se le añadió el primer anticuerpo ( $\alpha$ -GST o  $\alpha$ -ZmNUC, según el ensayo a realizar) en diluciones de 1:1,500 hasta 1:5,000. Las membranas se incubaron con agitación orbital constante a 4°C durante la noche; la solución se retiró y se hizo un lavado de 15 min con PBS 1X a temperatura ambiente y con agitación orbital, se eliminó la solución de lavado y se reemplazó con PBS 1X suplementado con NaCl 0.5M, se lavaron las membranas nuevamente durante 15 min con agitación orbital a temperatura ambiente; se dio un tercer lavado con PBS 1X durante 15 min con agitación orbital, se desechó la solución y se agregó de nuevo solución de bloqueo suplementada con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano; Amersham Biosciences) en una dilución 1:10,000; se incubaron las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación orbital y se lavaron para eliminar los residuos de la solución de bloqueo y los anticuerpos unidos inespecíficamente dando 3 lavados de 15 min cada uno con PBS 1X a temperatura ambiente.

Las membranas se colocaron entre 2 acetatos en donde se puso también 1 mL de la solución reveladora (ECL; Amersham) en la que se incubaron entre 1 y 2 min a temperatura ambiente, posteriormente, las membranas se protegieron de la luz dentro de un casete de exposición durante 10 min antes de exponer la película fotográfica a la quimioluminiscencia producida. Se colocó la película fotográfica dentro del casete, marcando en ella con lápiz las esquinas de la membrana; se expuso durante intervalos de entre 30 segundos y 10 min antes de revelar por métodos convencionales.

### **7.1.1 Ensayos de competencia del anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC vs la proteína recombinante GST-ZmNUC.**

Con la finalidad de saber si el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC era capaz de reconocer a la proteína ZmNUC30 en extractos proteicos totales, se hicieron ensayos de competencia en los que se incubaron diluciones 1:1000 y 1:5000 del anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC, con 25 y 50  $\mu$ g de la proteína de fusión GST-ZmNUC en un volumen final de 1 mL, se incubaron a 4°C durante 4.5 horas con agitación constante.



Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida (16%) y en cada carril se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de los extractos proteicos totales de maíz provenientes de los diferentes tratamientos a las 36 horas de germinación. Se transfirieron y bloquearon como se describe previamente en la sección 7.1 de Materiales y Métodos. Se utilizó como primer anticuerpo la mezcla del anticuerpo unido a las diferentes cantidades de proteína de fusión en 4 mL de solución de bloqueo y se llevó a cabo la incubación durante la noche a 4°C con agitación orbital constante. Las membranas se lavaron, se incubaron con el 2º anticuerpo y se revelaron como se describe previamente en la sección 7.1 de Materiales y Métodos.

### 7.2 Inmunoprecipitación.

Se utilizó la resina comercial *nProtein A Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences). La resina se lavó cinco veces con dos volúmenes de PBS 1X cada vez, centrifugando entre cada lavado a 12,000rpm durante 1minuto. Se preparó una suspensión de resina al 50% con PBS 1X que se almacenó a 4°C.

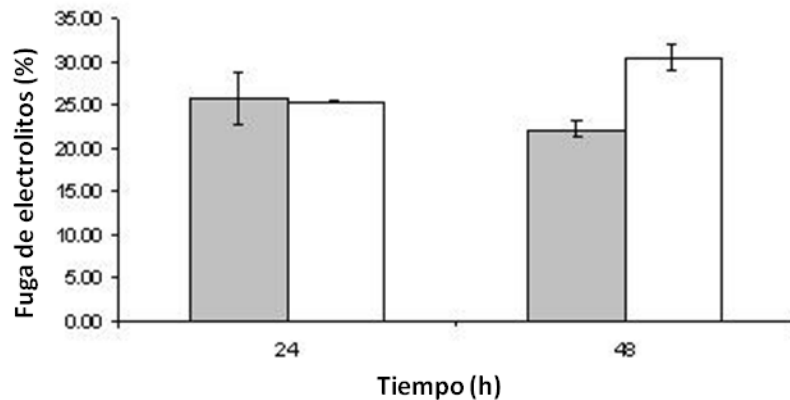
Para conjugar los anticuerpos con la resina se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de cada anticuerpo (incluyendo los controles negativos  $\alpha\text{-TK}$  y PIS) y 49  $\mu\text{L}$  de resina, esta mezcla se incubó sin agitación durante 4 horas a 4°C, posteriormente se agregaron 25  $\mu\text{g}$  de cada extracto proteico total, de los diferentes tratamientos y tiempos, en el volumen necesario de PBS 1X / BSA 0.5% para obtener un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ , la suspensión se dejó en agitación constante a 4°C durante la noche. Las mezclas se centrifugaron a 12,000rpm durante 5 min para obtener los complejos, el botón se lavó con 1 mL de PBS 1X y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. Para eluir los complejos anticuerpo-proteína de la resina, se agregó amortiguador de muestra para electroforesis de proteínas (Laemmli, 1970) sin  $\beta$ -mercaptoetanol. El análisis tanto de los inmunoprecipitados como de los sobrenadantes se hizo utilizando geles de actividad de nucleasa como se explica previamente en la sección 4.1 de Materiales y Métodos.



## VII. RESULTADOS.

### 1. El tratamiento con FB1 provoca un incremento en la permeabilidad membranal en semillas de maíz.

Para conocer los efectos fisiológicos de la FB1 en condiciones lo más parecidas posible a las que se presentan *in vivo*, se imbibieron semillas de maíz en presencia de micotoxina 10  $\mu\text{M}$ . Como parámetro de muerte celular, se determinó la pérdida de electrolitos que sufren las radículas tanto de semillas control como tratadas durante 24 y 48 h, a través del cambio en la conductancia del medio. A las 48 h, se observó un incremento significativo de 38% en la pérdida de electrolitos como efecto del tratamiento (Fig. 8). Estos resultados son consistentes con lo observado en otros modelos en el sentido de que la micotoxina causa muerte celular del tejido vegetal.



**Figura 8.** Pérdida de electrolitos en radículas de semillas control y tratadas con FB1 10  $\mu\text{M}$ . Media  $\pm$  SD; n=4 muestras independientes.

### 2. El tratamiento con FB1 provoca la degradación del DNA genómico en semillas de maíz y la inducción de la actividad de nucleasas.

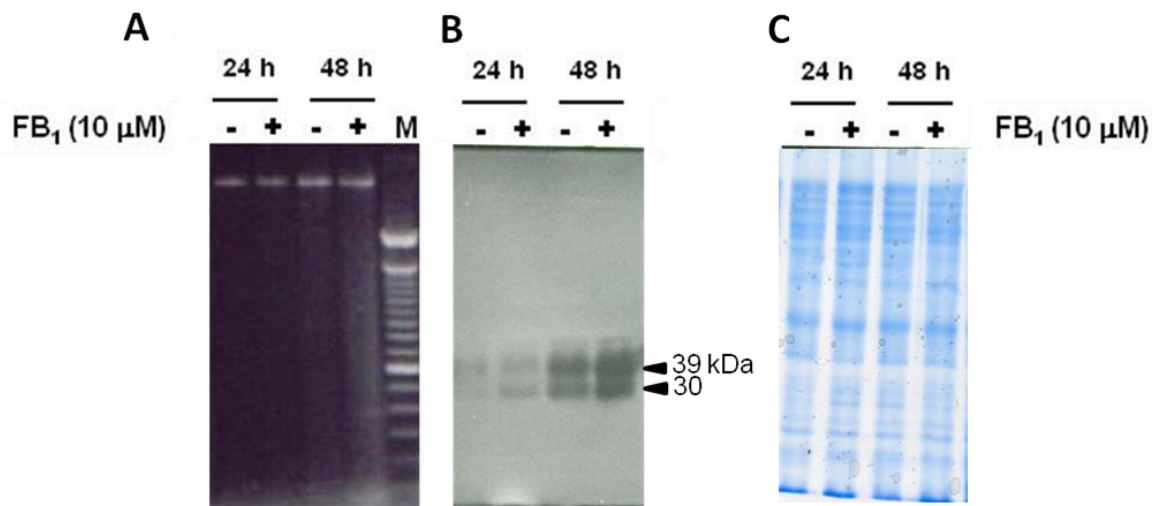
Ya que la fuga de electrolitos es considerada como marcador de muerte celular, una vez corroborada ésta en las semillas de maíz como producto del tratamiento con la FB1, se evaluó otro marcador clásico de muerte celular que es la fragmentación del DNA. Se realizó el análisis electroforético del DNA genómico extraído de radículas de semillas de maíz control y tratadas con FB1 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h, tiempo al que ocurrió muerte



## RESULTADOS

celular y se observó la presencia de un barrido de DNA en geles de agarosa, patrón presente en semillas tratadas, a diferencia del control y de lo observado a tiempos más cortos de germinación (Fig. 9A).

Para asociar la degradación del DNA genómico con la activación de nucleasas, se obtuvieron extractos proteicos de radículas control y tratadas con FB1 10  $\mu$ M durante 24 y 48 h, y se analizó la actividad de estas enzimas en geles de poliacrilamida suplementados con DNA. Consistentemente se observaron dos bandas de actividad que corresponden a las zonas que no se tiñen con bromuro de etidio. Por su migración electroforética, estas dos bandas de actividad tienen un P.M. aproximado de 30 y 39 kDa. Estas actividades se detectaron desde las 24 h, incluso en los extractos control, y se observó un incremento a las 48 h, que fue más acentuado en extractos de semillas tratadas con FB1 (Fig. 9B). La mayor actividad de nucleasa correlacionó en tiempo con la mayor degradación del DNA genómico y con la mayor pérdida de electrolitos.



**Figura 9.** Análisis de la fragmentación del DNA genómico de maíz y las actividades de nucleasa presentes en extractos proteicos. **A.** Degradación DNA genómico en radículas de semillas control y tratadas con FB1 durante 24 y 48 horas. M: marcador de peso molecular **B.** Nucleasas presentes en extractos proteicos de maíz y cuya actividad se incrementa por efecto del tratamiento con FB1. **C.** Control de cargado: 5  $\mu$ g/carril de extractos proteicos totales.

Aunque se observó actividad de nucleasa en el control de 48 h, ésta no correlacionó con la degradación del DNA genómico, posiblemente debido a la diferencia en la sensibilidad de los métodos utilizados; los geles de actividad son más sensibles que los geles de agarosa en los que se analiza el DNA.

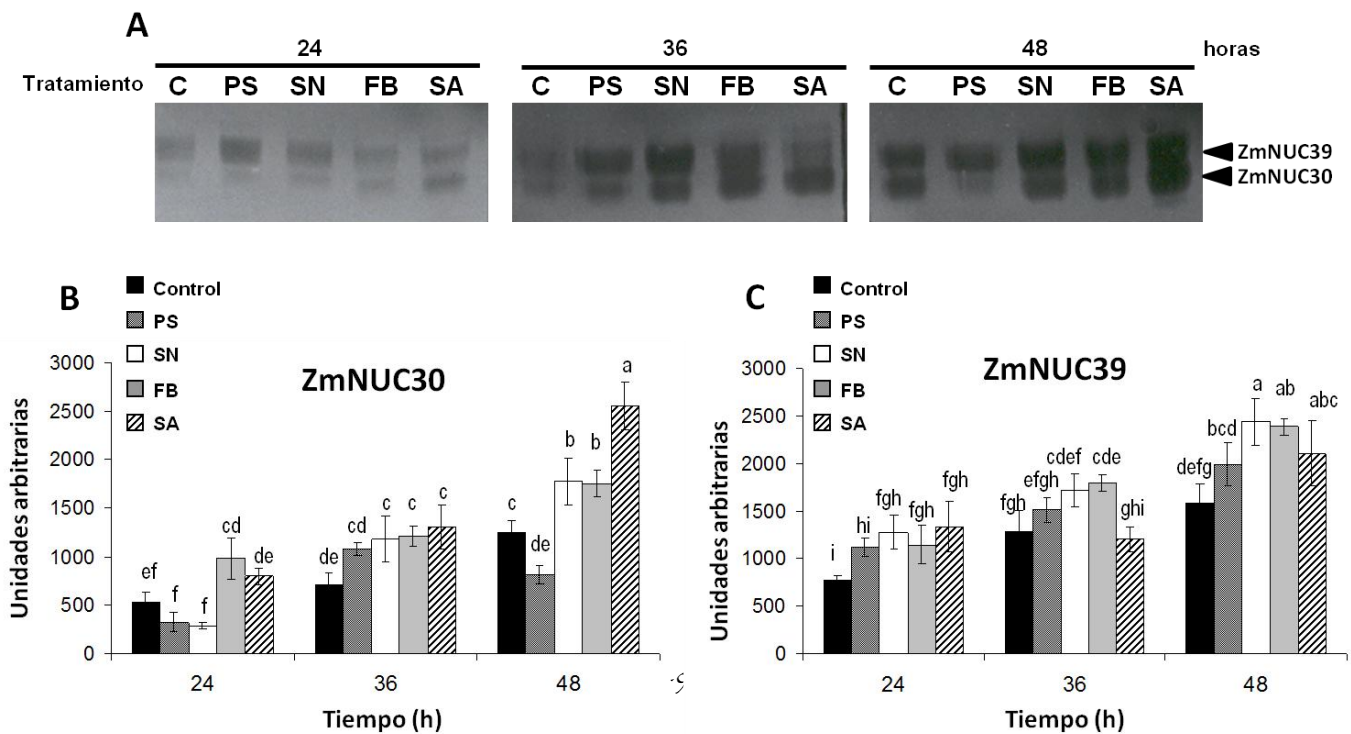


### 3. La actividad de nucleasa se induce por el tratamiento con FB1, BCLs y SA.

Debido que la FB1 es un potente inhibidor de la esfinganina *N*-acil transferasa que provoca la acumulación de BCLs, y éstas a su vez inducen una elevación en los niveles de ácido salicílico en maíz durante la germinación (de la Torre-Hernandez et al. 2010), se evaluó el efecto de dos BCLs, así como del SA, sobre la actividad de las nucleasas presentes en extractos proteicos de maíz durante distintos tiempos en la germinación.

Se analizaron en geles de actividad de nucleasa los extractos proteicos de semillas de maíz tratadas con fitoesfingosina (PS) 10  $\mu$ M, esfinganina (SN) 10  $\mu$ M, FB1 10  $\mu$ M y SA 1mM en tiempos desde las 24 hasta las 48 h, observándose desde el tiempo más corto el doblete de actividad previamente identificado (Fig. 10A). La banda de actividad de 30 kDa se nombró como ZmNUC30 mientras que la de 39 kDa, se nombró como ZmNUC39.

A las 24 h de germinación, con cada uno de los tratamientos, incluyendo el control, se observó mayor actividad de ZmNUC39 en comparación con ZmNUC30 (Fig. 10A), sin embargo, a las 36 h se registraron incrementos en la actividad de ZmNUC30 del 65% con SN, 70% con FB1 y 83% con SA (Fig. 10A y B), respecto al control, mientras que la actividad de ZmNUC39 aumentó un 33% con SN y 39% con FB1 (Fig. 10A y C). A las 48 h, el incremento observado en la actividad de ZmNUC30 fue del 42% con SN, 40% con FB1 y 105% con SA (Fig. 10A y B).







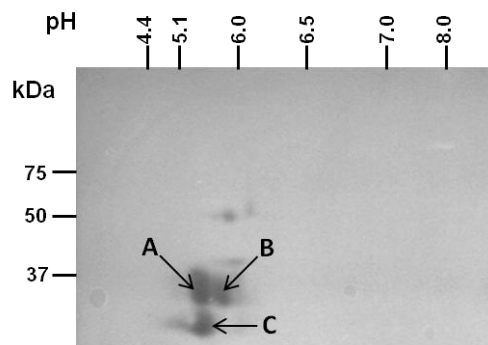
**Figura 10.** Actividad de nucleasa bajo diferentes tratamientos. **A.** Geles de actividad de nucleasa de 24 a 48 h de germinación con los tratamientos C, control; PS, fitoesfingosina 10  $\mu$ M; SN, esfingonina 10  $\mu$ M; FB, fumonisina B1 10  $\mu$ M; SA, ácido salicílico 1mM; se cargaron 5  $\mu$ g de proteína total por carril. **B.** Cuantificación densitométrica de las bandas de actividad de ZmNUC30. **C.** Cuantificación densitométrica de las bandas de actividad de ZmNUC39. (Fluor-S Multilmager); media  $\pm$  SD; n= 3 geles; P < 0.01, prueba de Tukey.

## 4. Caracterización bioquímica de la nucleasa de maíz ZmNUC30.

Una vez identificadas las dos actividades de nucleasa de maíz responsivas a los tratamientos utilizados, se hizo una caracterización bioquímica de éstas con énfasis en ZmNUC30 ya que su actividad se indujo de manera clara con los cuatro tratamientos.

### 4.1. Cálculo del punto isoeléctrico.

Para determinar el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas responsables de la actividad de nucleasa, se realizó una electroforesis bidimensional en la que se separaron extractos proteicos de radículas de semillas de maíz tratadas durante 48 h y se evaluó la actividad de nucleasa. Se observaron varias manchas de actividad (Fig. 11), apreciados como zonas oscuras en el gel. Se localizaron mayoritariamente 3 puntos de actividad (Fig. 11; A, B y C); los dos primeros (A y B), mostraron una migración relativa cercana a los 37 kDa y pI de 5.2 y 6, respectivamente. El tercer punto de actividad (C), mostró valores aproximados de peso molecular y pI de 30 kDa y 5.2, respectivamente (Fig. 11), por lo que proponemos que se trata de ZmNUC30.



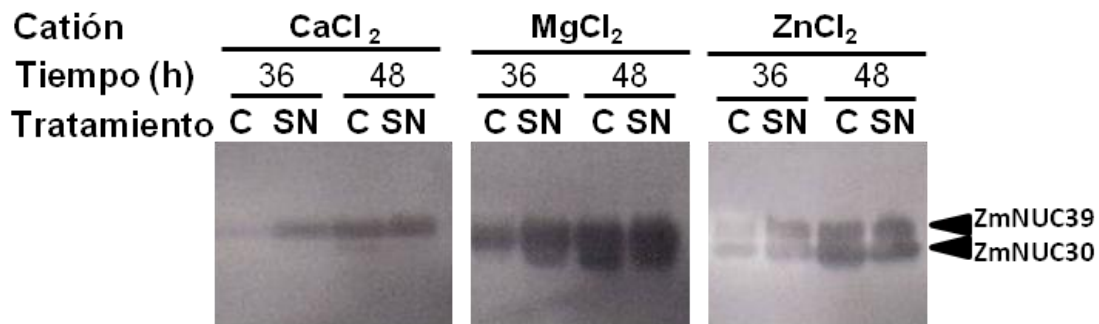
**Figura 11.** Gel bidimensional de actividad de nucleasa. Las flechas señalan los tres principales puntos de actividad. **A:** 37 kDa, pI 5.2; **B:** 37 kDa, pI 6; **C:** 30 kDa, pI 5.2.





## 4.2. Uso de cationes divalentes como cofactores.

Las endonucleasas vegetales requieren de un catión divalente como cofactor que puede ser  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  y éste es un criterio empleado para su clasificación (Sugiyama, et al., 2000). Con este propósito, se hicieron geles de actividad a los que, durante la incubación para revelarla, se les adicionaron  $\text{CaCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) o  $\text{ZnCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ) para evaluar el efecto que tienen sobre las nucleasas de maíz (Fig. 12). Se observó el doblete de actividad previamente identificado pero la actividad correspondiente a ZmNUC30 fue menor en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  que con los otros dos cationes probados. El efecto del catión sobre la actividad de ZmNUC39 fue marginal pues se detectó con los tres cationes.



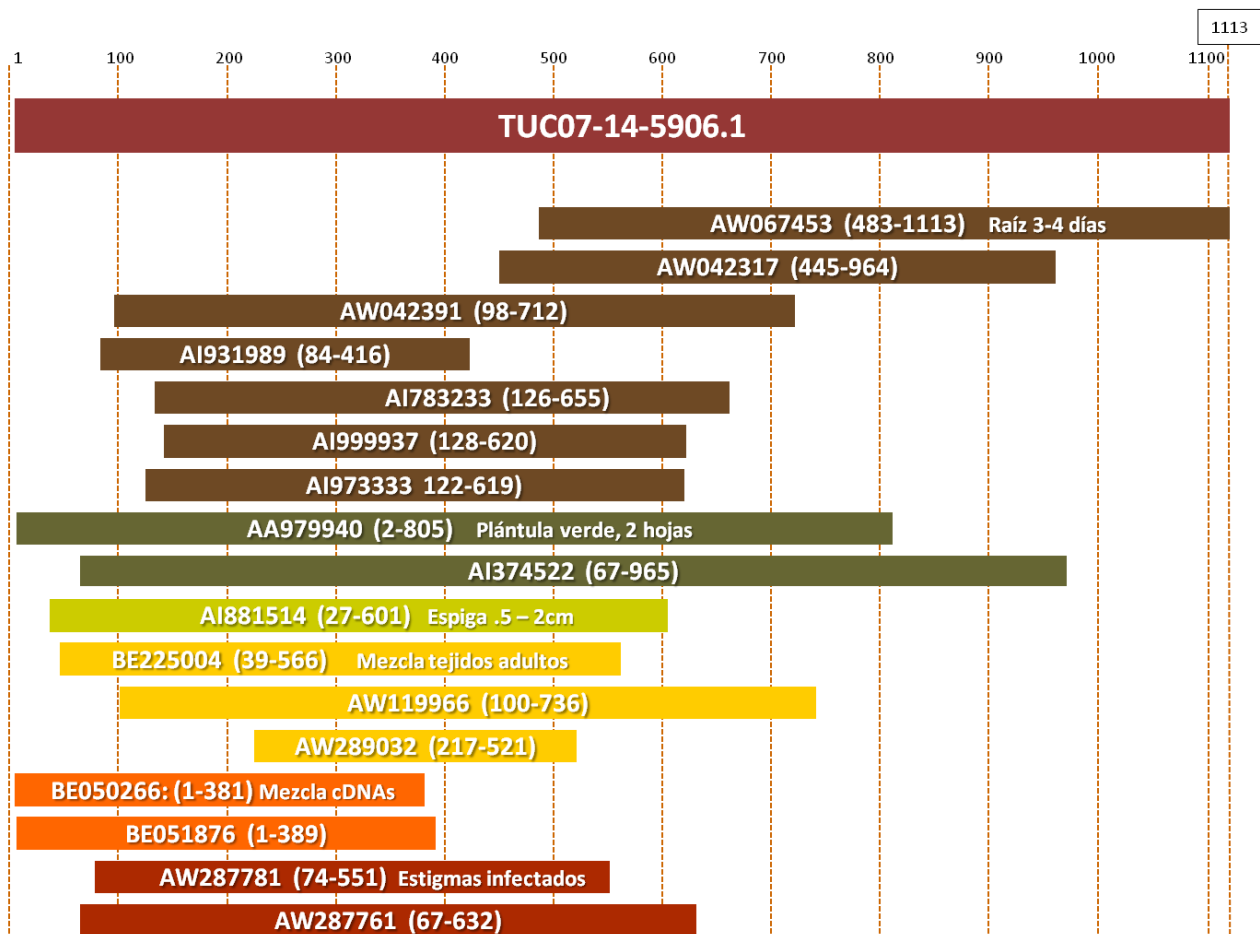
**Figura 12.** Geles de actividad de nucleasa en presencia de  $\text{CaCl}_2$  20 $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  5  $\mu\text{M}$  y  $\text{ZnCl}_2$  20 $\mu\text{M}$  como cofactores, agregados en la solución amortiguadora para revelar la actividad. Se cargaron 5  $\mu\text{g}$  de extracto proteico total en cada carril, provenientes de radículas de semillas control y tratadas con esfinganina (SN) 10  $\mu\text{M}$ , durante 36 o 48 horas.

Por su parte, las nucleasas dependientes de zinc han sido agrupadas dentro de la familia de nucleasas S1/P1, descrita en gran variedad de eucariontes, incluyendo plantas (Desai y Shankar 2003). Se trata de glicoproteínas monoméricas con pesos moleculares que van desde los 33 hasta los 44kDa, su actividad catalítica máxima ocurre a pH ácido y hacen cortes en DNA de cadena sencilla, preferentemente, y son capaces de degradar también RNA.



### 5. Clonación y análisis del cDNA de ZmNUC30.

Para analizar la inducción de las nucleasas de maíz fue necesario analizar su patrón de expresión, sin embargo, no conocíamos la secuencia de las nucleasas ZmNUC30 o ZmNUC39 que sirviera como referencia para hacer este estudio. Por ello se recurrió a la base de datos de secuencias expresadas (EST; [www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org)) del año 2001. Se obtuvieron 25 secuencias de diferentes tamaños y se eligió la de mayor longitud (1113 pb; Fig. 13), siendo ésta una secuencia construida a partir de fragmentos traslapados provenientes de diversos tejidos, e identificada con el número de referencia TUC07-14-5906.1 (Fig. 13).



**Figura 13.** Esquema de construcción de la secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1 a partir de fragmentos traslapados. En cada barra se indican el número de referencia de cada secuencia así como su longitud en pares de bases. Las barras de diferentes colores corresponden a los diferentes tejidos indicados al inicio de cada bloque y fueron obtenidas en los siguientes laboratorios: raíz de 3-4 días (Walbot Laboratory, Stanford University); plántula verde, estadio de



## RESULTADOS

dos hojas (Schnable Laboratory, Iowa State University); mezcla de cDNAs de espiga en desarrollo, 0.5-2.0cm de largo (Schmidt Laboratory y Walbot Laboratory, Stanford University); mezcla de cDNAs de tejidos adultos y totalmente diferenciados (pelos, espiga, chala, grano, tallo, hoja y raíz; Walbot Laboratory, Stanford University); biblioteca Glume de cDNAs de maíz (LIBEST 004941; Cold Spring Harbor Laboratory); estigmas adultos infectados por *Fusarium graminearum* (Walbot Laboratory, Stanford University).

El cDNA compilado contenía un marco de lectura abierto aparentemente completo ya que cuenta con un codón de término y un potencial codón de inicio. En la región 3'-UTR se encuentra una señal de poliadenilación y la correspondiente cola de poliA; el extremo 5'-UTR no traducido podría estar incompleto por lo que no estamos seguros si hay algún marco de lectura adicional río arriba del ATG señalado (Fig. 14).

```

GCACGAGCGT CAGCAGAGAG ACATGGCGCC CCACCACCAG CAGCGGGCGC 0051
TGCTCCTGTT CCCACTCGTC TTCCTCCTCC TCCTCCTTGC CCCGCCCTC 0101
GCCGGCGCGT GGGGAAAGGA GGGCCACATC ATGGTCTGCA AGATCGCCGA 0151
GAAGTACCTG TCGGAGAAGG CGGCGGCGGC GGTGCAGGCG CTGCTGCCGG 0201
AGTCGGCGGG CGGGGAGCTG TGCACGGTGT GCCCGTGGGC GGACCAGGTG 0251
CGCTGGCACT ACCACTGGGC CAGCCCGCTG CACTACGCCA ACACCCCCCA 0301
AGTCTGCAAC TTCAAGTATT CTCGGGACTG CCACAATTCT CGTGGCCAGC 0351
AAGGGATGTG CGTCGTCGGG GCTATCAACA ACTACACGGA CCAGCTCTAC 0401
AGCTACGGCC AGAAGACTTC GTATAACCTG ACGGAGAGCC TGATGTTCCCT 0451
GGCACACTTC GTCGGCGACG TCCACCAGCC GCTGCACGTA GGCTTCCAAG 0501
ATGACGAGGG CGGTAACACC ATCACCGTCC ACTGGTACCG GAGGAAAGCA 0551
AACCTCCATC ACGTGTGGGA TGTCAGCATT ATTGATACGG CGATCAAGGA 0601
CTTCTACAAC AAGAGCATGG ATACCATGGT AGAGGCTCTC AAGATGAATC 0651
TTACAGATGG ATGGTCTGAC GACATCGTCC ACTGGGAAAA TTGCAAGAAC 0701
AAACACGCGA CCTGCGCGAA CGACTATGCG ATTGAGAGCA TCCATTATTC 0751
CTGCAACTAC GCCTACAAAG ATGTGGAGCA AGACATCACT CTAGGAGATG 0801
ATTATTTTTT CAGTAGGTAC CCGATTGTGG AGAAGAGGTT AGCGCAGGCT 0851
GGAATCAGAT TGGCGTTGGT ACTTAATCGG ATATTTGGTG GAGGTGAAGC 0901
GGATGATATA CCACTACAAG TACAGTAA CA GCTCTAATAA AAGGAAGCAT 0951
AGCTATTACA AGGATTTGTC CATTACGTCG TCTATACACT AATAAATTGG 1001
CATGAATTTG TAACTCCATT GCTATACATC AATAAATTGG CATGAATTTG 1051
TAACAACCTGA AAGGATCAAG ATGCCACCCT GTAATTGCAC TTCTGAAAAA 1101
AAAAAAAAAA AAA

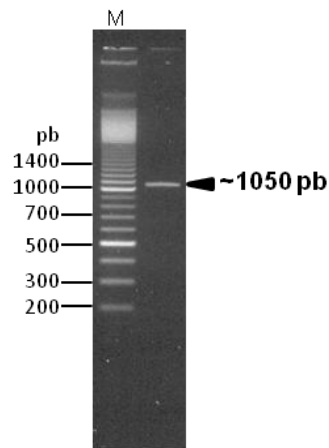
```

**Figura 14.** Secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1. Se indican el codón putativo de inicio (anaranjado), el codón de término (morado), la señal de poliadenilación (rosa), la región más conservada entre las nucleasas vegetales (457 pb, azul) amplificada a partir los oligonucleótidos diseñados (verde) y los oligonucleótidos que permitieran la amplificación de la secuencia completa (1050 pb, rojo).



## RESULTADOS

La secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1 tiene altos porcentajes de identidad con otras nucleasas vegetales reportadas pertenecientes a la familia S1/P1: 86% con una nucleasa bifuncional de arroz, 58% con Bnuc1 y 56% con BEN1 de cebada así como 51% con BFN1 de *Arabidopsis* (Fig. 17). Debido a sus características, esta secuencia se utilizó como referencia para diseñar de oligonucleótidos (Fig. 14; Anexo I) que permitieran el aislamiento del cDNA correspondiente, de 1044 pb (Fig. 15).



**Figura 15.** Producto de amplificación por RT-PCR obtenido a partir de RNA de semillas de maíz tratadas con FB1 durante 48 h; se utilizaron los cebadores diseñados con base en la secuencia EST de maíz TUC07-14-5906.1.

El producto de amplificación se clonó y la secuencia mostró una identidad del 98%, con la secuencia TC07-14-5906.1, observándose únicamente cambios puntuales en algunas bases. La secuencia de cDNA aislada se depositó en el GenBank (AM710418).

Se buscó en el genoma de maíz la secuencia correspondiente del cDNA aislado (AM710418) y solamente se encontró una secuencia con alta identidad (GRZM2G112968) en el brazo corto del cromosoma 8, de tal manera que se pudo derivar la estructura de exones e intrones del gen. Éste está formado por 8 exones y 8 intrones cuya longitud varía entre 84 y 2159 pb (Anexo VI).

### **6. La secuencia de cDNA AM710418 de GenBank codifica una nucleasa de la familia S1/P1.**

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA obtenido, fue una proteína de 301 residuos (Fig. 16) con un peso molecular calculado de 34 kDa y un pI



## RESULTADOS

teórico de 5.8. El algoritmo SignalP-4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) identificó un potencial péptido señal de secreción de 29 aminoácidos en el extremo amino. Se localizó un hexapéptido y residuos característicos presentes en nucleasas de la familia S1/P1 (Fig. 16). Estos residuos son de His (H), Lys (L) y Asp (D), responsables de la interacción con los 3 átomos de  $Zn^{2+}$  que permiten la catálisis. Además, contiene tres residuos de Asn (N) glicosilables y cuatro Cys (C) que forman puentes disulfuro, la que ocupa la posición 95 con la 244 y la 103, con la 113; todas estas posiciones fueron deducidas a partir de la secuencia de la nucleasa S1 de *Aspergillus oryzae* (AAB20216).

```
001 MAPHQQQRALLLFPLVFLLLLLLAPPLAGAWGKEGHIMVCKIAEKYLSEKA
051 AA AVQALLPESAGGELSTVCPWADQVRWHYHWASPLHYANTPQVCNFKYS
101 RDCHNSRGQQGMCVVGAINNYTDQLYSYGQKTSYNLTESLMFLAHFAGDV
151 HQPLHVG FEDDEGGNTITVHWYRRKANLHHVWDVSIIDTAIKDFYNKSM
201 TMVEALKMNLTDGWSDDIVHWENCKNKHATCANDYAIESIHYS CNYAYKD
251 VEQDITLGDDYFFSRYPIVEKRLAQAGIRLALVLNRIFGGGEADDIPLQV
301 Q
```

**Figura 16.** Secuencia de aminoácidos de la proteína de maíz ZmNUC1. Se destacan el péptido señal (rosa), la secuencia consenso de nucleasas S1/P1 (subrayada), residuos involucrados en la unión con el Zn 1 (azul), con el Zn 2 (verde) y con el Zn 3 (rojo), los residuos glicosilables (amarillo) y las cisteínas que forman puentes disulfuro (morado).

La presencia del péptido señal es una característica que comparte la proteína ZmNUC1 con las nucleasas S1 de *A. oryzae* (Iwamatsu et al. 1991; Lee et al. 1995), Os01g0128200 de *O. sativa* (Ohyang et al. 2006; Matsumoto et al. 2005), BEN1 (Aoyagi et al. 1998), Bnuc1 (Muramoto et al. 1999) y Bnuc2 (Zaina et al. 2003) de *H. vulgare*, BFN1 (Perez-Amador M et al. 2000) de *A. thaliana*, ZEN1 (Aoyagi et al. 1998) y ZEN3 (Perez-Amador et al. 2000) de *Z. elegans*, conduciendo a la predicción de que se trata de una proteína que se secreta y su localización final está en el espacio extracelular (SignalP-4.0 prediction; Nature Methods, 2011). Una vez habiendo analizado la secuencia proteica de ZmNUC1, se hizo el alineamiento con las otras nucleasas vegetales reportadas pertenecientes a la familia S1/P1 como se muestra en la Fig. 17, en donde los residuos idénticos se enmarcan en un fondo oscuro y los residuos similares, en uno gris. Los porcentajes de identidad y similitud que tiene ZmNUC1 con las nucleasas vegetales con las que se hizo el alineamiento, así como con las endonucleasas S1 y P1, a partir de





# RESULTADOS

las cuales se establece el dominio conservado S1/P1, se presentan en la Tabla 2 y se detallan en el Anexo IV.

```

ZmNUC1 MAPHQQQRALLPPEVFLLELAPFLAGAWGKEGHIMVCKIAEKYLSEKAAAAVQALLPE
HvNUC2 MG-----LLLLEHVVLVAAAAGAPAAQAWGKEGHYMTCKIADGFLTKEASAGVKDLLPS
HvNUC1 MG-----LLLLEQVLLAATVARAPAAQAWGKEGHYMTCKIADGFLTSEASAAVKDLLPS
StNUC  -MLRLTLLS--KIPFLCEAPEN-HHGAEAWSKEGHMTCTIAQGLLNDEAAHAAVEMLLPE
HvZEN1  --MALIRLS--KISCLGFFMINNYNAVQAWSKEGHVMTCTIAQELLSPAAHAAVQMLLPD
AtBFN1  -MASAFRSSTRLLVLGLLILCSVSSVRSWSKEGHIITCTIAQNLLEAGPAHVVENLLPD
ZeZEN2  -----LSLVLLLVFVAVPTVRCWGVGPHFTCKIAQGRLSQTAVDAVNSLLPE
ZeZEN3  ---MSHLELWWEKSTCSLFLLLSIPGVICWQKEGHYATCKIAQSELSSEALNAVRELLPE

```

```

ZmNUC1 SAGGELSTVCPWADQWR--WHYHWASPLHYANTP-QVCNFKYSRDCENSRGQQGMCVVGGA
HvNUC2 SANGELAECVCSWADSOR--FRYRWSPLHADTP-KDCRFPSYARDCHDTKGNKDACVVGGA
HvNUC1 SANGELAECVCAWADRQR--FRYRWSPLHADTP-GDCNFSYARDCHDTKGNKDACVVGGA
StNUC  YVNGDLSALCVWPDQHRHWYRYRWTSPLEHIDTPDKACNFDYERDCHDQHGKDMCVVAGA
HvZEN1  YVKGNLSALCVWPDQHRHWYRYRWTSPLEHIDTPDQACSFYRTRDCHDSNGVDMCVVAGA
AtBFN1  YVKGDLSALCVWPDQHRHWYRYRWTSHLHIDTPDQACSFYRTRDCHDQHGKDMCVVAGA
ZeZEN2  YAEGLDASLCSWADHVT--FRYHWSALHIDTPDNLCTVQYRRDCRDEDGVMGRCVVAGA
ZeZEN3  TAEGLDASVCSWPDDEIKWMHKNHWTSELHVDTPDFRCNVDYCRDCHDSGVMKDCVVTGA

```

```

ZmNUC1 INNYTDQLYS-YGQKTS---YNTESLPLAHFAGDVHQPLHVGFEDDEGGNTITVHWYR
HvNUC2 INNYTAALQ---DPSNP---YNRTESLPLAHFAGDVHQPLHCGRVEDLGGNTITLVRWYR
HvNUC1 INNYTAALQ---DPSSP---YDPTESLPLAHFAGDVHQPLHCGHVEDLGGNTITLVRWYR
StNUC  IQNFTQLSH-YREGTSDRRYNTALFLSHFMODHQPHVGFEDDEGGNTITLVRWYR
HvZEN1  IQNFTQLSH-YQHGTSDRRYNTALFLSHFMODHQPHVGFEDDEGGNTITLVRWYR
AtBFN1  IQNFTQLSH-YREGTSDRRYNTALFLSHFMODHQPHVGFEDDEGGNTITLVRWYR
ZeZEN2  IMNYTQLLD-YGKQTS---QYNTALFLSHFMODHQPLHVGFEDDEGGNTITLVRWYR
ZeZEN3  IYNYTEQLITGYNASNSVVKYNTALFLSHFAGDVHQPLHVGFEDDEGGNTITLVRWYR

```

```

ZmNUC1 RKANLHHVWDVSIIDTAIKDFYKSMDEWVEALKMNTD-CWSDDVHVWENCKNKHA-TC
HvNUC2 RKSNLHHVWDVVDVIEQAMKDLYGRDQDMIKAIQRNITE-DWSSHEKQWEACRSRTK-TC
HvNUC1 RKSNLHHVWDSVDVITQAMKDFENRDQDMIEAIQRNITD-DWSSHEKQWEACRSRTKITC
StNUC  HKSNLHHVWDREIILTAAKDYAKDYNLLEEDIEGNFTDGHWSDDVNSWKCDC-DIS-NC
HvZEN1  HKSNLHHVWDREIILTAASELYDKDMESLQKAIQANFTHGLWSDDVNSWKCDC-DIS-NC
AtBFN1  HKSNLHHVWDREIILTALKENYDKNLDLQEDLEENITNGLWHDDVSSWTECN-DLI-AC
ZeZEN2  RKAVLHHVWDSIIEETAEERFYGSNVENIDAIETNITN-VWGDQVKAWENCSANQK-TC
ZeZEN3  RKANLHHVWDTDMIESAMKTFYDKDIDIMISAIEKNITD-RMSNDVSSWVNCSTGEE-VC

```

```

ZmNUC1 ANDYAIESIHYSCNWAYKDVEDITLGGDDYFSSRYPIVEKRIAQAGRLAAILNRIFGGG
HvNUC2 ADKYAESAVLACD-AYKGVKODSTLGDYFYSKALPVEKRIAQGGVRLAAILNRIFGG
HvNUC1 AEKYAKESALLACD-AYEGVEGDTLGGDYFYSRALPVEKRIAQGGVRLAAILNRIFGG
StNUC  VNKAAESIINACKWYKGVKAGETLSDDYFNSRLPIVMKRIAQGGVRLAAILNRIFGG-V
HvZEN1  VNKYAKESIALACKWYKGVKAGETLSDDYFDSRLPIVMKRIAQGGVRLAAILNRIFGSS
AtBFN1  PHKYAESIKLACKWYKGVKAGETLSSEYFNRLPIVMKRIAQGGVRLAAILNRIFGSDD
ZeZEN2  PNIYAEKIKAACNWAYKGVKAGVLEDDYFLSRLPIVMKRIAQGGVRLAAILNRIFG--
ZeZEN3  PDPYAESIKYSCNWAYRNATFGSTLGDYFYSRLPIVMKRIAQGGVRLAAILNRIFGPY

```

```

ZmNUC1 EADDIPLQVQ-----
HvNUC2 --KNGKLQSI-----
HvNUC1 --KNSRLQSI-----
StNUC  SQQEDSVGAT-----
HvZEN1 SSLEDAVPT-----
AtBFN1 HAIAGVAAT-----
ZeZEN2 -----
ZeZEN3 PSVSQKWAYPGKYPTCATHYKLDVSSQTSFVN

```



**Figura 17.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de nucleasas vegetales reportadas, comparadas con la de ZmNUC1. Los códigos de acceso de GenBank son los siguientes: ZmNUC1 (AM710418), HvNUC2 (CAC33831), HvNUC1 (BAA82696), StNUC (AAT79582), HvZEN1 (BAA28948), AtBFN1, (H86264), ZeZEN2 (AAD00694), ZeZEN3 (AAD00695).

**Tabla 2.** Porcentajes de identidad y similitud de secuencia de la proteína ZmNUC1 respecto a otras nucleasas pertenecientes a la familia S1/P1 de hongos filamentosos y plantas.

Nombre	Especie	% Ident.	% Sim.
Endonucleasa P1	<i>Penicillium citrinum</i>	31	45
Endonucleasa S1	<i>Aspergillus oryzae</i>	29	46
Nucleasa Bnuc1	<i>Hordeum vulgare</i>	58	74
Nucleasa putativa Bnuc2	<i>Hordeum vulgare</i>	57	74
Endonucleasa BEN1	<i>Hordeum vulgare</i>	56	72
Nucleasa bifun. ZEN3	<i>Zinnia elegans</i>	56	72
Endonucleasa StNUC	<i>Solanum tuberosum</i>	53	70
Endonucleasa ZEN1	<i>Zinnia elegans</i>	52	69
Nucleasa bifun. BFN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51	68

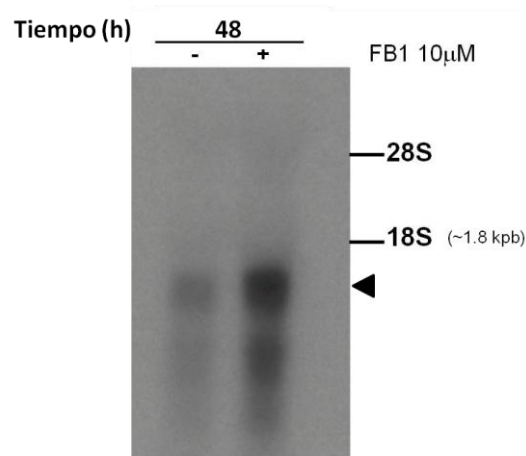
## 7. El patrón de expresión de nucleasas de maíz se modifica en función del tiempo.

A partir del cDNA aislado se generó un fragmento de 457 pb (ZmNU01) que comprendió de la posición 378 a la 834, y que se empleó como sonda para evaluar los niveles de transcrito en ensayos de *Northern blot*.

A partir de RNA total de radículas de semillas de maíz control y tratadas con FB1 (48 h), en el *Northern blot* se detectó una banda (Fig. 18) intensa con una migración electroforética por debajo del RNA ribosomal 18S que en maíz tiene un tamaño aproximado de 1.8 kpb (<http://maizesequence.org/>), por lo que estimamos el tamaño de este transcrito alrededor de 1.4 kpb, lo que es consistente con el tamaño de otras nucleasas vegetales reportadas como Bnuc1 de cebada, 1.4 kpb (Muramoto et al. 1999),



BEN1 de cebada, 1.3 kpb (Aoyagi et al. 1998), ZEN1 de *Zinnia elegans*, 1.3 kpb (Aoyagi et al. 1998) y BFN1 de *Arabidopsis*, 1.2 kpb (Perez-Amador et al. 2000). Además, se observó una banda difusa de menor tamaño e intensidad que podría corresponder a un producto de degradación del transcrito mayor.



**Figura 18.** Northern blot de 20  $\mu\text{g}$  de RNA total de radículas de maíz control y tratadas con FB1 10  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Los transcritos se detectaron con la sonda de cDNA de 457 pb por hibridación a 65  $^{\circ}\text{C}$  como se detalla en Materiales y Métodos. Se indica la migración de los RNAs ribosomales y la flecha señala el transcrito de tamaño comparable al de otras nucleasas.

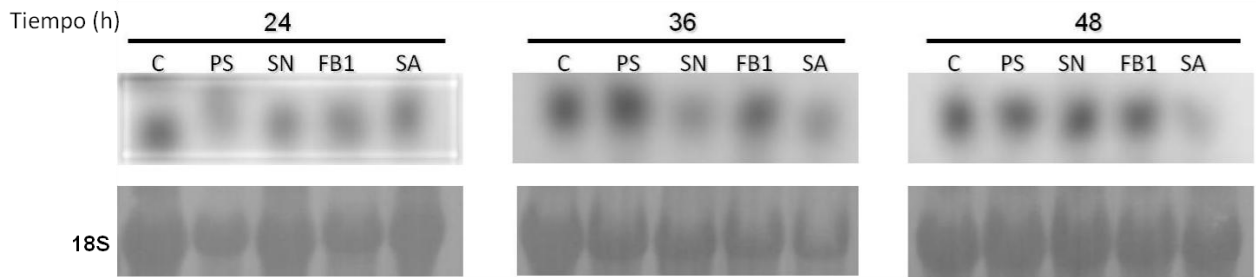
En este experimento preliminar se observó una mayor intensidad de la banda en la muestra correspondiente al tratamiento con FB1, por lo que se diseñaron experimentos para que permitieran evaluar si este patrón se reproducía a tiempos más tempranos así como para determinar si los otros estímulos, como las BCLs y el SA, inducían un incremento en los niveles de este transcrito como previamente se observó que influyen en la actividad de las nucleasas.

Se observó la presencia del transcrito de nucleasa en semillas de maíz entre las 24 y las 48 h de germinación (Fig. 19), sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en función del tratamiento ni del tiempo puesto que se detectó desde las 24 horas con todos los tratamientos, inclusive en los controles, sin que pueda determinarse consistentemente la acumulación o disminución en la cantidad de transcrito como respuesta a alguno de los tratamientos en particular.



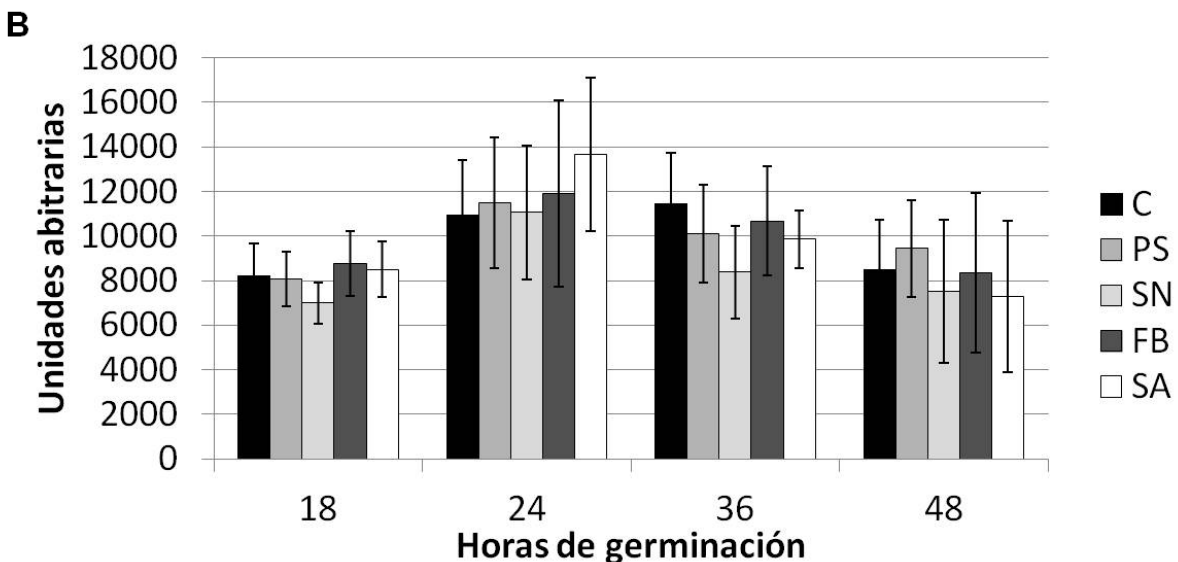
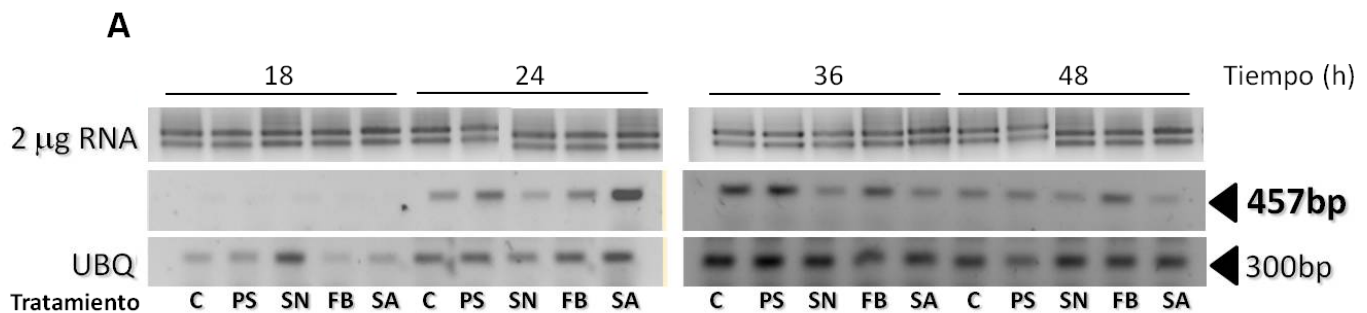


## RESULTADOS



**Figura 19.** Northern blots de 20  $\mu$ g de RNA total de radículas de semillas de maíz control (C) y tratadas con Fitoesfingosina 10 $\mu$ M (PS), Esfinganina 10 $\mu$ M (SN), Fumonisin B1 10 $\mu$ M (FB1) y Ácido salicílico 1 mM (SA) durante 24, 36 y 48 h. Los transcritos se detectaron con la sonda de cDNA de 457 pb por hibridación a 65 °C como se detalla en Materiales y Métodos. En el panel inferior se muestra el RNA ribosomal 18S como control de cargado.

En la búsqueda de un método más sensible para evaluar los niveles de transcrito de nucleasa, se realizaron RT-PCRs semi-cuantitativos mediante la amplificación del fragmento de cDNA empleado como sonda y utilizando el cDNA de ubiquitina (UBQ) como control de cargado y normalización (Fig. 20).





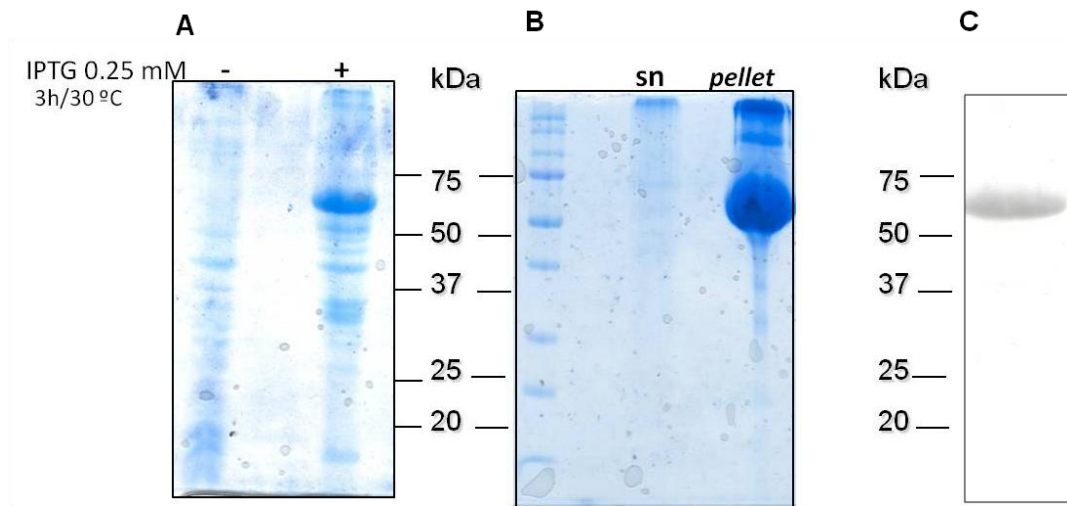
**Figura 20.** RT-PCRs semicuantitativos del transcrito de nucleasa de maíz normalizados con ubiquitina. **A.** En el panel superior, control de carga en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio en los que se corrieron la de 2 $\mu$ g de RNA total de radículas de semillas de maíz sometidas a los diferentes tratamientos (C; PS; SN; FB y SA) durante 18, 24, 36 o 48 h. En el panel intermedio, amplificación del transcrito de 457 pb, correspondiente a la nucleasa de maíz bajo las condiciones ya mencionadas; en el panel inferior, amplificación del transcrito de 300 pb de la ubiquitina (UBQ). Se muestra un experimento representativo de cinco realizados. **B.** Análisis densitométrico (Fluor-S Multimager) de las bandas correspondientes a los transcritos de la nucleasa de maíz normalizados con ubiquitina; n= 5 RT-PCRs independientes. Media +/- SD.

A las 18h de tratamiento no se detectó el transcrito de nucleasa (Fig. 20) y a las 24 h se observó un aparente pico de acumulación, especialmente en respuesta al tratamiento con SA, aunque al normalizar con el transcrito UBQ las diferencias no parecen ser significativas. Algo similar se observó a las 36 h y 48 h, pues no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Debido a que los resultados del análisis de la expresión de las nucleasas de maíz no fueron concluyentes, la siguiente aproximación fue determinar la cantidad de proteína presente en el sistema bajo los diferentes tratamientos, suponiendo que la activación de las nucleasas podría estar controlada a nivel traduccional y no a nivel transcripcional. Para ello, fue necesario producir un anticuerpo específico contra nucleasas.

### **8. La nucleasa codificada por la secuencia AM710418 de GenBank es insoluble en extractos de *Escherichia coli*.**

Para producir el anticuerpo contra nucleasas, se obtuvo la proteína de fusión GST/NUC por sobreexpresión en cultivos de *E. coli* BL21. Puesto que la proteína ZmNUC1 es de un tamaño aproximado de 34 kDa y el tamaño de GST es de 26 kDa, se esperaba obtener una proteína de fusión de aproximadamente 60 kDa (Fig. 21A). Al hacer la lisis celular por sonicación, la proteína de fusión no se detectó en el sobrenadante y se acumuló en la fracción insoluble que corresponde a los cuerpos de inclusión (Fig. 21B), por lo que no se pudo purificar por cromatografía de afinidad como se tenía contemplado. Entonces la pastilla de residuos bacterianos provenientes de la sonicación se disolvió con Triton X-100 (1%) y se sometió a SDS-PAGE desnaturizante. Para corroborar la identidad de la proteína de fusión, se hicieron *Western blots* con un anticuerpo  $\alpha$ -GST que reconoció una sola banda de aproximadamente 60 kDa (Fig. 21C), correspondiente a la proteína recombinante GST/NUC.



**Figura 21.** Obtención de la proteína de fusión GST/NUC. **A.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie en el que se separaron electroforéticamente residuos celulares de *E. coli* BI21 control y suplementados con IPTG. **B.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie en el que se visualizó a la proteína de fusión insoluble, presente únicamente en la pastilla bacteriana, producto de la sonicación. **C.** *Western blot* con el anticuerpo  $\alpha$ -GST (1:5000) que reconoce a la proteína de fusión; exposición 5 min.

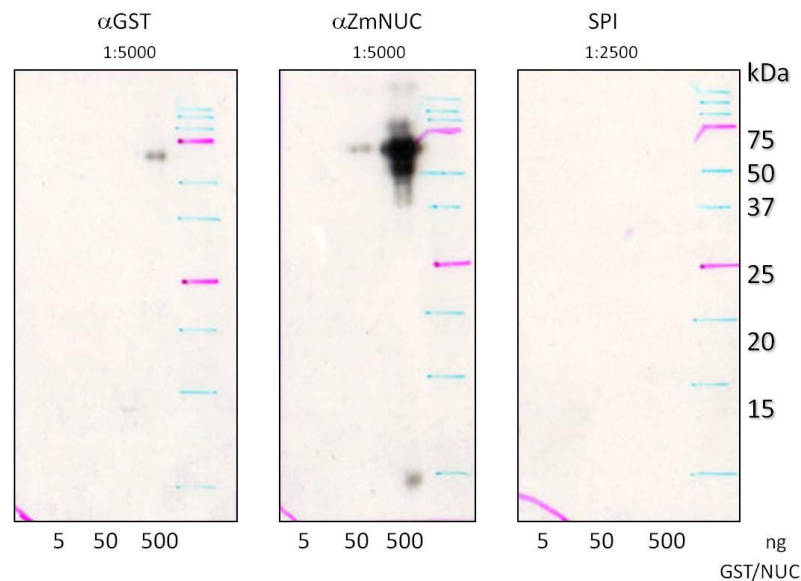
La proteína de fusión parcialmente purificada por electroforesis se conjugó con hemocianina que se empleó como inmunógeno para producir el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC.

#### 9. El anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC reconoce una proteína de aproximadamente 30 kDa en extractos proteicos totales de maíz y *Arabidopsis*.

Las inmunoglobulinas obtenidas del suero inmune se emplearon en ensayos de *Western blot* en experimentos paralelos usando también el anticuerpo  $\alpha$ -GST. Ambos anticuerpos,  $\alpha$ -NUC y  $\alpha$ -GST reconocieron una proteína de aproximadamente 60 kDa cuando se cargaron 50 y 500 ng de proteína total (Fig. 22). El suero pre-inmune (SPI) no presentó reacción con ninguna proteína en el extracto (Fig. 22).



## RESULTADOS



**Figura 22.** Ensayo de reconocimiento de la proteína de fusión GST/NUC con los anticuerpos anti-GST y anti-NUC. Se cargaron en geles de poliacrilamida diluciones seriadas (de 5 a 50ng), de la proteína de fusión GST/NUC, para hacer los *Western blots* se utilizaron los anticuerpos  $\alpha$ -GST (1:5000) y  $\alpha$ -NUC (1:5000), así como el suero preinmune (SPI; 1:2500). El tiempo de exposición fue de 1 min.

Como parte de la validación del anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC se hicieron ensayos de competencia como se detalla en el Anexo II.

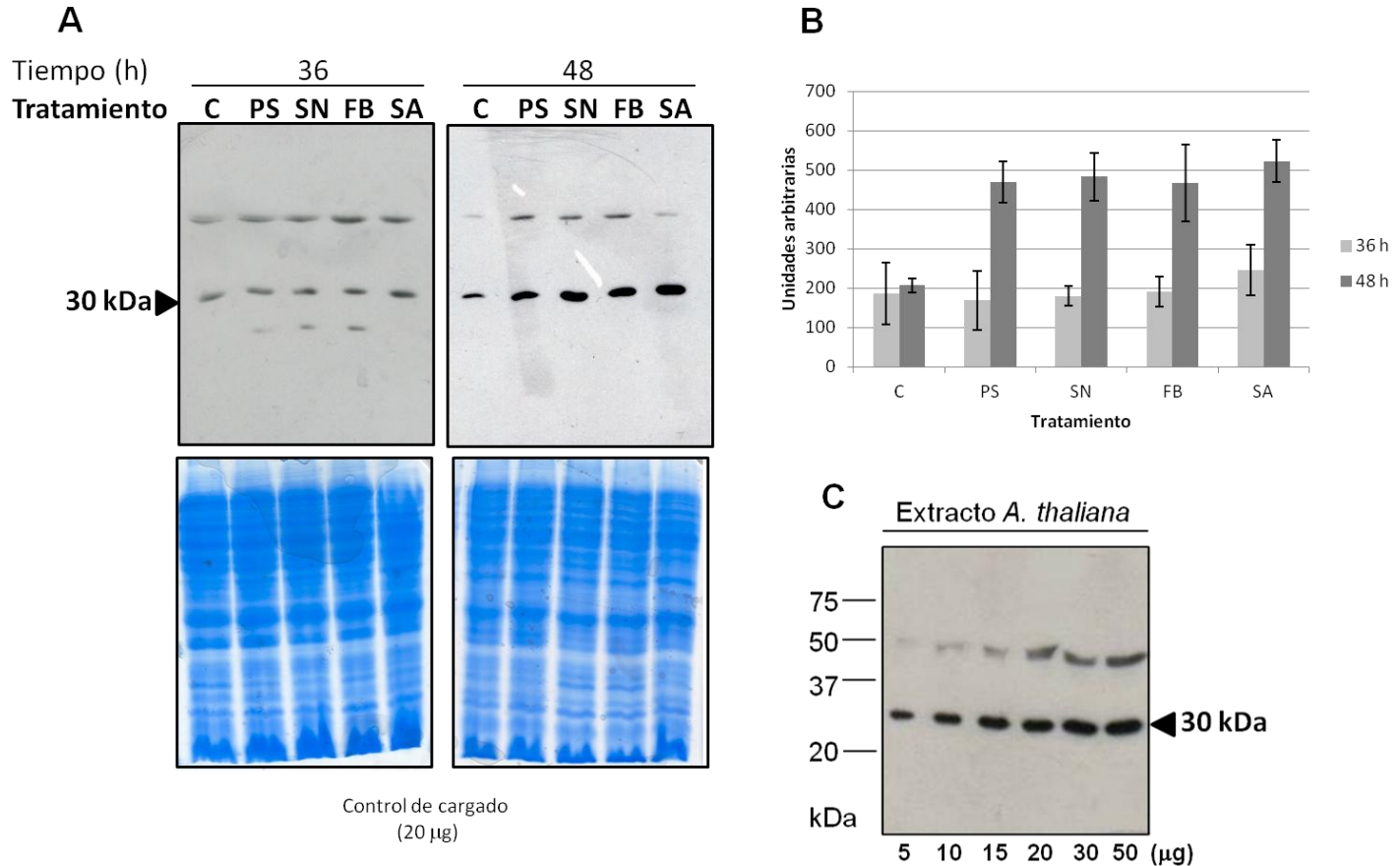
Para analizar los niveles de proteína reconocida por el anticuerpo, teóricamente ZmNUC1, se prepararon *Western blots* de extractos proteicos totales de radículas de maíz correspondientes a los diferentes tratamientos durante 36 y 48 h. El anticuerpo reconoció una proteína de aproximadamente 30 kDa, que puede corresponder a la proteína codificada por el cDNA AM710418 una vez que ha sido procesado el extremo amino pues generaría un polipéptido de 30.9 kDa. Se detectó también una banda de 60 kDa, pero ninguna otra banda que pudiera corresponder a ZmNUC39 (Fig. 23A).

A las 36 h, no se observaron diferencias evidentes en los niveles de proteína entre los distintos tratamientos (Fig. 23A). La imbibición con SA provocó un incremento discreto del 32% en los niveles de la proteína reconocida, pero no fue significativo (Fig. 23B). A las 48 h, el aumento en la cantidad de proteína detectada en respuesta a los tratamientos respecto al control fue más evidente (Fig. 23A), presentándose un incremento del 127.1% con PS, del 133.7% con SN, del 125.8% con FB1 y del 153% con ácido salicílico SA y estas diferencias sí fueron significativas (Fig. 23B).



## RESULTADOS

Dada la similitud de secuencia entre ZmNUC y la nucleasa bifuncional de *Arabidopsis* (BFN1), se probó el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC contra proteínas obtenidas de extracto proteico total de *Arabidopsis*. También en estos extractos el anticuerpo detectó una banda de aprox. 30 kDa (Fig. 23C).



**Figura 23.** Patrón de reconocimiento de la nucleasa de maíz, analizado por *Western blot*. **A.** Se utilizaron 20  $\mu$ g de extracto total y el anticuerpo en una dilución 1:1500. Los tratamientos utilizados fueron: C, control; fitoesfingosina 10  $\mu$ M (PS); esfinganina 10  $\mu$ M (SN); fumonisina B1 10  $\mu$ M (FB); ácido salicílico 1 mM (SA), durante 36 o 48 h. La flecha en el panel superior indica la masa molecular (30 kDa) de la proteína reconocida; en el panel inferior se muestra el control de cargado en geles de poliacrilamida corridos en condiciones desnaturalizantes y teñidos con azul de Coomassie. **B.** Análisis densitométrico (ImageJ) de la banda de 30 kDa reconocida por el anticuerpo; n= 3 *Westerns* independientes. Media +/- SD. **C.** Cantidades crecientes de extracto total de *A. thaliana* (5 a 50  $\mu$ g) corridas en condiciones desnaturalizantes; el anticuerpo se usó a una dilución 1:1500; la flecha indica el tamaño aproximado de la banda de reconocimiento.

### 10. El anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC inmunoprecipita el doblete de actividad previamente identificado.

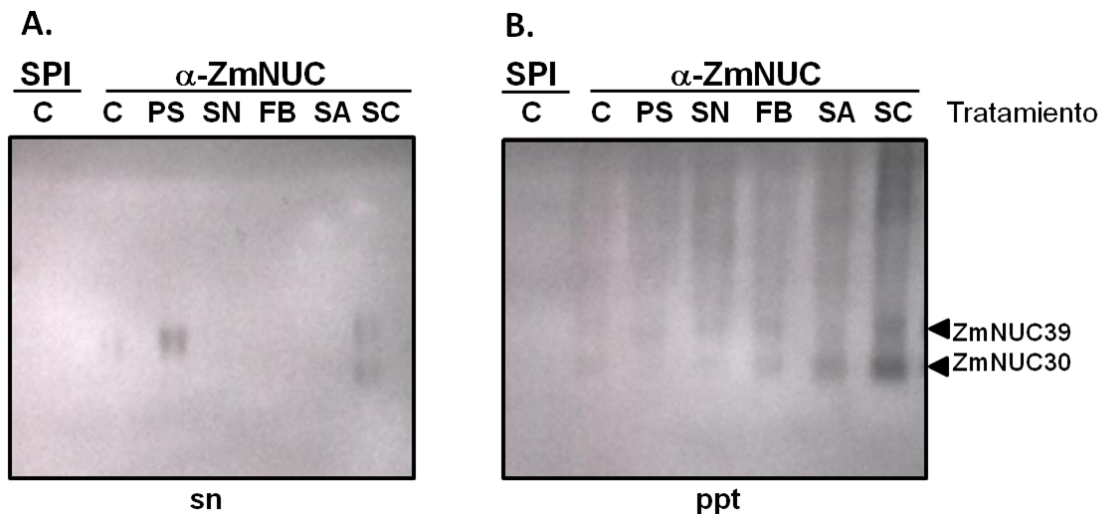
Para aportar mayor evidencia en la demostración de que la proteína reconocida por el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC correspondía a la banda de actividad analizada, se realizaron



## RESULTADOS

inmunoprecipitaciones del extracto proteico total y se evaluó la actividad de nucleasa en los inmunoprecipitados. Como control positivo, se utilizó también el extracto proteico total proveniente de semillas sometidas a estrés salino (SC; NaCl 300 mM durante 48 h) puesto que se ha reportado la activación de nucleasas dependientes de  $Zn^{2+}$  y pertenecientes a la familia S1/P1 en condiciones de este tipo de estrés en cebada (Muramoto et al. 1999).

Después de centrifugar se observó que el sobrenadante (sn) contenía trazas de actividad de nucleasas en dos tratamientos (Fig. 24A). Mientras que los inmunoprecipitados contuvieron el doblete de actividad compuesto por ZmNUC30 y ZmNUC39, como se había observado en extractos proteicos totales de semillas de maíz sometidas a los tratamientos estudiados. La actividad de nucleasa fue más evidente con el tratamiento con SA y el estrés salino (SC) (Fig. 24B). Estos resultados son consistentes con el hecho de que la actividad de nucleasa estudiada en este trabajo (ZmNUC30) corresponde al cDNA aislado y que esta enzima comparte muchas características con las nucleasas bifuncionales.



**Figura 24.** Inmunoprecipitación de nucleasas de maíz con el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC, analizadas en geles de actividad. **A.** Gel de actividad de los sobrenadantes (sn). **B.** Gel de actividad de los inmunoprecipitados (ppt). Los tratamientos utilizados fueron: control, C; fitoesfingosina 10  $\mu$ M, PS; esfinganina 10  $\mu$ M, SN; fumonisina B1 10  $\mu$ M, FB; ácido salicílico 1mM, SA; cloruro de sodio 300 mM, SC; suero preinmune, SPI. Las flechas señalan las actividades correspondientes a ZmNUC39 y ZmNUC30.





## VIII. DISCUSIÓN.

La germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas son estadios del desarrollo en los que el maíz es particularmente susceptible a la infección por *F. verticillioides* y otros patógenos necrótrofos. Dado que el hongo puede sobrevivir en la semilla como endófito o en el suelo, tiene acceso a ésta durante las etapas tempranas del desarrollo (Kedera et al. 1994; Munkvold et al. 1997; Williams et al. 2006). Se ha documentado la correlación positiva que existe entre la producción de FB1 por *F. verticillioides*, y el desarrollo de las lesiones necróticas en las hojas de plántulas de maíz provenientes de semillas infectadas (Williams et al. 2007). Asimismo, se ha observado que la FB1 presente en el suelo causa un decremento en el crecimiento tanto de tallo como de raíces en las plántulas y la adición de FB1 (14  $\mu\text{M}$ ) al agua de riego de las plántulas produce síntomas similares, lo que indica que la toxina es absorbida por las raíces (Williams et al. 2007). La presencia de la FB1 en el suelo y la toma por la planta, causa la elevación en los niveles de bases esfingoideas y de sus derivados 1-fosforilados y esto es evidencia de que la toxina es biológicamente activa (Williams et al. 2006).

Dada la relevancia de la toxina en la patogenicidad de *F. verticillioides*, se eligieron semillas de maíz en germinación como modelo para desarrollar este trabajo que, aunque no fueron infectadas con el hongo, se germinaron en presencia de FB1.

### **La acumulación de BCLs, en respuesta al tratamiento con FB1, produce PCD.**

La actividad inhibitoria que ejerce la FB1 sobre la esfinganina *N*-acil transferasa se ha demostrado en varias especies vegetales susceptibles a su modo de acción como SAM, provocando la acumulación intracelular de BCLs; algunos ejemplos de ello se han documentado en discos de hoja de *Lemna pausicostata* tratados con FB1 1  $\mu\text{M}$ , en los que se observan incrementos en los niveles de esfinganina y fitoesfingosina de 76 y 18 veces, respectivamente (Abbas et al. 1994); en callo de tabaco tratado con FB1 14  $\mu\text{M}$ , el incremento observado es de 7 y 4 veces (Abbas et al. 1994), mientras que en plántulas de *Arabidopsis*, el tratamiento con FB1 5  $\mu\text{M}$  provoca el incremento de 80 y 12 veces, respectivamente (Shi et al. 2007). En maíz, las plántulas regadas con FB1 14  $\mu\text{M}$  mostraron un incremento en los niveles de esfinganina de 6 veces y de fitoesfingosina, de 2.5 veces (Williams et al. 2006).

A través de la adición directa de esfingolípidos e intermediarios metabólicos, se ha demostrado que las moléculas como las ceramidas y las BCLs pueden actuar como



segundos mensajeros en algunas vías de señalización de PCD en plantas. El tratamiento de células en suspensión de *Arabidopsis* con una ceramida C2 (50  $\mu\text{M}$ ), provoca el incremento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , seguido de la producción de EROs y la inducción de PCD (Townley et al. 2005); de igual forma, la aplicación exógena de BCLs (2  $\mu\text{M}$ ) en hojas de *Arabidopsis*, provoca la acumulación localizada de EROs y, finalmente, la muerte celular (Shi et al. 2007). En células de tabaco, se ha reportado la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 2 y 20 min después de la adición de esfinganina (Lachaud et al. 2011) y, en protoplastos de *Arabidopsis*, se observó la acumulación del radical superóxido en el medio 1 h después del tratamiento con FB1 o esfinganina (Saucedo-García et al. 2011b).

Se ha propuesto, como una estrategia de defensa contra patógenos, que la elevación en los niveles intracelulares de BCLs constituye un mecanismo de señalización en la vía de activación de la cascada de MAP cinasas, generación de EROs e inducción de PCD en *Arabidopsis* (Liu et al. 2007; Saucedo-García et al. 2011a). Tanto la esfinganina como la FB1 y MAMPs inducen un patrón de expresión común de genes de defensa y la generación de EROs (Asai et al. 2000; Saucedo-García et al. 2011b; Bindschedler et al. 2006). También ocurre activación de la MPK6 como uno de los eventos iniciales en la señalización que conduce a la PCD (Saucedo-García et al. 2011a). En maíz, una ruta de señalización homóloga podría ocurrir puesto que el incremento en los niveles de SA coinciden con la elevación en EROs (Vlot et al. 2009) y de BCLs (de la Torre-Hernández et al. 2010).

Los hallazgos encontrados respecto al metabolismo alterado de los esfingolípidos en las mutantes de *Arabidopsis* con fenotipo de muerte celular acelerada (*acd*), sugieren que debe existir un balance en los niveles de los diversos intermediarios en su biosíntesis para regular el proceso de muerte celular (Liang et al. 2003). Como se detalló en la introducción, estas mutantes presentan altos niveles de transcrito de genes relacionados con la patogénesis, así como síntesis de fitoalexinas y acumulación de callosa.

Un efecto similar a la vía descrita en *Arabidopsis* se observa en embriones de maíz tratados con FB1, pues hay un incremento en los niveles de fitoesfingosina y esfinganina de hasta 6 veces con respecto al control a las 48 h. Este máximo en la acumulación de BCL coincide temporalmente con la pérdida de electrolitos además de coincidir también con una acentuada degradación del DNA genómico. Estos dos parámetros son considerados marcadores de PCD y han sido utilizados para describir los





efectos de la FB1 en discos de hoja de *L. pausicostata* (Abbas et al. 1998), así como en hojas de tomate (Wang et al. 1996).

### **La actividad de nucleasa como parte de la PCD.**

Las nucleasas son enzimas hidrolíticas que pueden estar confinadas en varios compartimentos celulares y algunas son necesarias para la ejecución de la PCD puesto que se requiere de la total degradación del DNA. Durante la germinación, ocurre la activación de estas enzimas (Mino e Inoue 1989; Sugiyama et al. 2000) y, en la capa de aleurona, las giberelinas inducen su actividad (Domínguez et al. 2004). En embriones de maíz, se ha asociado la fragmentación internucleosomal del DNA con un incremento en la actividad de nucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la fase inicial de la degradación del endospermo (Young et al. 1997). En semillas de cebada, durante la fase II de la germinación, el DNA de las células del endospermo almidonoso es hidrolizado por acción de una nucleasa bifuncional de 36 kDa dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$ , secretada por la capa de aleurona (Brown y Ho 1986; 1987). También se han reportado incrementos en la actividad de nucleasa en trigo, durante el desarrollo del endospermo (Young y Gallie 1999), y en tabaco, como parte de la HR montada contra el ataque de patógenos (Mittler y Lam 1995).

En este trabajo se describieron dos actividades de nucleasa en embriones de maíz con migraciones electroforéticas relativas de 39 y 30 kDa, por lo que fueron nombradas como ZmNUC30 y ZmNUC39, respectivamente. Ambas actividades se detectaron durante la germinación y, mientras que la actividad de ZmNUC39 se indujo moderadamente frente a los tratamientos, la de ZmNUC30 se activó significativamente. Esta activación coincidió temporalmente (48 h) con la pérdida máxima de electrolitos, así como con la mayor degradación del DNA genómico, ambos, parámetros de evaluación de muerte celular.

Una molécula fundamental en la vía de señalización de la muerte celular es el SA, cuya elevación podría estar mediada por la acumulación de BCL durante la germinación de semillas de maíz (de la Torre-Hernández et al. 2010); para dar soporte a esta hipótesis existen evidencias farmacológicas y genéticas en *Arabidopsis*. La FB1 induce, de forma dependiente de la dosis, la expresión del gen PR-1, generalmente dependiente de la cantidad de SA (Stone et al. 2000); a su vez, la expresión de genes de defensa, incluyendo PR-1, se induce en las mutantes en la vía de síntesis de los esfingolípidos *acd5* (Greenberg et al. 2000; Liang et al. 2003), *acd11* (Brodersen et al. 2002; Brodersen et al. 2005), *erh1* (Wang et al. 2008) y *sbh1 sbh2* (Chen et al. 2008); en las tres primeras, se observa acumulación de SA y el fenotipo de muerte celular que presentan puede ser



atenuado, y hasta suprimido, utilizando el transgen *nahG* o a través de las mutaciones *npr1*, *sid2* y *pad4*, alterando la vía de señalización mediada por SA.

Está bien establecido que, tanto los compuestos esfingoideos como el SA, son mediadores importantes en la vía conducente a la muerte celular en plantas y las BCLs podrían formar parte de la señalización río arriba del SA (de la Torre-Hernandez et al. 2010), por lo que era posible que la nucleasa ZmNUC30, involucrada en procesos de PCD, respondiera positivamente al tratamiento con los componentes de esta vía.

### **La nucleasa ZmNUC30 forma parte de la familia de nucleasas S1/P1.**

La dependencia del cofactor es un parámetro que se ha utilizado en la clasificación de las nucleasas vegetales (Sugiyama et al. 2000). Dentro de esta clasificación, un grupo importante corresponde al grupo de nucleasas dependientes de  $Zn^{2+}$  que tienen un pH óptimo en un rango de 5.0 a 6.5 y se localizan en las vacuolas o en el fluido extracelular (Sugiyama et al. 2000), pueden hidrolizar DNA de cadena doble o sencilla, así como RNA (Thelen y Northcote 1989; Uchida et al. 1993), de forma que también se les ha catalogado como bifuncionales (Pérez-Amador et al. 2000).

Nuestro análisis bioquímico mostró que la actividad de ZmNUC30 es dependiente de  $Zn^{2+}$  y tiene un pl aproximado de 5.2. También encontramos múltiples bandas con actividad de RNAsa, entre ellas, dos con migración electroforética similar a las nucleasas ZmNUC30 y ZmNUC39 (Anexo III); sin embargo, con estos datos no es posible afirmar que se puedan tratar de las mismas enzimas.

Las endonucleasas S1, de *Aspergillus oryzae*, y P1, de *Penicillium citrinum*, son el prototipo de la familia de nucleasas denominada S1/P1 pues han sido bien caracterizadas y cristalizadas (Uchida et al. 1993; Iwamatsu et al. 1991). Estas requieren de una triada de iones  $Zn^{2+}$  para ser activas, y varias nucleasas comparten características con ellas y están presentes en gran variedad de organismos.

Al utilizar la secuencia de cDNA AM710418 aislada de RNA total de maíz para hacer una búsqueda en el genoma de maíz, se encontró el gen GRMZM2G112968 cuyos 8 exones corresponden a la secuencia de dicho cDNA (Anexo VI). Esta secuencia presentó un alto porcentaje de identidad, tanto con otras nucleasas vegetales reportadas, como con las nucleasas S1 y P1 fúngicas (Anexo IV; Tabla2).

La función de las nucleasas dependientes de  $Zn^{2+}$  en la muerte celular no está bien definida y se ha propuesto que podrían participar en las etapas finales de la PCD y la



presencia del péptido señal podría contribuir a su direccionamiento hacia la vacuola o al espacio extracelular (Jones 2001; Sugiyama et al. 2000).

### **El patrón de expresión de las nucleasas de maíz varía en función del tiempo.**

La sonda ZmNU01, generada a partir del cDNA aislado, permitió detectar en *Northern blots* la presencia de un transcrito (~1.4 kpb) como respuesta al tratamiento con FB1, cuyo tamaño es consistente con el de otras nucleasas vegetales reportadas, lo que dio pie a la evaluación de las variaciones del patrón de expresión en función del tiempo y del tratamiento tanto con BCLs como con SA. Sin embargo, no fue posible detectar diferencias consistentes en cuanto a la acumulación o disminución en la cantidad de transcrito como respuesta a alguno de los tratamientos en particular. El transcrito se detectó desde las 24 h con todos los tratamientos, incluso en los controles, lo cual se puede explicar debido a que las nucleasas están involucradas activamente en procesos de muerte celular que ocurren durante diferentes fases del desarrollo como la germinación, por lo que su expresión debe darse desde tiempos tempranos.

En *Arabidopsis*, una porción de 2.3 kpb del promotor de la nucleasa BFN1 conduce la actividad de GUS en hojas senescentes, xilema en diferenciación así como en tejidos florales, además de estar activo en otros tejidos como anteras en desarrollo, semillas y órganos florales después de la fertilización (Farage-Barhom et al. 2008). También en *Arabidopsis*, el análisis de microarreglos muestra que el transcrito de AtBFN1 se encuentra en todos los estadios de desarrollo muestreados con un máximo en los estambres y pétalos de las flores ([www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/](http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/)). Asimismo, el gen se induce de manera importante en raíces por estrés osmótico (manitol 300 mM) y salino (NaCl 150 mM). Sin embargo, el tratamiento con SA 10  $\mu$ M no induce este gen (Anexo V). La baja expresión del transcrito de AtBFN1 en respuesta al tratamiento con SA concuerda con los resultados obtenidos para las nucleasas de maíz, aun cuando usamos concentraciones 500 veces mayores.

Con la intención de evidenciar las diferencias discretas que pudieran existir en los niveles de transcrito de las nucleasas de maíz, se analizaron por RT-PCR. Sin embargo, tampoco fue posible detectar diferencias significativas con ninguno de los tratamientos después de hacer la normalización con el transcrito de UBQ. Ante la suposición de que la activación de las nucleasas podría estar controlada a nivel traduccional y no a nivel



transcripcional, generamos un anticuerpo contra esta proteína, que nos permitiera determinar sus niveles.

### **El anticuerpo $\alpha$ -ZMNUC reconoce una proteína de 30 kDa responsiva al tratamiento con FB1, BCLs y SA.**

Usando el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC, se detectó por *Western blot* una banda con movilidad de 30 kDa, que era el tamaño esperado de la secuencia codificada por el cDNA AM710418. No se detectó ninguna banda cuyo peso pudiera corresponder con la actividad de ZmNUC39. Se detectó además una banda de aproximadamente 60 kDa cuyos niveles no variaron con los tratamientos y que, por su tamaño, pudiera corresponder a una nucleasa ácida, dependiente de  $Zn^{2+}$ , como la que se activa en células de semillas de trigo que sufren PCD durante la germinación, y que podría estar involucrada en el desmantelamiento nuclear (Dominguez et al. 2012).

A las 48 h de tratamiento con FB1, BCLs y SA, se detectó un aumento significativo en la cantidad de la proteína inmunorreactiva con el anticuerpo correspondiente (entre 126 y 153%), tiempo en el que previamente se observaron pérdida de electrolitos, degradación del DNA y actividad de nucleasas, en respuesta al tratamiento con FB1. La asociación temporal y en respuesta a los tratamientos muestra que la proteína de 30 kDa, teóricamente ZmNUC1, tiene un patrón de activación similar al observado en otras nucleasas como la bifuncional de *Arabidopsis* (AtBFN1; Pérez-Amador et al. 2000) y OsNuc37, inducida por estrés salino (Jiang et al. 2008).

Dado el alto porcentaje de identidad (51%) entre ZmNUC1 y AtBFN1 (Anexo IV; Tabla2), única nucleasa reportada en este sistema relacionada con la familia S1/P1, es consistente el reconocimiento cruzado que se observó, por lo que este anticuerpo puede ser una herramienta útil para el estudio de nucleasas S1/P1 de plantas.

### **La proteína reconocida por el anticuerpo $\alpha$ -ZmNUC corresponde a la actividad de ZmNUC30.**

Para demostrar que la proteína reconocida por el anticuerpo correspondía a la nucleasa ZmNUC1, se realizaron: 1) un ensayo de competencia usando la proteína recombinante (Anexo II); 2) experimentos de inmunoprecipitación mezclando el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC con extractos proteicos de maíz sometidos a los distintos tratamientos. A partir de estos se detectó el doblete de actividad (ZmNUC39 y ZmNUC30), y donde fue evidente la actividad de ambas nucleasas, especialmente la de ZmNUC30, fue en los



inmunoprecipitados correspondientes a los tratamientos con SA y cloruro de sodio (SC). Este último tratamiento se utilizó como control positivo pues se ha reportado que en esta condición se activan las nucleasas dependientes de  $Zn^{2+}$ , pertenecientes a la familia S1/P1 (Muramoto et al. 1999).

En estos experimentos llama la atención que el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC haya sido capaz de inmunoprecipitar el doblete de actividad siendo que en ningún *Western* se pudo detectar la presencia de una banda inmunoreactiva correspondiente a ZmNUC39. Esto podría explicarse porque el anticuerpo reconoce un epítotope en la estructura nativa de ZmNUC39 cuya arquitectura posiblemente se pierde durante la desnaturalización de la proteína al hacer *Western*. Para probarlo se podría hacer un *Western* en las condiciones en que se determinó la actividad (geles semi-nativos con DNA incluido) y probar si el epítotope que reconoce el anticuerpo queda accesible a éste, pudiendo ser reconocido.

Otra posible explicación sería que se trata de un artefacto provocado por la presencia de DNA en los geles de actividad, así como las condiciones semi-nativas bajo las que fueron corridos, a diferencia de los geles utilizados en los *Westerns* que fueron realizados y corridos en condiciones desnaturalizantes. Podría ser que en realidad no haya una nucleasa de 39 kDa en extractos proteicos totales de maíz, sino que la detección de su actividad se trate de una migración anómala de una fracción de ZmNUC30 que al estar expuesta a su sustrato, lo degrada *in situ*, dando la apariencia de otra banda de actividad. Para comprobarlo, sería necesario hacer *Westerns* a partir de geles con DNA o RNA incluidos, correrlos en condiciones semi-nativas y someterlos al tratamiento habitual al que se someten los geles de actividad, antes de transferirlos y proseguir con el protocolo del *Western*. De encontrarse un doblete reconocido por el anticuerpo, implicaría que la única nucleasa de maíz activa bajo las condiciones estudiadas y perteneciente a la familia S1/P1 es ZmNUC30. Esta consideración estaría apoyada en el hallazgo del gen GRMZM2G112968 cuya secuencia codificante tiene una alta identidad con la del cDNA AM710418, aislado en este trabajo. El resultado del *blast*, con esta secuencia de cDNA sólo resultó en este gen. Esto apoya la hipótesis de que el doblete de actividad observado correspondería a una modificación en el procesamiento post-traducciona de una nucleasa única (ZmNUC30), provocada por el estímulo al que sea sometida. Sin embargo, no se puede descartar que la segunda actividad observada corresponda a una nucleasa cuya secuencia de aminoácidos no está relacionada con ZmNUC30.



### **ZmNUC30 como parte de la señalización de la PCD inducida por FB1, BCLs y SA.**

La producción de FB1 contribuye de manera importante a la virulencia en cepas de *F. verticillioides* y se han identificado varios blancos moleculares de esta toxina que afectan la respuesta de defensa. La FB1 es un inhibidor no competitivo de la ATPasa de protones de membrana plasmática de maíz (Gutiérrez-Nájera et al. 2005) e inhibe selectivamente a ciertas isoformas básicas de  $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz, que son proteínas relacionadas a patogénesis (PRs; Sánchez-Rangel et al., 2012).

Además, la FB1 por su modo de acción como SAM, produce la acumulación de BCLs que desempeñan un papel importante como mediadores de la muerte celular en la respuesta de defensa, lo cual promueve el desarrollo de patógenos necrótrofos (Sánchez-Rangel y Plasencia 2010). Otra consecuencia de la acumulación de BCLs es el incremento en la producción de SA (de la Torre-Hernández et al. 2010) que, a su vez, conduce a la expresión de genes que codifican proteínas PR (Fig. 25).

La vía de señalización del SA es importante para que las plantas desarrollen resistencia contra patógenos biótropos y hemibiótropos (Loake y Grant 2007; Vlot et al. 2009), mientras que las respuestas de defensa dependientes de JA/ET son particularmente efectivas en respuesta a patógenos necrótrofos (Thomma et al. 2001).

El SA aparentemente actúa en conjunto con las EROs en un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la muerte celular programada (Fig. 25), en donde hay un aumento inicial de la cantidad de  $H_2O_2$  en respuesta a la infección por un patógeno, lo cual activa la síntesis de SA que, una vez incrementado, trabaja en conjunto con las EROs generadas en el segundo y sostenido estallido oxidativo, potenciando así la muerte celular y la expresión de genes de defensa. El SA también potencia la producción de  $H_2O_2$ , lo cual activa la síntesis de mayor cantidad de SA y de muerte celular, conformando un ciclo de auto-amplificación (Overmyer et al. 2003).

La producción de EROs, como parte de la respuesta de defensa, tiene un efecto indirecto en la inducción de la transcripción de genes de defensa, sin embargo, su efecto dañino sobre los componentes celulares está limitado por la activación de mecanismos protectores de la integridad celular que permiten la detoxificación de las EROs por acción de enzimas específicas (Hofius et al. 2007; Panstruga et al. 2009), permitiendo la oscilación entre el estallido oxidativo y un estado eminentemente reductor; ambas fases conducen a la activación de moléculas señalizadoras de diferentes vías que se



entrecruzan, definiendo y coordinando la respuesta global (Hofius et al. 2007) que puede desembocar en la resistencia sostenida ante un patógeno, o bien, en el desencadenamiento de un proceso de muerte celular programada (Grant et al. 2000; Hofius et al. 2007; Panstruga et al. 2009; Torres et al. 2006; Fig. 25).

Ante la falta de una evidencia clara y consistente de la activación transcripcional de la nucleasa de maíz estudiada, ZmNUC30, en suma con la evidencia de que se acumula la proteína en respuesta a los tratamientos utilizados, podríamos suponer que, al tratarse de una proteína involucrada en procesos de muerte celular, ya sea en condiciones de estrés o como parte del desarrollo de la célula, estaría sujeta al control traduccional mediado por *IRES* (*Internal Ribosome-Entry Site*; Johannes et al. 1999), como lo están muchas proteínas que desempeñan papeles importantes en procesos que requieren un estricto control de la expresión génica como son la respuesta al estrés abiótico, el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la regulación de la muerte celular (Floris et al. 2009; Gilbert et al. 2007; Holcik y Sonenberg 2005; Liu y Simon 2004; Sun et al. 2011). Se ha visto que entre 3 y 5% de los mensajeros se traducen por esta vía, independiente de *cap* (Johannes et al. 1999), puesto que su región 5' UTR forma complejas estructuras bidimensionales que contienen múltiples sitios de interacción con los componentes de la maquinaria de traducción (Stoneley y Willis 2004). Así, la traducción mediada por *IRES* parece ser una "vía de escape" al decaimiento generalizado de la síntesis de proteínas y permite la traducción de mensajeros específicos, haciendo evidente que se requiere esta traducción selectiva para la decisión del destino celular entre la muerte y la supervivencia (Holcik et al. 2000). Sin embargo, en nuestro sistema de estudio, no podemos asegurar la presencia de *IRES* puesto que no conocemos la región 5' UTR completa de la nucleasa de maíz ZmNUC30.

Además, nuestros resultados sugieren que otra forma de activación de la nucleasa ZmNUC30 podría obedecer a una modificación post-traduccional (Chen et al. 2004) mediada por el cambio oscilante en el estado redox de la célula inducido por acción de la FB1 que provoca la acumulación de BCLs y éstas, a su vez, conducen a la acumulación de SA que es percibido por la célula como una señal que induce el estallido oxidativo, de forma que, al desencadenarse una fase oxidante, se formarían los dos puentes disulfuro en ZmNUC30 que dedujimos que podrían formarse a partir de su secuencia, confiriéndole estabilidad estructural y, probablemente, permitiendo que sea activa (Fig. 25); de esta forma, tendría la capacidad de ejecutar su función enzimática en la última fase de





degradación del DNA, cuando la integridad celular se ha perdido y la enzima, anteriormente confinada al fluido extracelular o a la vacuola, sea liberada en lo que queda del citosol, entrando en contacto con los fragmentos del DNA genómico y conduciendo a la muerte celular, lo que permite que proliferen patógenos necrótrofos como *F. verticillioides* (Fig. 25).

Recapitulando, se sabe que la producción de FB1 contribuye a la virulencia de *F. verticillioides* afectando en diversas formas la respuesta de defensa, una de ellas es su modo de acción como *SAM*, a través del cual produce la acumulación intracelular de BCLs, que desempeñan un papel importante como mediadores de la muerte celular en la respuesta de defensa, además de que su acumulación se asocia con la mayor producción de SA que, por una parte, conduce a la expresión de genes que codifican proteínas PR, permitiendo el montaje de la respuesta de defensa contra patógenos biótrofos; por otra parte, inhibe la vía señalizada por JA/ET, la cual se encarga de la respuesta de defensa contra patógenos necrótrofos y, en otra vertiente más de la vía de señalización mediada por esta fitohormona, actúa conjuntamente con las EROs, estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la muerte celular como parte de la respuesta de hipersensibilidad (HR), lo cual evitaría la progresión de la infección por patógenos biótrofos pero *F. verticillioides*, al ser necrótrofo, se ve beneficiado con el montaje de esta respuesta de defensa.

La elevación en los niveles de SA podría tener un efecto directo en la activación de las nucleasas de maíz, especialmente de ZmNUC30, ya sea a través de la inducción de la acumulación de su transcrito -aunque con las herramientas que utilizamos no nos fue posible demostrarlo-, o bien, podría tener también un efecto a nivel del control de su traducción, puesto que se trata de una proteína cuya actividad enzimática se requiere en los eventos de muerte celular en respuesta a la infección por un patógeno. Su traducción podría verse favorecida durante este proceso a través del mecanismo de iniciación de la traducción independiente de *cap*, mediado por *IRES*, a través del cual se asegura la síntesis de proteínas requeridas en la regulación de la PCD, además de otras proteínas de importancia fisiológica.

El estallido oxidativo en el que participan tanto las EROs como el SA, es percibido por los componentes celulares como una señal de estrés, lo cual tendría efectos a nivel del control traduccional de gran variedad de proteínas involucradas en la respuesta de defensa, dentro de las cuales podrían estar las nucleasas; además, al alterarse el estado



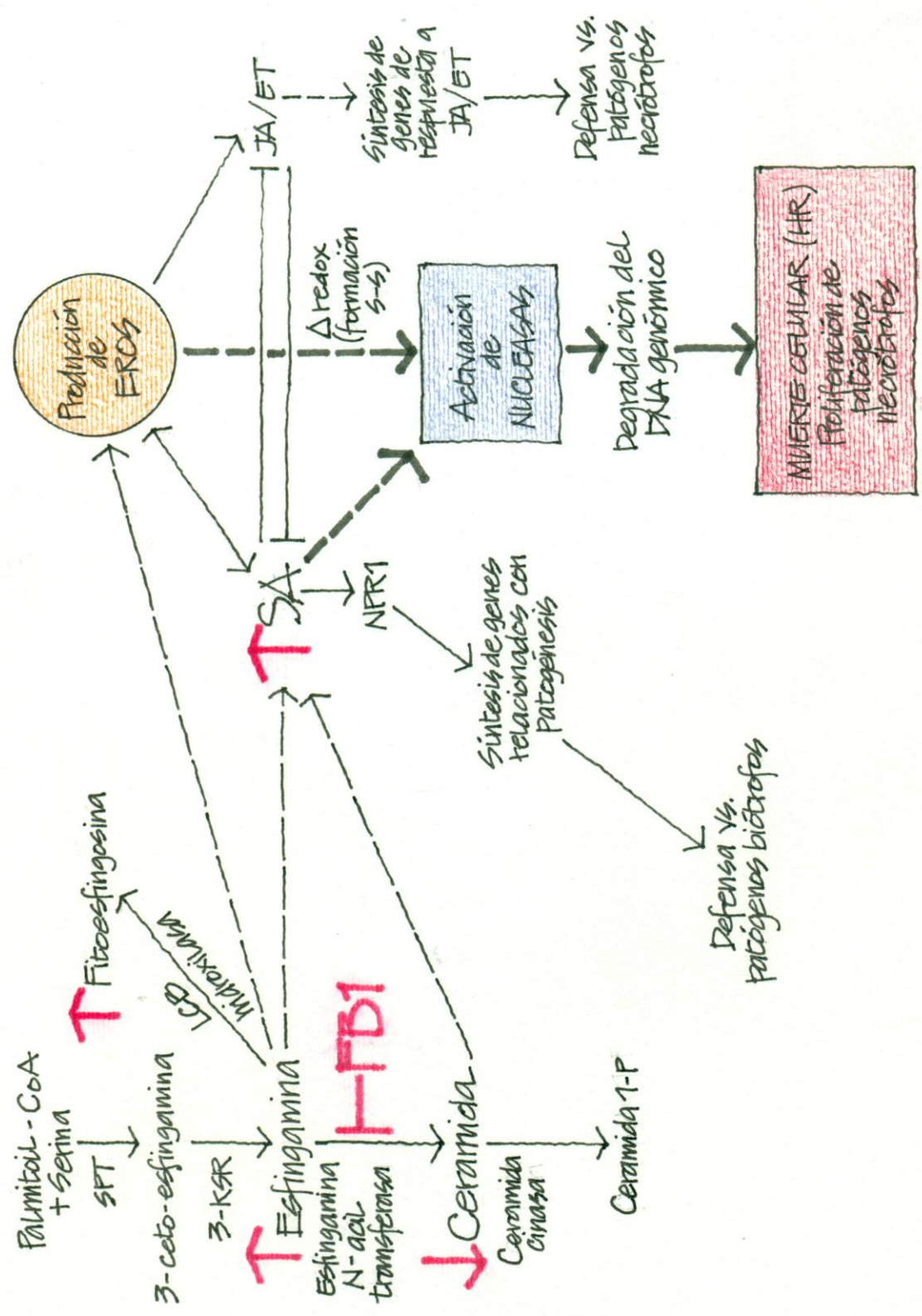
## DISCUSIÓN

redox de la célula, podrían favorecerse modificaciones post-traduccionales como la formación o ruptura de puentes disulfuro, lo cual tendría efecto en la actividad de algunas hidrolasas involucradas en procesos de PCD (Chen et al. 2004).

La caracterización de las nucleasas de maíz que se realizó en este trabajo, permite un mejor entendimiento de las mismas además de ser una aproximación a su forma de acción, abriendo la puerta para posteriores estudios que permitan establecer su localización subcelular, así como el análisis y entendimiento de sus mecanismos de activación.



# DISCUSIÓN





**Figura 25.** Las nucleasas de maíz como parte de la señalización de la PCD inducida por FB1, BCLs y SA. La FB1 inhibe a la enzima esfinganina *N*-acil transferasa, provocando la acumulación de BCLs, que activan, a su vez, la vía del SA, a la cual son responsivas las nucleasas de maíz. Por su parte, la acumulación de SA induce la producción de EROs, que favorece el establecimiento de un estado oxidante, el cual podría mediar la formación de puentes disulfuro dentro de la estructura de las nucleasas, facilitando la degradación del DNA genómico y conduciendo a la muerte celular. La activación de la vía del SA, por otra parte, promueve la síntesis de genes relacionados con la patogénesis, conduciendo al desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad, necesaria como defensa contra patógenos biótropos; además, esta vía antagoniza con la mediada por JA y ET, facilitando la proliferación del necrófito. Las flechas sólidas representan activación, inducción o acumulación de compuestos o transcritos, mientras que la flechas punteadas representan interacciones o efectos hipotéticos. Las enzimas involucradas en la biosíntesis de esfingolípidos se representan junto a la flecha de la reacción que catalizan. SPT: serina palmitoiltransferasa; 3-KSR: 3-cetoesfinganina reductasa; FB1: Fumonisina B1; SA: ácido salicílico; HR: respuesta de hipersensibilidad; EROs: especies reactivas de oxígeno; JA/ ET: vía de señalización mediada por ácido jasmónico y/o etileno.



### IX. CONCLUSIONES.

La acumulación en los niveles de bases esfingoideas de cadena larga, causada por acción de la FB1, activa vías de señalización que conducen a la acumulación de ácido salicílico con la consecuente inducción de esta vía que conduce a la muerte celular. Uno de los blancos de esta vía es la actividad de nucleasas que participan en la degradación del DNA genómico.

- ⊙ El tratamiento con FB1 10  $\mu$ M provoca un incremento del 38% en la permeabilidad membranal en semillas de maíz a las 48 h de tratamiento, así como la degradación del DNA genómico y la inducción de la actividad de nucleasa.
- ⊙ Se detectaron dos bandas de actividad de nucleasa en maíz, de 30 y 39 kDa, que se inducen por el tratamiento con FB1, BCLs y SA.
- ⊙ La actividad de nucleasa de 30 kDa incremento entre 40 y 105% a las 48 h con los tratamientos utilizados, correlacionando temporalmente con los marcadores de muerte celular previamente identificados.
- ⊙ La nucleasa de 30 kDa es activa en presencia de  $Zn^{2+}$  y tiene un pI de 5.2, calculado en geles de actividad.
- ⊙ La secuencia EST de maíz a partir de la cual se obtuvo el cDNA correspondiente, tiene altos porcentajes de identidad con otras nucleasas vegetales reportadas: 86% con la nucleasa bifuncional de arroz, 58 y 56% con Bnuc1 y BEN1 de cebada, así como 51% con BFN1 de *Arabidopsis*.
- ⊙ No se pudo establecer de manera robusta un patrón de activación transcripcional con los estímulos estudiados pero sí se registró un aumento en la cantidad de proteína detectada por el anticuerpo que varió entre 127% y 153%.
- ⊙ En el complejo inmunoprecipitado por el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC se detectó un doblete (30 y 39 kDa) con actividad de nucleasa.



## X. PERSPECTIVAS.

Sería útil e interesante continuar con la caracterización de la actividad de nucleasa S1/P1 en maíz, inicialmente, para poder definir con claridad si se trata de dos proteínas, o bien, como puede intuirse a partir de la presencia de un gen único en el genoma, se trate de una sola proteína que sufre un procesamiento post-traducciona diferencial en respuesta al estímulo al que sea sometida. Para ello, sería necesario hacer *Westerns* en condiciones semi-nativas con DNA o RNA incluidos, someterlos al tratamiento habitual que se les da a los geles de actividad antes de transferirlos y proseguir con el protocolo habitual, con la intención de localizar con el anticuerpo específico que generamos ( $\alpha$ -ZmNUC) algún epítoto correspondiente a la banda de ZmNUC39 que, bajo condiciones desnaturizantes, podría no ser accesible. De no localizar una segunda banda de proteína, quedaría claro que se trata de una proteína única (ZmNUC30) con una actividad diferencial. Por técnicas de secuenciación, como MALDI-TOF, se podrá identificar las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC para determinar su identidad y poder responder si efectivamente corresponden al cDNA aislado.



## XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Abbas, H.K., Tanaka, T., Duke, S.O., Porter, J.K., Wray, E.M., Hodges, L., Sessions, A.E., Wang, E., Merrill, A.H. Jr., Riley, R. Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.* (1994); 106: 1085–93.
- Abbas, H.K., Duke, S.O., Merrill, Jr. A.H., Wang, E., Shier, W.T. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and fumonisin B1 to *Lemna paucicostata*. *Phytochemistry.* (1998); 47: 1509–14.
- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., Martin, G.B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2006); 7:601–11.
- Anand, A., Schmelz, E.A., Muthukrishnan, S. Development of a lesion-mimic phenotype in a transgenic wheat line overexpressing genes for pathogenesis-related (PR) proteins is dependent on salicylic acid concentration. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (2003); 16: 916-25.
- Aoyagi, S., Sugiyama, M., Fukuda, H. BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett.* (1998); 429: 134–8.
- Arias SL, Theumer MG, Mary VS, Rubinstein HR. Fumonisin: Probable role as effectors in the complex interaction of susceptible and resistant maize hybrids and *Fusarium verticillioides*. *J. Agr. Food Chem.* (2012); 60: 5667-75.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., Ausubel, F.M. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell.* (2000); 12: 1823–36.
- Ausubel, F.M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nat. Immunol.* (2005); 6:973–979.
- Bacon, C.W., Marijanovic, D.R., Norred, W.P., Hinton, D.M. Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1989); 55: 2745-48.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P., Leslie, J.F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* (1996); 62: 4039-43.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Persp.* (2001); 109: 325-332.
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., Cahagnier, B. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J. Agric.Food Chem.* (2002); 50: 728-31.
- Barlow, P.W. Cell death-An integral part of plant development. In *Growth Regulators in Plant Senescence*, M.B. Jackson, B. Grout, and I.A. Mackenzie, eds (Wantage, UK: British Plant Growth Regulator Group). (1982). 27-45.
- Bartók T, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A, Bartók M 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.* (2006); 20: 2447-62.
- Becker, C., Shutov, A.D., Nong, V.H., Jung, R., Horstmann, C., Fischer, J., Nielsen, N.C., Müntz, K. Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B, and asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. *Eur. J. Biochem.* (1995); 228: 456-62.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., Gross, D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1999); 63: 266–92.
- Berkey, R., Bengigeri, D., Xiao, S. Sphingolipids and plant defense/disease: the “death” connection and beyond. *Front. Plant Sci.* (2012); 3: 1-5.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trens Plant Sci.* (2008); 13: 145-50.
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* (1997); 9:1055-66.
- Bewley, J.D., Black, M. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Press, USA. 1994.





- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* is required for pathogen resistance. *Plant J.* (2006); 47: 851-63.
- Bleecker, A.B., Patterson, S.E. Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* (1997); 9, 1169-79.
- Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* (1995); 5: 21–6.
- Bove, J., Jullien, M., Grappin, P. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol. Rev.* (2001); 3: 1002.1-1002.5.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H.M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jørgensen, L.B., Brown, R.E., Mundy, J. Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* (2002); 16: 490–502.
- Brodersen, P., Malinovsky, F.G., Hematy, K., Newman, M.A., Mundy, J. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis* *acd11*. *Plant Physiol.* (2005); 138:1037–45.
- Bromley, P.E., Li, Y.O., Murphy, S.M., Lynch, D.V. Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* (2003); 417: 219–26.
- Brown, P.H., Ho, T.H.D. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid: purification and partial characterization of the associated ribonuclease, desoxyribonuclease, and 3'-nucleotidase activities. *Plant Physiol.* (1986); 82: 801-6.
- Brown, P.H., Ho, T.H.D. Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease. *Eur. J. Biochem.* (1987); 168: 357-64.
- Butchko, R.A., Plattner, R.D., Proctor, R.H. FUM13 encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *J. Agric. Food Chem.* (2003); 51: 3000-3006.
- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abian, J., San Segundo, B. The defense response in germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics.* (2004); 4: 383-396
- Cascacuberta, J.M., Puigdoménech, P., San Segundo, B. 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.* (1991); 16: 527-36.
- Casacuberta, J.M., Raventós, D., Puigdoménech, P., San Segundo, B. Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol. Gen. Genet.* (1992); 234: 97-104.
- Chen, Z., Iyer, S., Caplan, A., Klessig, D.F., Fan, B. Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* (1997); 114: 193-201.
- Chen Z, Ling J., Gallie D.R. RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state *Plant Mol. Biol.* (2004); 55: 83-96.
- Chen, F., Bradford, K.J. Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* (2000); 124: 1265-74.
- Chen, F., Nonogaki, H., Bradford, K.J. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *J. Exp. Bot.* (2002); 53: 215-23.
- Chen, Z., Ling, J., Gallie, D.R. RNase activity requires formation of disulfide bonds and is regulated by the redox state. *Plant Mol. Biol.* (2004); 55: 83-96.
- Chen, M., Markham, J.E., Dietrich, C.R., Jaworski, J.G., Cahoon, E.B. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* (2008); 20: 1862-78.
- Chen, M., Cahoon, E.B., Saucedo-García, M., Plasencia, J., Gavilanes-Ruiz, M. Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. In Wada, H., Murata, N., eds. *Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions.* (2009). Dordrecht, the Netherlands Springer; 77-115.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* (2006);124:803–14.



- Clarke, S.M., Mur, L.A.J., Wood, J.E., Scott, J.M. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (2004); 38: 432-47.
- Coffeen, W.C., Wolpert, T.J. Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell.* (2004); 16: 857-73.
- Comai, L., Harada, J.J. Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*(1990); 87: 2671-4.
- Coursol, S., Fan, L.M., LeStunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., Assman, S.M. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature.* (2003); 423: 651-4.
- Crowe, L.M., Crowe, J.H. Hydration-dependent hexagonal phase lipid in a biological membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* (1982); 217: 582-7.
- Dangl, J.L., Jones, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* (2001); 411:826-33.
- Danial, N.N. Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell.* (2004); 116: 205-19.
- de la Torre-Hernandez, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernandez, N., Cruz-Ortega, R., Plasencia, J. Fumonisin B1 induces nuclease activation and SA accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* (2010); 74: 337-334.
- Dellaporta, S.L., Calderon-Urrea, A. The sex determination process in maize. *Science.* (1994). 266: 1501-5.
- Derek, J., Black, M. Seeds biology of development and germination. 2<sup>nd</sup> edition, Plenum Press. USA, 1994.
- Desai, N.A., Shankar, V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* (2003); 26: 457-91.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelson, P.E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* (1994); 60: 1695-7.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelson, T.C., Leslie, J.F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* (1995); 61: 79-86.
- Desjardins, A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society. 2006.
- de Wit, P.J.G.M. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol. Life Sci.* (2007); 64: 2726-32.
- Dickson, R.C., Lester, R.L. Yeast sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta.* (1999a); 1426: 347-57.
- Dickson, R.C., Lester, R.L. Metabolism and selected functions of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* (1999b); 1438: 305-21.
- Dobrosotskaya, I.Y., Seegmiller, A.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Rawson, R.B. Regulation of SREBP processing and membrane lipid production by phospholipids in *Drosophila*. *Science.* (2002); 296: 879-83.
- Doehlert, D.C., Knutson, C.C., Vesonder, R.F. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia.* (1994); 127: 117-21.
- Domínguez, F., Moreno, J., Cejudo, F. J. The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development. *Planta.* (2001); 213:352-60.
- Dominguez, F., Moreno, J., Cejudo, F.J. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J. Biol. Chem.* (2004); 279: 11530-6.
- Domínguez, F., Cejudo, F.J. Identification of a nuclear localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells. *Biochem. J.* (2006); 397: 529-36.
- Dommes, J., Van de Walle, C. Polysome formation and incorporation of new ribosomes into polysomes during germination of the embryonic axis of maize. *Physiol. Plant.* (1990); 79: 289-96.
- Dong, X. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2004); 7: 547-52.
- Draper, J. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci.* (1997); 2: 162-5.



- Drew, M.C., He, C.J., Morgan, P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci.* (2000); 5:123–7.
- Duncan, K.E., Howard, R.J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (2010); 23: 6-16.
- Durrant, W.E., Dong, X. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* (2004); 42: 185–209.
- Elmore, J.M., Coaker, G. The role of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant.* (2011); 4:416-27.
- Eulgem, T. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* (2005); 10: 71-8.
- Eulgem, T., Somssich, I.E. Networks WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2007); 10: 366-71.
- Evans, D.E. Aerenchyma formation. *New Phytol.* (2004); 161:35–49.
- Farage-Barhom, S., Burd, S., Sonogo, L., Perl-treves, R., Lers, A. Expression analysis of the *BFN1* nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *J. Exp. Bot.* (2008); 59: 3247-58.
- Farage-Barhom, S., Burd, S., Sonogo, L., Mett, A., Belausov, E., Gidoni, D., Lers, A. Localization of the *Arabidopsis* Senescence- and cell death-associated BFN1 nuclease: from the ER to fragmented nuclei. *Mol. Plant.* (2011); 4: 1062-73.
- Fath, A., Bethke, P.C., Jones, R.L. Barley aleurone cell death is not apoptotic: characterization of nuclease activities and DNA degradation. *Plant J.* (1999); 20:305–15.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., Jones, R. Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol. Biol.* (2000); 44: 255-66.
- Fath, A., Bethke, P., Beligni, V., Jones, R. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J. Exp. Bot.* (2002); 53: 1273–82.
- Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., Menand, B. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* (2009); 10: 3168-85.
- Foyer, C.H., Noctor, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* (2005); 17: 1866-75.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., Dong, X. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature.* (2012); 486: 228-32.
- Fukuda, H. Tracheary element differentiation. *Plant Cell.* (1997); 9, 1147-56.
- Fukuda, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* (2000); 44: 245-53.
- Gable, K., Han, G., Monaghan, E., Bacikova, D., Natarajan, M., Williams, R., Dunn, T.M. 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.* (2002); 277: 10194–200.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (2006); 19: 711–24.
- Glenn, A.E., Zitomer, N.C., Zimeri, A.M., Williams, L.D., Riley, R.T., Proctor, R.H. 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.* (2008); 21: 87–97.
- Gilbert, W.V., Zhou, K., Butler, T.K., Doudna, J.A. Cap-independent translation is required for starvation-induced differentiation in yeast. *Science.* (2007); 317: 1224-27.
- Gilchrist, D.G. Mycotoxins reveal connections between plants and animals in apoptosis and ceramide signalling. *Cell Death Differ.* (1997); 4: 689–98.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., et al. Benzotriazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell.* (1996); 8: 629-43.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* (2000); 23: 441–50.



- Greenberg, J.T. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1996); 93, 12094-7.
- Greenberg, J.T. Programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1997); 48:525–45.
- Greenberg, J.T., Silverman, F.P. Liang, H. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics.* (2000); 156:341-50.
- Greenberg, J.T., Yao, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* (2004); 6:201-11.
- Greenberg, J.T. Degrade or die: a dual function for autophagy in the plant immune response. *Dev. Cell.* (2005); 8: 799-801.
- 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<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 221: 589–596.
- Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Matsubara, H., Akazawa, T. Suborganellar localization of proteinase catalyzing the limited hydrolysis of pumpkin globulin. *Plant Physiol.* (1982); 70: 699-703.
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M. Vacuolar processing enzyme responsible for maturation of seed proteins. *J. Plant Physiol.* (1995); 145: 6412-17.
- Hara-Nishimura, I., Kinoshita, T., Hiraiwa, N., Nishimura, M. Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *J. Plant Physiol.* (1998); 152: 668-74.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. Vacuolar processing enzyme: an executor of cell death. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2005); 8: 404–408.
- Harlow, E., Lane, D. *Antibodies: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. USA.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis.* (2006); 11: 905–11.
- He, R., Drury, G. E., Rotari, V. I., Gordon, A., Willer, M., Tabasum, F., Woltering, E. J., and Gallois, P. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* (2008); 283: 774–83.
- Hilling, I., Leipelt, M., Ott, C., Zahringer, U., Warnecke, D., Heinz, E. Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* (2003); 553: 365-69.
- Hiraiwa, N., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme is self-catalytically activated by sequential removal of the C-terminal and N-terminal propeptides. *FEBS Lett.* (1999); 447: 213–6.
- Hoeberichts, F.A., Have, A.E., Woltering, E.J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta.* (2003); 217: 517–22.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D.G., Mundy, J. Inducible cell death in plant immunity. *Semin. Cancer Biol.* (2007); 17: 166–187.
- Holcik, M., Sonenberg, N., Korneluk, R.G. Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet.* (2000); 16: 469-73.
- Holcik, M., Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2005); 6: 318-27.
- Holdsworth, M.J., Finch-Sabage, W.E., Grapping, P., Job, D. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci.* (2008); 13: 7-13.
- Hwang, S.H., Lee, I.A., Yie, S.W., Wang, D.J. Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta.* (2008); 227: 1141-50.
- Ito, J., Fukuda, H. ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell.* (2002); 14: 3201–11.
- Iwamatsu, A. Aoyama, H., Dibó, G., Tsunasawa, S., Sakiyama, F. Amino acid sequence of nuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem* (1991); 100: 151-8.
- Jiang, A., Cheng, Y., Li, J., Zhang, W. A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cells of rice. *J. Plant Physiol.* (2008); 165: 1134-41.
- Jones, A.M. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol.* (2001); 125: 94-7.





- Jones, J.D., Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature*. (2006); 444:323–9.
- Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B., Mullineaux, P.M. Light perception in plant disease defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2003); 6: 390-6.
- Kedera, C.J., Leslie, J.F., Claflin, L.E. Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology*. (1994); 84: 603-7.
- Kesarwani, M., Yoo, J., Dong, X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* (2007); 144: 336-46.
- Kiesselbach, T.A. The structure and reproduction of corn. 50<sup>th</sup> Anniversary edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1999. USA.
- Kim, K.C., Lai, Z., Fan, B., Chen, Z. *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *Plant Cell*. (2008); 0: 2357-71.
- Klessig, D.F., Malamy, J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* (1994); 26: 1439-58.
- Kogel, K.H., Beckhove, U., Dreschers, J., Münch, S., Rommé, Y. Acquired resistance in barley: the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* (1994); 106: 1269-77.
- Koo, Y.J., Kim, M.A., Kim, E.H., Song, J.T., Jung, C., et al. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* (2007); 64: 1-15.
- Kucera, B., Cohn, M.A., Lubner-Metzger, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* (2005); 15: 281-307.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* (2005); 280: 32914–20.
- Huffman, J., Gerber, R., Liangcheng, D. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*. (2010); 93: 764-76.
- Lachaud C., Da Silva D., Amelot N., Beziat C., Briere C., Cotelle V., Graziana A., Grat S., Mazars C., Thuleau P. Dihydrospingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of HO production. *Mol. Plant*. (2011); 4, 310–8.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (1970); 227: 680-5.
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*. (2001); 411:848–53.
- Lam, E. Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2004); 5:305-15.
- Lam, E. Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends Cell Biol.* (2005); 15: 124–7.
- Lam, E., Zhang, Y. Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends Plant Sci.* (2012); 17: 487-94.
- Lamb, C., Dixon, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1997); 48: 251–75.
- Lamprecht, S.C., Marasas, W.F.O., Alberts, F.J., Cawood, M.E., Gelderblom, W.C.A., Shepard, G.S., Thiel, P.G., Calitz, F.J. Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology*. (1994); 84: 383-91.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., et al. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* (1998); 16: 223-33.
- Lee, B.R., Kitamoto, K., Yamada, O., Kumagai, C. Cloning characterization and overproduction of nuclease S1 gene (*nucS*) from *Aspergillus oryzae*. *App. Microbiol. Biotech.* (1995); 425-31.
- Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium Laboratory Manual*. First Edition. Blackwell Publishing. (2006). USA.
- Leubner-Metzger, G. Functions and regulation of  $\beta$ -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci. Res.* (2003); 13: 17-34.



- Liang, H., Yao, N., Song, J.T., Luo, S., Lu, H., Greenberg, J.T. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.* (2003); 17: 2636–41.
- Lieberherr, D., Thao, N.P., Nakashima, A., Umemura, K., Kawasaki, T., Shimamoto, K. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol.* (2005); 138: 1644-52.
- Lim, P.O., Woo, H.R., Nam, H.G. Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* (2003); 8: 272-8.
- Liu, L., Simon, M.C. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Canc. Biol. Ther.* (2004); 3: 492-7.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W., Zhang, S. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* (2007); 51: 941-54.
- Loake, G., Grant, M. Salicylic acid in plant defense-the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant. Biol.* (2007); 10: 466-72.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C., Roby, D. Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* (2003); 8: 263–71.
- Love, A.J., Milner, J.J., Sadanandom, A. Tuning is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends Plant Sci.* (2008); 13: 589-95.
- Makandar, R., Essig, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N., Shah, J. Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (2006); 19: 123-29.
- Mao, C., Saba, J.D., Obeid, L.M. The dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatases of *Saccharomyces cerevisiae* are important regulators of cell proliferation and heat stress responses. *Biochem. J.* (1999); 342: 667–75.
- Marín, S.V., Sanchis-Vinas, I., Canela, R., Magan, N. 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.* (1995); 21: 298–301.
- Martilla, S., Jones, B.L., Mikkonen, A. Differential localization of two acid proteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiologia Plantarum.* (1995); 93: 317-27.
- Mateo, A., Mühlenbock, P., Resterúcci, C., Chang, C.C.C., Miszalski, Z. et al. *Lesion simulating disease 1* is required for acclimatation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* (2004); 136: 2818-30.
- Matsumoto, T, Wu, J., Kanamori, H., Katayose, Y., Fujisawa, M., et al. The map-based sequence of the rice genome. International rice genome sequencing project (IRGSP). *Nature.* (2005); 436: 793-800.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., He, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell.* (2006); 126: 969–80.
- Merril, A.H. Jr., Sullards, M.C., Wang, E., Voss, K.A., Riley, R.T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* (2001); 109: 283-9.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgy, M., Dietz, K.J. Salicylic acid alleviates cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* (2003); 132: 272-81.
- Mino, M., Inoue, M. DNA synthesis and nuclease activity during germination of a heterotic F1 hybrid of maize. *Can. J. Bot.* (1989); 67: 73-5.
- Misas-Villamil, J., van der Hoorn, R. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr. Plant Biol.* (2008); 11: 380-8.
- Mishina, T.E., Zeier, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* (2007); 50:500-13.
- Mittler, R., Lam, E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell.* (1995); 7: 1951–62.
- Mittler, R., Lam, E. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol. Biol.* (1997); 34: 209–21.
- Mobius, N., Hertweck, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr. Opin. Plant. Biol.* (2009); 12: 390-8.



- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., et al. Introduced resistance responses in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (1998); 11: 643-58.
- Morris, K., Mackerness, S.A.H., Page, T., John, C.F., Murphy, A.M. et al. Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* (2000); 23: 677-85.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell.* (2003); 113: 935-44.
- Munkvold, G.P., McGee, D.C., Cariton, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology.* (1997); 87: 209-17.
- Müntz, K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in the developing and germinating dicotyledonous seeds. *J. Exp. Bot.* (1996); 47: 605-22.
- Müntz, K., Belozersky, M., Dunaevsky, Y., Schlereth, A. y Tiedemann, J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J. Exp. Bot.* (2001); 52: 1741-52.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* (2008); 59: 501-20.
- Muradow, A., Petrasovits, L., Davidson, A., Scott, K.J. A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. *Plant Mol. Biol.* (1993); 23: 439-42.
- Muramoto, Y., Watanabe, A., Nakamura, T., Takabe, T. Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene.* (1999); 234:315-21.
- Murillo, I., Cavallarin, L., San Segundo, B. The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell.* (1997); 9: 145-56.
- Murillo, I., Cavallarin, L., San Segundo, B. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology.* (1999); 89: 737-47.
- Murillo, I., Jaeck, E., Cordero, M.J., San Segundo, B. Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection. *Plant Mol. Biol.* (2001); 45: 145-58.
- Nascimento, V., Campos, F., Cortez, A., Baggio, D., Palma, A., Hiroko, R., Correa, B. 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.* (2006); 52: 798-804.
- Nelson, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* (1992); 117: 29-36.
- Ng, C.K., Hetherington, A.M. Sphingolipid-mediated signalling in plants. *Ann. Bot.* (2001); 88: 957-65.
- Norman, C., Howell, K.A., Millar, A.H., Whelan, J.M., Day, D.A. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* (2004); 134:492-501.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. (2004). *Immunol. Rev.* 198: 249-266.
- Ohyanagi, H., Tanaka, T., Sakai, H., Shigemoto, Y., Yamaguchi, K., Habara, T., Fujii, Y., Antonio, B.A., Nagamura, Y., Imanishi, T., Ikeo, K., Itoh, T., Gojobori, T., Sasaki, T. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information. *Nucl. Acids Res.* (2006); 34: supp:1:D741-4.
- Oliver, R.P. Solomon, P.S. Recent fungal diseases of crop plants: is lateral gene transfer a common theme? *Mol. Plant-Microbe Interact.* (2008); 21: 287-93.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., Sharon, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* (2003); 69: 1695-1701.
- Overmyer, K., Brosche, M., Kangasjarvi, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* (2003); 8: 335-42.
- Panstruga, R., Parker, J.E., Schulze-Lefert, P. SnapShot: Plant immune response pathways. *Cell.* (2009); 136: 978-978.e2.
- Pennell, R.I., Lamb, C. Programmed cell death in plants. *Plant Cell.* (1997); 9:1157-68.
- Pérez-Amador, M.A., Abler, M.L., Rocher, E.J.D., Thompson, D.M., van Hoof, A., LeBrasseur, N.D., Lers, A., Green, P.J. Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* (2000); 122:169-79.





- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Meth.* (2011); 8: 785-6.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol.* (2010); 36:221-31.
- Pieterse, C.M., Van Loon, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* (2004); 7: 456-64.
- Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busaman, M., Butchko, R. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J. Agric. Food Chem.* (2006); 54: 2424–30.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D.C., Merrill, A.H. Jr. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J. Lipid Res.* (2008); 49: 1621-39.
- Rabie, C.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Lübben, A., Vleggaar, R. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* (1982); 43: 517-21.
- Rajou, L., Belgahzi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., et al. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol.* (2006); 141: 910-23.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., Greenberg, J.T. The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses and cell growth. *Plant Cell.* (1999); 11: 1695-708.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismer, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* (2002); 68: 2101-5.
- Ren, C.W., Kermodé, A.R. An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol.* (2000); 124: 231-42.
- Reymond, P., Farmer, E.E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* (1998); 1: 404–11.
- Riley, R.T., Enongene, E., Voss, K.A., Norred, W.P., Meredith, F.I., Sharma, R.P., Spitsbergen, J., Williams, D.E., Carlson, D.B., Merrill, A.H. Jr. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* (2001); 109: 301-8.
- Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exper. Botany* (2011); 62: 3321-38.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R., Després, C. The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell.* (2006); 18: 3670-85.
- Rogers, H.J. Cell death and organ development in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* (2005); 71:225-61.
- Saba, J.D., Nara, F., Bielawska, A., Garrett, S., Hannun, Y.A. The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J. Biol. Chem.* (1997); 272: 26087–90.
- Salon, C., Raymond, P., Padret, A. Quantification of carbon fluxes through tricarboxylic acid cycle in early germinating lettuce embryos. *J. Biol. Chem.* (1988); 263: 12278-87.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., Plasencia, J. 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.* (2005); 53: 8565-71.
- Sánchez-Rangel, D., Plasencia, J. The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev.* (2010); 29: 73-86.
- Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize  $\beta$ -1,3glucanase activities involved in defense response. *Planta.* (2012); 235:965-78.
- Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J.E., Lozano-Rosas, G. Dietrich, C.R., Ramos-Vega, M., Cahoon, E.B., Gavilanes-



- Ruiz, M. MPK6, sphinganine and LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytol.* (2011a); 191: 943-57.
- Saucedo-García, M., González-Solís, A., Rodríguez-Mejía, P., Olivera-Flores, T.J., Vázquez-Santana, S., Cahoo, E.B., Gavilanes-Ruiz, M. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Sign. Behav.* (2011b); 6: 1616-19.
- Schaller, A., Oecking, C. Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell.* (1999); 11: 263-72.
- Schweizer, P., Schlagenhauf, E., Schaffrath, U., Dudler, R. Different patterns of host genes induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *Eur. J. Plant. Pathol.* (1999); 105: 659-65.
- Senyuk, V.I., Rotary, V., Becker, C., Zakharov, A., Horstmann, C., Müntz, K., Vaintraub, I.A. Does an asparaginyl-specific endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? *Eur. J. Biochem.* (1998); 258: 546-58.
- Seo, J.A., Proctor, R.H., Plattner, R.D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* (2001); 34: 155-65.
- Shi, L., Bielawski, J., Mu, J., Dong, H., Teng, C., Zhang, J., Yang, X., Tomishige, N., Hanada, K., Hannun, Y.A., Zuo, J. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res.* (2007); 17: 1030-40.
- Shutov, A.D., Vaintraub, I.A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry.* (1987); 26: 1557-66.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.P., et al. Salicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation, and possible role. *Plant Physiol.* (1995); 108: 633-39.
- Sitrit, Y., Hadfield, K.A., Bennett, A.B., Bradford, K.J., Downie, A.B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol.* (1999); 121: 419-28.
- Song, J.T., Lu, H., Greenberg, J.T. Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, ABERRANT GROWTH AND DEATH2 and AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1, encoding novel aminotransferases. *Plant Cell.* (2004); 16:353-66.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S., Heinz, E. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol. Biochem.* (2005); 43: 1031-38.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., Pieterse, C.M. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* (2003); 15: 760–70.
- Spoel, S.H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N.W., Genschik, P., Dong, X., Proteasome-mediated turnover of the transcription co-activator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell.* (2009); 137: 860-72.
- Stacey, G., McAlvin, C.B., Kim, S.Y., Olivares, J., Soto, M.J. Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lottus japonicas* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* (2006); 141: 1473-81.
- Stein, J.C., Hansen, G.. Mannose induces an endonucleasa responsible for DNA laddering in plant cells. *Plant Physiol.* (1999); 121: 71–9.
- Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T., Ausubel, F.M. Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell.* (2000); 12: 1811-22.
- Stoneley, M., Willis, A.E. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene.* (2004); 23: 3200-7.
- Sugiyama, M., Ito, J., Aoyagi, S., Fukuda, H. Endonucleases. *Plant Mol. Biol.* (2000); 44: 387–97.
- Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H., Shimamoto, K. The heterotrimeric G protein subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002); 99: 13307-12.
- Sun, J., Conn, C.S., Han, Y., Yeung, V., Qian, S.B. PI3K-mTORC1 attenuates stress response by inhibiting cap-independent Hsp70 translation. *J. Biol. Chem.* (2011); 286: 6791-6800.



- Tada, Y., Spoel, S.H., Pagerowska-Muhktar, K., Mou, Z., Song, J. et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*. (2008); 321: 952-56.
- Tamura K, Mitsuhashi N, Hara-Nishimura I, Imai H. Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol*. (2001); 42: 1274–81.
- Thelen, M.P., Northcote, D.H. Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L—a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta*. (1989); 179: 181–95.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol*. (2001); 13: 63–8.
- Torres, M.A., Jones, J.D., Dangl, J.L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*. (2006); 141: 373–8.
- Townley, H.E., McDonald, K., Jenkins, G.I., Knight, M.R., Leaver, C.J. Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol. Chem*. (2005); 386: 161-6.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., Katagiri, F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J*. (2008); 53:763-75.
- Uchida, H., Wu, Y.D., Takadera, M., Miyashita, S., Nomura, A. Purification and some properties of plant endonuclease from scallion bulbs. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. (1993); 57: 2139-43.
- Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M., Koga, J. Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol*. (2000); 41: 676-83.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell*. (2000); 6: 961–7.
- Vallélian-Bindschedler, L., Métraux, J.P., Schweizer, P. Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Mol. Plant-Microbe Interact*. (1998); 11: 702-5.
- Van Asch, M.A.J., Rijkenberg, F.H.J., Coutinho, T.A. Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin, and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology*. (1992); 82:1330-2.
- van Doorn, W.G., Woltering, E.J. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci*. (2005); 10: 117-22.
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J. Higgins, V.J., Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens (activation of host-plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation). *Plant Physiol*. (1994); 104: 209-15.
- Verberne, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J., Linthorst, H.J.M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol*. (2000); 18: 779-83.
- Vlot, A.C., D'Maris, A.D., Klessig, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol*. (2009); 47: 177-206.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C.W., Riley, R.T., Merrill, A.H. Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J.Biol. Chem*. (1991); 266: 14486-90.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., Gilchrist, D.G. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*. (1996); 8: 375–91.
- Wang, W., Yang, X., Tangchaiburana, S., Ndeh, R., Markham, J.E., Tsegaye, Y., et al. An inositolphosphoric acid ceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. (2008); 20: 3163-79.
- Watanabe, N., Lam, E. Two *Arabidopsis* metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J. Biol. Chem*. (2005); 280: 14691–9.
- White, D.G. Plagas y enfermedades del maíz. American Phytopathological Society. Ediciones Mundi-Prensa. México (2004)
- Williams, L.D., Glenn, A.E., Bacon, C.W., Smith, M.A., Riley, R.T. Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J. Agric. Food Chem*. (2006); 54: 5694-700.



## BIBLIOGRAFIA

- Williams, L.D., Glenn, A.E., Zimeri, A.M., Bacon, C.W., Smith, M.A., Riley, R.T. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium*. *J. Agric. Food Chem.* (2007); 55: 2937-46.
- Woltering, E.J. Death proteases: alive and kicking. *Trends Plant Sci.* (2010); 16: 186-8.
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* (1984); 142: 67-77.
- Yang, Y., Qi, M., Mei, C. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well biotic and abiotic stress. *Plant J.* (2004); 40: 909-19.
- Yen, Y. Green, Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* (1991); 1487-93.
- Yeung, E.C., and Meinke, D.W. Embryogenesis in angiosperms: Development of the suspensor. *Plant Cell.* (1993); 5: 1371-81.
- Young, T.E., Gallie, D.R., DeMason, D.A. Ethylene mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunken2* genotypes. *Plant Physiol.* (1997); 115: 737-51.
- Young, T.E., Gallie, D.R. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol. Biol.* (1999); 39: 915-26.
- Young, T.E., Gallie, D.R. Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* (2000); 44:283-301.
- Zaina, G., Morassutti, C., De Amicis, F., Fogher, C., Marchetti, S. Endonuclease genes up-regulated in tissues undergoing programmed cell death are expressed during male gametogenesis in barley. *Gene.* (2003); 315: 43-50.
- Zipfel, C., Felix, G. Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* (2005); 8:353-60.
- Zitomer, N.C., Jose, S., Bacon, C., Glenn Ae., Baldwin, T., Riley, R.T. 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.* (2010); 58: 7446-81.
- Zlatnova, J.S., Ivanov, P.V., Stoilov, L.M., Chimshirova, K.V., Stanchev, B.S. DNA repair precedes replicative synthesis during early germination of maize. *Plant Mol. Biol.* (1987); 10: 139-44.



## XII. ANEXOS.

### ANEXO I. Técnicas de Biología Molecular.

#### A. Extracción de RNA.

Todo el material utilizado durante la extracción y manejo del RNA se esterilizó durante 2 horas, los reactivos se prepararon con H<sub>2</sub>O tratada previamente con DEPC y se trabajó permanentemente con guantes y en condiciones de esterilidad (con mechero).

1. Colocar en morteros, previamente congelados, las radículas de semillas tratadas, agregar nitrógeno líquido y moler hasta obtener un polvo fino.
2. Transferir el polvo a un tubo eppendorf, adicionar 1 mL de TRIzol (Invitrogen 15596-018) y 10 $\mu$ L de DEPC para homogenizar la muestra.
3. Incubar 2.5 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 200  $\mu$ L de cloroformo; agitar vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugar a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf limpio; repetir la extracción con cloroformo y la centrifugación.
7. Recuperar la fase acuosa resultante en un tubo limpio, agregar 500  $\mu$ L de isopropanol a -20°C; incubar durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C.
8. Eliminar el sobrenadante por decantación y lavar el botón con 1 mL de etanol al 70% (preparado con agua tratada con DEPC) a -20°C, agitar por inversión durante 15 seg o hasta resuspenderlo.
9. Centrifugar a 6,400 rpm durante 15 min a 4°C; eliminar el sobrenadante por decantación dejando el tubo abierto en posición invertida 2 min.
10. Resuspender el RNA en 150 $\mu$ L H<sub>2</sub>O tratada con DEPC y almacenar a -70°C.

#### B. Obtención de cDNA por transcripción reversa (RT).

1. Hacer la mezcla de reacción que se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción para producir cDNA por transcripción reversa.

REACTIVO	CANTIDAD
RNA total	2 µg
<i>Buffer ImProm-II 5X</i>	4 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	1.8 µL
<b>dNTPs 10mM</b>	0.75 µL
<b>Transcriptasa reversa ImProm-II</b>	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O / DEPC</b>	cbp 15 µL

2. Calentar la mezcla de RNA, cebadores y H<sub>2</sub>O / DEPC a 70°C durante 5 min.
3. Enfriar en hielo durante 10 min y centrifugar durante unos segundos para recolectar el vapor de las paredes y la tapa del tubo.
4. Agregar la mezcla de reacción a cada tubo, mezclar bien
5. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min para hacer el alineamiento.
6. Incubar a 38°C durante 1 h para sintetizar el DNA; subir la temperatura a 70°C durante 15 min para inactivar a la enzima.
7. Mantener el cDNA en hielo para hacer el PCR.

### C. Amplificación del cDNA.

1. Preparar la mezcla de reacción detallada en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Mezcla de reacción para RT-PCR.

REACTIVO	CANTIDAD
cDNA	2 µL
Cebador <i>Fwd</i> ZmNU01 5 µM	1 µL
Cebador <i>Rev</i> ZmNU01 5 µM	1 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	2 µL
<b>dNTPs 10mM</b>	1.25 µL
<b>Amortiguador 10 X</b>	2.5 µL
<b>Taq Polimerasa</b>	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	cbp 25 µL

2. Hacer el PCR bajo las siguientes condiciones:

3 min / 94°C	} 35 ciclos
1 min / 94°C	
1 min / 65°C	
1 min / 72°C	
7 min / 72°C	





3. Visualizar el producto de la amplificación en geles de agarosa al 1.5% (p/v) corridos a 75V durante 1.5 h en amortiguador TAE (Tris 40 mM, Acetato 20mM, EDTA 2 mM) y teñidos con bromuro de etidio (0.25 mg/mL).
4. La purificación del producto de PCR se realizó con GENE CLEAN, bajo las recomendaciones del fabricante.

La secuencia de los cebadores utilizados tanto para producir el fragmento de 457 pb (ZmNU01) como para producir el fragmento de 1044 pb, se enlista en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencia de los cebadores utilizados.

<b>CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>Fwd ZmNU01 (457)</b>	5' - AACAACTACACGGACCAGCTC - 3'
<b>Rev ZmNU01 (457)</b>	5' - CTCCACAATCGGGTACCTACT - 3'
<b>Fwd ZmNUC + BamHI (1044)</b>	5' - GGATCCGAGCGTCAGCAGAGAGACATG - 3'
<b>Rev ZmNUC + SmaI (1044)</b>	5' - CCCGGGAATTCATGCCAATTTATTGAC - 3'

#### D. Clonación de fragmentos obtenidos por RT-PCR.

1. Preparar la mezcla de reacción detallada en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para ligaciones.

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>Productos de amplificación</b> (457 o 1044 pb)	Aprox. 150 ng
<b>Rapid ligation buffer 5X</b>	2 $\mu$ L
<b>pGEM-T Easy Vector</b> (Promega)	50 ng
<b>T4 DNA ligase</b>	3 U
<b>H<sub>2</sub>O</b>	cbp 10 $\mu$ L

2. Mantener 1 h a temperatura ambiente; almacenar a -20°C.
3. Transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes con 5 $\mu$ l de cada una de las ligaciones.
4. Extraer los plásmidos correspondientes por el método de *miniprep*.





5. Secuenciar en un secuenciador automático (*Abi Prism*, modelo 3100, versión 3.7, basecaller-3100SR.bcp, BC 1.3.0.0).
6. Para extraer el inserto de 457 pb (ZmNU01), digerir con la enzima *EcoRI*; para extraer el inserto de 1044 pb, digerir con las enzimas *BamHI* y *SmaI*.

#### E. Preparación de la sonda radiactiva ZmNU.

1. Hacer la mezcla de reacción detallada en la Tabla 7. Kit *Megaprime* (Amersham).

**Tabla 7.** Mezcla de reacción para marcaje de la sonda radiactiva.

REACTIVO	CANTIDAD
Inserto ZmNU01	25 ng
Mezcla de cebadores con BSA	5 $\mu\text{L}$
Mezcla de marcaje	10 $\mu\text{L}$
<sup>32</sup> P-alfa-dCTP	5 $\mu\text{L}$ (50 $\mu\text{Ci}$ )
DNA Pol I <i>Klenow</i> ,	2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	30 $\mu\text{L}$

2. Hervir el H<sub>2</sub>O, el inserto purificado y la mezcla de cebadores con BSA durante 5 min; enfriar en hielo.
3. Agregar la mezcla de marcaje, la marca radiactiva y la enzima; mezclar suavemente por inversión y centrifugar durante 10 seg.
4. Incubar a 37°C durante 30 min.
5. Remover la marca radiactiva que no se incorporó a la sonda con una microcolumna de fibra de vidrio siliconizada.

#### F. Northern blot.

1. Preparar las muestras de RNA total como se detalla en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Preparación de muestras de RNA para Northern blot.

REACTIVO	CANTIDAD
RNA	20 $\mu\text{g}$
DMSO	50 %
MOPS	1 X
Glioxal	1 M
H <sub>2</sub> O	45 $\mu\text{L}$

2. Incubar a 50°C durante 1 h; enfriar en hielo.



3. Adicionar 6  $\mu$ L de amortiguador de carga (glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0.4%) a cada muestra.
4. Cargar en un gel de agarosa al 1.2% (en MOPS 10X) adicionado con bromuro de etidio. Correr a 100V durante 4.5 horas en el cuarto frío.
5. Lavar el gel con H<sub>2</sub>O-DEPC para eliminar el bromuro de etidio
6. Transferir el RNA a una membrana de nylon previamente hidratada con H<sub>2</sub>O/DEPC. Utilizar SSC 20X como amortiguador de transferencia.
7. Dejar transfiriendo durante la noche; desmontar el dispositivo de transferencia, lavar la membrana con SSC 2X / 5 min; dejarla secar al aire sobre papel filtro.
8. El RNA se fijó en un horno de luz ultravioleta con 2 ciclos “*optimal crosslink*”.
9. Para prehibridar la membrana, ponerla dentro de un tubo de hibridación con 10 mL de amortiguador de hibridación (NaHPO<sub>4</sub> 0.5 M, pH 7.0, SDS 7%, EDTA 0.25 Mm), incubar en el horno de hibridación con agitación constante a 65°C durante 1 h.
10. Para la hibridación, eliminar la solución de prehibridación la membrana y reemplazarla por solución nueva.
11. Hervir la membrana durante 5 minutos y enfriar en hielo.
12. Agregar la sonda al amortiguador de hibridación; sellar el tubo e incubar en el horno de hibridación a 65°C durante 18 h.
13. Al terminar la hibridación, recuperar la solución radiactiva y lavar la membrana en condiciones de menor a mayor astringencia.
14. Exponer la membrana a una película fotográfica entre 48 y 72 horas en un casete con pantalla intensificadora a-70°C.
15. Revelar por medios tradicionales.

#### **G. RT-PCRs semicuantitativos.**

1. Extraer RNA total.
2. Preparar el cDNA correspondiente a partir de 2 $\mu$ g de cada RNA total, utilizando los cebadores ZmNU01 Fwd y Rev (Tabla 4). Control de amplificación: ubiquitina (UBQ; 300 pb).
3. Hacer la mezcla de reacción para los PCRs de los cDNAs obtenidos como se detalla en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Mezcla de reacción para RT-PCRs semicuantitativos.

REACTIVO	CANTIDAD
cDNA	1 $\mu$ L
Cebador <i>Fwd</i> ZmNU01	0.4 $\mu$ L
Cebador <i>Rev</i> ZmNU01	0.4 $\mu$ L
Cebador <i>Fwd</i> UBQ	1.5 $\mu$ L
Cebador <i>Rev</i> UBQ	1.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.6 $\mu$ L
dNTPs 10mM	1 $\mu$ L
Amortiguador 10 X	2 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	cbp 20 $\mu$ L

4. Hacer el PCR bajo las siguientes condiciones:

**3 min / 94°C**  
**1 min / 94°C**  
**1 min / 58°C**  
**1 min / 72°C**  
**7 min / 72°C**

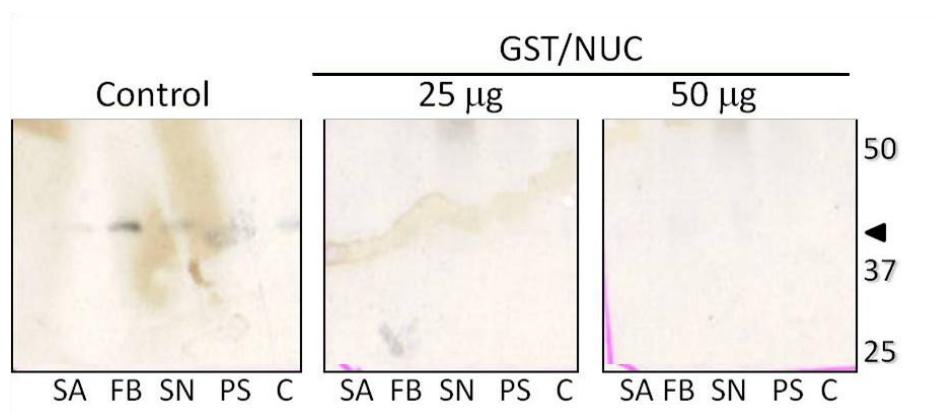
} **25 ciclos**

5. Visualizar los productos en geles de agarosa al 1.2% (p/v) y corridos a 75V durante 1 hora 15 minutos en amortiguador TAE para posteriormente ser teñidos y analizados en el Fluor-S Multilmager (Bio-Rad).



## ANEXO II. Ensayo de competencia.

Los resultados obtenidos con *Western blot* habían sido consistentes con el hecho de que el anticuerpo  $\alpha$ -ZmNUC era capaz de reconocer de manera específica nucleasas relacionadas con la familia S1/P1, sin embargo no había evidencia directa que lo demostrara, por lo que fue necesario hacer ensayos de competencia en los que se incubó el anticuerpo con dos diferentes cantidades de la proteína recombinante GST/NUC, promoviendo su unión; posteriormente estos conjugados fueron utilizados como 1er anticuerpo en *Western blots* de extractos proteicos de maíz bajo los tratamientos previamente establecidos (Fig. All). En el control se observó el patrón de reconocimiento previamente documentado, mientras que la unión de GST/NUC con el anticuerpo evitó que éste reconociera la proteína de 30 kDa observada con anterioridad tanto en extractos de maíz como en extractos de *A. thaliana*, ofreciendo una evidencia más de que la proteína reconocida por  $\alpha$ -ZmNUC pudiera ser ZmNUC30.



**Figura All.** Ensayo de competencia de la proteína de fusión GST/NUC con las nucleasas relacionadas con la familia S1/P1 presentes en extractos proteicos de maíz. Se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína total de cada tratamiento (C: control; PS, fitoesfingosina 10  $\mu$ M; SN, esfinganina 10  $\mu$ M, FB, fumonisina B1 10  $\mu$ M; SA, ácido salicílico 1mM). En el panel Control, el 1er anticuerpo fue  $\alpha$ -ZmNUC en una dilución 1:1000; en los otros dos paneles se utilizó como 1er anticuerpo la mezcla de 25 o 50  $\mu$ g de la proteína de fusión NUC/GST con  $\alpha$ -ZmNUC 1:1000. En el margen derecho de la imagen se señala la migración relativa de los marcadores de peso molecular; la flecha indica la posición de la banda reconocida por el anticuerpo, aproximadamente 30 kDa, sólo observable en el control.



### ANEXO III. Actividades de RNAsa en extractos proteicos de maíz.

Para conocer el patrón de actividad de las nucleasas con actividad de RNAsa en extractos proteicos de radículas de semillas de maíz, se analizaron las siguientes condiciones: embriones secos, control sin tratamiento, fitoesfingosina 10 $\mu$ M, esfinganina 10 $\mu$ M y ácido salicílico 1mM durante 48 h, así como NaCl 300mM durante 36 y 48 h y hojas tanto jóvenes como senescentes sin tratamiento (Fig. A.II). Se probaron extractos provenientes de semillas bajo estrés salino y plantas maduras y senescentes puesto que se ha reportado la activación de nucleasas bifuncionales, pertenecientes a la familia S1/P1, bajo estas condiciones (Muramoto et al. 1999; Perez-Amador et al. 2000; Yen y Green 1991).

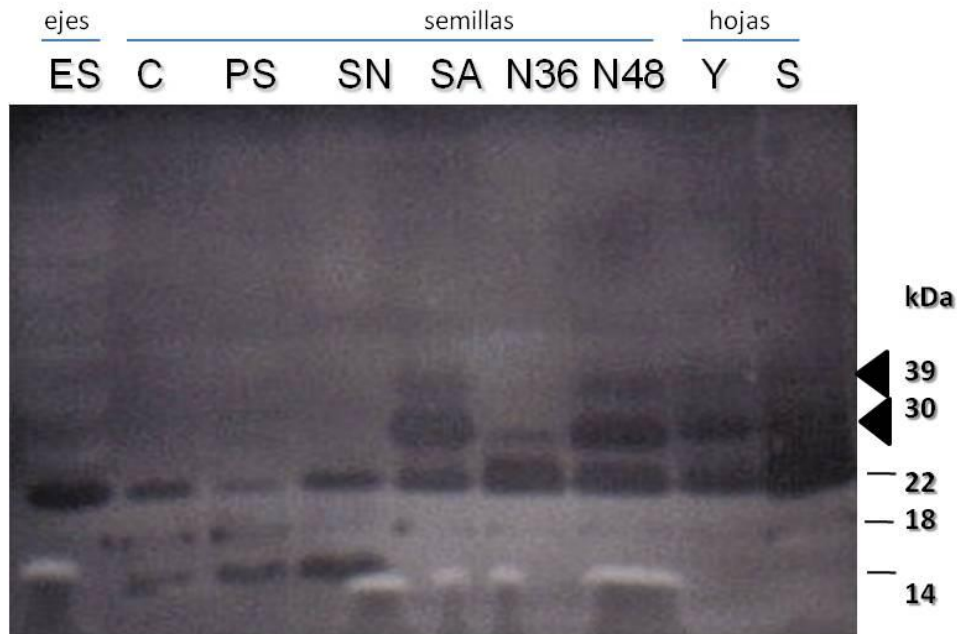
Para hacer los geles de actividad de RNAsa fue necesario neutralizar RNA de *Torulopsis utilis* (Sigma R-6625) con el siguiente protocolo:

1. Disolver 0.1g de RNA de *Torulopsis utilis* en 0.4 mL H<sub>2</sub>O desionizada adicionando NH<sub>4</sub>OH por goteo.
2. Precipitar el RNA adicionando 0.1 mL acetato de amonio 10 M y 0.5 mL isopropanol.
3. Centrifugar y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el RNA en 0.3 mL H<sub>2</sub>O desionizada.
5. Repetir la precipitación y la resuspensión dos veces.
6. Adicionar lentamente cloruro de litio 8 M frío hasta que se forme un precipitado que permanezca presente aún después de agitar (0.4 a 0.5 mL).
7. Centrifugar inmediatamente durante 10 min a 2500 rpm.
8. Resuspender el precipitado en 0.4 ml H<sub>2</sub>O desionizada.
9. Adicionar 0.3 mL de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitar manualmente durante 5 min.
10. Centrifugar a 4000 rpm por 10 min. Repetir la extracción dos veces más.
11. Precipitar el RNA adicionando 0.1 mL acetato de amonio 10M y 0.5 mL isopropanol.
12. Mezclar y centrifugar a 4000 rpm por 10 min.
13. Resuspender el botón en 0.4 mL H<sub>2</sub>O desionizada. Repetir la precipitación.
14. Lavar el precipitado secuencialmente con etanol 95% y metanol al 100%.



15. Dejar secar y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se hicieron geles de actividad en los que se incluyeron  $275\ \mu\text{g}$  de RNA neutralizado ( $55\ \mu\text{g RNA/mL gel}$ ) en los que se corrieron  $20\ \mu\text{g}$  de extractos proteicos, se lavaron para eliminar el SDS y se incubaron en amortiguador de actividad (KCl  $10\ \text{mM}$ ,  $\text{MgCl}_2\ 40\ \mu\text{M}$ ,  $\text{ZnCl}_2\ 40\ \mu\text{M}$  y succinato de sodio  $100\ \text{mM}$  a pH 6.0) durante una hora a  $51^{\circ}\text{C}$  con agitación suave y constante (Yen y Green 1991). La actividad de RNAsa se reveló tiñendo los geles durante 10 min con bromuro de etidio  $0.25\ \text{mg/mL}$ , posteriormente fueron visualizados en un transiluminador de luz UV en donde se identifican bandas oscuras, en las que el RNA fue degradado.



**Figura AIII.** Actividad de RNAsa de extractos proteicos totales de maíz. Gel de poliacrilamida con RNA incluido, se corrieron  $20\ \mu\text{g}$  de extractos proteicos. ES, embriones secos; C, control con agua; PS, fitoesfingosina  $10\ \mu\text{M}/48\ \text{h}$ ; SN, esfinganina  $10\ \mu\text{M}/48\ \text{h}$ ; SA, ácido salicílico  $1\ \text{mM}/48\ \text{h}$ ; N36, NaCl  $300\ \text{mM}/36\ \text{h}$ ; N48, NaCl  $300\ \text{mM}/48\ \text{h}$ ; Y, hojas jóvenes; S, hojas senescentes. En el margen derecho se indica la migración de los marcadores de peso molecular; las flechas señalan las bandas de actividad de RNAsa con pesos similares a las DNAsas previamente descritas.

Se observaron al menos cinco bandas de actividad, algunas de ellas con pesos moleculares comparables a los de las RNAsas reportadas en *Arabidopsis* que van desde los 9 hasta los 41 kDa (Yen y Green 1991), especialmente con las de 32 y 39 kDa, cuyos pesos moleculares también correlacionan con el doblete de actividad de DNAsa previamente observado en extractos proteicos de maíz. La actividad de aprox. 30 kDa



aparentemente es responsiva al tratamiento con SA y estrés salino, además de estar presente en hojas maduras y senescentes (Fig. A.II), patrón de activación similar al de nucleasas bifuncionales como BFN1 (Perez-Amador et al. 2000) y OsNuc37 (Jones 2001), inducidas durante procesos de PCD desencadenados por estrés salino y senescencia. La actividad de aprox. 22 kDa se observó en todos los tratamientos, especialmente incrementada en condiciones de estrés y senescencia, mientras que las RNAsas de aprox. 18 y 14 kDa fueron menos detectables y aparentemente no están activas bajo todas las condiciones probadas (Fig. A.II).

Estos resultados ayudan a sugerir que, dada la presencia de una banda de actividad de RNAsa con un tamaño aproximado de 30 kDa y un patrón responsivo a SA y condiciones de estrés, podría tratarse de ZmNUC30, siendo entonces una nucleasa bifuncional de maíz, capaz de degradar no sólo DNA sino también RNA, característica que compartiría con otros miembros de la familia S1/P1 y que, como nucleasa dependiente de  $Zn^{2+}$ , participaría en las etapas finales de lamuerte celular, siendo liberada del apoplasto y/o la vacuola para continuar con la degradación del material genético, iniciada por las nucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , mientras las célula es completamente desmantelada (Jones 2001; Sugiyama et al. 2000).





ANEXO IV. Tabla de clasificación de nucleasas.

CLASIFICACIÓN DE NUCLEASAS. Tabla comparativa entre ZmNUC y otras nucleasas pertenecientes a la familia S1/P1.

Nombre	Origen	Número de acceso	Descripción	% de identidad	% de similitud	No. de aminoácidos	PM al procesar (kDa)	PM procesada (kDa)	Peptidos señal (1)	Domínios/Motivos conservados (2, 3)	Referencias
ZmNUC	<i>Zea mays</i>	Hx117502688	nucleasa bifuncional			301	34.09	30.95	Residuos 1-29 MAPHQQRALLFPVFLILLLAPPLAGA	Residuos 30-289 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	de la Torre-Hernández M.E. et al., 2010; Physiol and Mol Plant Pathol. 74: 337-45.
Os 01g0123200	<i>Oryza sativa</i>	NP_001041910	nucleasa bifuncional	86	92	308	34.97	31.66	Residuos 1-33 MALAAPLRLRLPLAFVSWLSVTAAPRRAEA	Residuos 34-294 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Chirana H. et al., 2005; Nucleic Acids Res. 34 (DATABASE ISSUES): D741-D744 Matsumoto, T. et al., 2005; Nature 438 (7052): 793-800
Os 04g04652700	<i>Oryza sativa</i>	NP_001054101	nucleasa	59	76	260	32.31	29.81	Residuos 1-25 MAARVLP.LLLLWVAAMARAPTDA	Residuos 24-293 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Chirana H. et al., 2005; Nucleic Acids Res. 34 (DATABASE ISSUES): D741-D744 Matsumoto, T. et al., 2005; Nature 438 (7052): 793-800
Bnuc1	<i>Hordeum vulgare</i>	BA462696	nucleasa	58	74	290	32.43	30.13	Residuos 1-20 MGLLLLLOVLLAAVARAPA	Residuos 24-291 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Murano Y. et al., 1999; Gene 234:315-321
Bnuc2	<i>Hordeum vulgare</i>	CAC33831	nucleasa putativa	57	74	289	32.19	30.04	Residuos 1-20 MGLLLLHLVLLVAAAAGAPA	Residuos 24-290 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Zhao G. et al., 2003; Gene 315:43-50
BEN 1	<i>Hordeum vulgare</i>	T04401	endonucleasa	56	72	288	32.21	29.97	Residuos 1-15 MGLLLLLOVLLVAAA	Residuos 16-23 (ARAFGAQA) región de baja complejidad; residuos 24-290 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Aoyagi S. et al., 1998; FEBS Lett. 429: 134-138
ZEN3	<i>Zmnia elegans</i>	AAD00965	nucleasa bifuncional	56	72	328	37.56	34.63	Residuos 1-25 MSHLELWMKSTCSIFLLLSIPGVIG	Residuos 27-293 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Perez-Amador M. et al., 2009; Plant Physiol. 122: 169-179
SNUC	<i>Solanum tuberosum</i>	AAT79582	endonucleasa	53	70	302	34.41	31.59	Residuos 1-25 MLRLTLLSIFFLCLAFNHGAEAE	Residuos 26-291 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Larsen K., 2005; J. Plant Physiol. 162: 1309-1309
SAG	<i>Heinacallis hybrid cultivar</i>	AAC34856	Proteína 6 asociada a senescencia	53	68	298	34.11	31.79	Residuos 1-27 MKMGYSVCLVLLVSLPGAMP	Residuos 23-288 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Parvaiz T. et al., 1999; Plant Mol Biol. 40:237-248
ZEN1	<i>Zmnia elegans</i>	BA428948	endonucleasa	52	69	303	34.49	31.71	Residuos 1-25 MALRLSISCLGFMNINVAQDA	Residuos 26-291 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Aoyagi S. et al., 1998; FEBS Lett. 425:134-138
BFN1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	H86264	nucleasa bifuncional	51	68	305	34.9	31.94	Residuos 1-29 MASAFRSRLVLLGLLCSVSSVRS	Residuos 29-294 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Perez-Amador M. et al., 2009; Plant Physiol. 122: 169-179
P1	<i>Penicillium citrinum</i>	P24289	endonucleasa	31	45	270	29.23	29.23	NO TIENE		Makela K. et al., 1991; Eur. J. Biochem. 200:951-961 Mason D. et al., 1995; J. Biol. Chem. 270:1016 Romer C. et al., 1998; Protein 32:144-1424
S1	<i>Aspergillus oryzae</i>	AA620216	endonucleasa	29	46	287	31.15	29.06	Residuos 1-20 MPLPPLSAATLAAQLTYG	Residuos 21-287 dominio S1-P1 (IPR003154, PFAM02265), contiene el dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 (IPR008847)	Watanabe A. et al., 1991; J. Biochem. 110:151-158 Lee B. et al., 1996; Appl. Microbiol. Biotechnol. 44:425-431 Machida M. et al., 2005; Nature 438:1157-1161

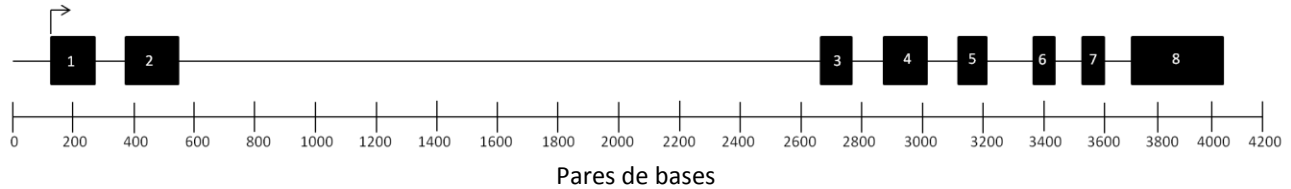
NOTAS:  
 (1) Los **peptidos señal** indican que la proteína será secretada.  
 Henik N. et al., 1997; Protein Engineering 10, 1-6  
 (2) El dominio S1-P1 contiene a las nucleasas S1 y P1 (EC:3.1.30.1) que contan RNA y DNA sin aparente especificidad.  
 Marchle-Bauer A. et al., 2007; Nucleic Acids Res. 35: D237-40  
 (3) El dominio fosfolipasa C/ nucleasa P1 lo presenta la familia de enzimas involucradas en la hidrólisis de ésteres de fosfato y contiene una triada de iones zinc en su sitio activo. Los sustratos de la fosfolipasa C son el fosfatidilinositol y la fosfatidilcolina, mientras que la nucleasa P1 es una endonucleasa que hidroliza RNA y DNA, también presenta actividad de fosfomonesterasa contra el fosfato 3' terminal de los nucleótidos. Los iones de Zn en ambas enzimas forman sitios trinucleares idénticos. Coleman J.E. 1992; Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 21:441-483; Hoegh E. et al., 1992; Nature 358; Anburan NM. et al., 2003; Acta. Biochem. Biophys. 417; Cook G. C., et al., 2003; J. Mol. Biol. 333; Jahn N., et al., 2002; Biochemistry 41



**ANEXO V. Tabla de valores expresión de BFN1 (At1g11190) en varias condiciones seleccionadas de <http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress/>**

TEJIDO	EDAD	TRATAMIENTO	VALOR DE EXPRESIÓN*
Ápice de la inflorescencia	21 días	Luz continua	<b>0.0324</b>
Ápice del tallo, zona de transición	14 días	Luz continua	<b>0.0478</b>
Plántula, partes verdes	8 días	Luz continua	<b>0.0893</b>
Hipocotilo	7 días	Luz continua	<b>0.299</b>
Plántula, partes verdes	21 días	Luz continua	<b>0.4021</b>
Flores, etapa 12	+ 21 días	Luz continua	<b>0.4996</b>
Raíz	8 días	Luz continua	<b>1.0134</b>
Holas senescentes	35 días	Luz continua	<b>1.4409</b>
Sépalos, flor etapa 15	+ 21 días	Luz continua	<b>1.4933</b>
Flores, etapa 15	+ 21 días	Luz continua	<b>2.3153</b>
Raíz	21 días	Luz continua	<b>2.3213</b>
Semillas, etapa 7	8 semanas	Día largo (16 / 8)	<b>4.3897</b>
Semillas, etapa 9	8 semanas	Día largo (16 / 8)	<b>5.4721</b>
Estambres, flor etapa 12	+ 21 días	Luz continua	<b>7.18</b>
Estambres, flor etapa 15	+ 21 días	Luz continua	<b>7.6836</b>
Pétalos, flor etapa 15	+ 21 días	Luz continua	<b>10.996</b>
Plántula	7 días	Ác. salicílico (SA; 10 $\mu$ M / 3 h)	<b>0.2619</b>
Plántula	7 días	Metil jasmonato (MJ; 1 $\mu$ M / 3 h)	<b>0.0596</b>
Plántula	7 días	Ác. abscísico (ABA; 10 $\mu$ M / 3 h)	<b>4.4184</b>
Plántula	7 días	Ác. giberélico (GA; 1 $\mu$ M / 3 h)	<b>0.0599</b>
Plántula	7 días	Zeatina (1 $\mu$ M / 3 h)	<b>0.1131</b>
Plántula, parte aerea	N/A	Estrés osmótico (Manitol 300 mM / 1 h)	<b>0.2119</b>
Plántula, parte aerea	N/A	Estrés osmótico (Manitol 300 mM / 24 h)	<b>1.5443</b>
Raíz	N/A	Estrés osmótico (Manitol 300 mM / 1 h)	<b>1.3892</b>
Raíz	N/A	Estrés osmótico (Manitol 300 mM / 24 h)	<b>17.7541</b>
Plántula, parte aerea	N/A	Estrés salino (NaCl 150 mM / 1 h)	<b>0.3098</b>
Plántula, parte aerea	N/A	Estrés salino (NaCl 150 mM / 24 h)	<b>0.996</b>
Raíz	N/A	Estrés salino (NaCl 150 mM / 1 h)	<b>1.3526</b>
Raíz	N/A	Estrés salino (NaCl 150 mM / 24 h)	<b>2.9537</b>
Hoja	N/A	Infiltración c/ <i>Pseudomonas syringae</i> (108 ufc / ml; 24 h)	<b>3.258</b>

\*Valores normalizados.

**ANEXO. VI. Estructura del gen de nucleasa de maíz GRMZM2G112968.**
**A**

**B**

<b>Exón/Intrón</b>	<b>cDNA AM710418</b>	<b>Gen GRMZM2G112968</b>	<b>Longitud (pb)</b>
Intrón 1		11500726 - 11500856	<b>130</b>
<b>Exón 1</b>	8 - 151	11500857 - 11501000	<b>143</b>
Intrón 2		11501001 - 11501106	<b>105</b>
<b>Exón 2</b>	150 - 324	11501107 - 11501281	<b>174</b>
Intrón 3		11501282 - 11503441	<b>2159</b>
<b>Exón 3</b>	324 - 426	11503442 - 11503544	<b>102</b>
Intrón 4		11503545 - 11503656	<b>111</b>
<b>Exón 4</b>	423 - 564	11503657 - 11503798	<b>141</b>
Intrón 5		11503799 - 11503898	<b>99</b>
<b>Exón 5</b>	563 - 656	11503899 - 11503992	<b>93</b>
Intrón 6		11503993 - 11504151	<b>158</b>
<b>Exón 6</b>	656 - 723	11504152 - 11504219	<b>67</b>
Intrón 7		11504220 - 11504317	<b>97</b>
<b>Exón 7</b>	724 - 797	11504318 - 11504391	<b>73</b>
Intrón 8		11504392 - 11504476	<b>84</b>
<b>Exón 8</b>	796 - 1099	11504477 - 11504780	<b>303</b>

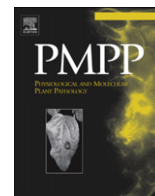
**A.** Estructura del gen de maíz GRMZM2G112968 con un tamaño aproximado de 4040 pb ([www.maizgedb.org](http://www.maizgedb.org)); está localizado en el brazo corto del cromosoma 8 y la secuencia de sus exones corresponde con la del cDNA AM710418, aislado en este trabajo, y que codifica una nucleasa de maíz perteneciente a la familia S1/P1. **B.** Tamaño (pb) de los exones e intrones del gen GRMZM2G112968.



**ANEXO. VII. Artículo.**

**de la Torre-Hernández, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernández, N., Cruz-Ortega, R., Plasencia, J. 2010. *FB1 induces nuclease activation and SA accumulation through LCB build-up in germinating maize.* Physiological and Molecular Plant Pathology. 74: 337 – 345.**





## Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize

M. Eugenia de la Torre-Hernandez<sup>a</sup>, Mariana Rivas-San Vicente<sup>a</sup>, Nahieli Greaves-Fernandez<sup>a</sup>, Rocío Cruz-Ortega<sup>b</sup>, Javier Plasencia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad y Copilco, 04510 México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad y Copilco, 04510 México D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 27 May 2010

#### Keywords:

Fumonisin  
Endonuclease  
Sphinganine  
Salicylic acid  
Maize germination

### ABSTRACT

*Fusarium verticillioides* is a predominant maize fungal pathogen that causes seed decay, damping-off and seedling blight. Most isolates of this fungus produce fumonisins, which disrupt sphingolipid biosynthesis causing the accumulation of sphingoid long-chain bases (LCB). In the work reported in this paper we tested the effect of fumonisin B1 (FB1) on germinating maize embryos and found that it induced an endonuclease activity and salicylic acid (SA) accumulation that correlate with sphingoid LCB build-up and cell lysis. Exogenously applied sphinganine produced similar effects on these markers. This suggests that fumonisin production contributes to the colonization of this necrotroph by activating the SA pathway and inducing cell death.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Fusarium verticillioides* is a necrotrophic pathogen that causes seedling blight and stem, ear and kernel rot in maize (*Zea mays* L.). Kernels are infected by two main natural pathways: systemic growth of the fungus from infected seeds and silk infection, which appears to be the most important one. A third infection pathway is facilitated by insects and mechanical damage in the kernels [1,2]. After colonization, a 100% of infected seeds can be achieved and the pathogen can be isolated from the pedicel, endosperm and embryo [3]. Upon seed germination and further growth, the pathogen is able to move systemically to the roots and the mesocotyl in the seedling [4]. Seed-borne infection and fungal propagules surviving in the soil are responsible for causing seedling blight, characterized by reduced emergence and shoot elongation, and necrotic lesions [5].

Most *F. verticillioides* isolates produce fumonisins, sphinganine-analog mycotoxins that inhibit the acyl-CoA-dependent ceramide synthase activity, disrupting complex sphingolipid biosynthesis and causing an increase of free sphingoid base levels [6,7]. Fumonisin B1 (FB1) constitutes more than 70% of the total fumonisins produced by a given strain [8] and its role in fungal virulence has been controversial. Desjardins et al. [9] tested fumonisin-

nonproducing strains and compared them with fumonisin-producing strains in their ability to cause ear infection and rot. No significant differences in ear rot rating were found among these strains. Moreover, the high virulence of fumonisin-nonproducing strains for maize seedlings suggested that fumonisin production was unnecessary or sufficient for virulence in maize seedlings [10]. In a similar manner, not all FB1-insensitive maize genotypes proved more resistant to seedling blight than the FB1 susceptible genotypes [11]. However, recent genetic evidence highlighted the role of FB1 production in *F. verticillioides* pathogenicity. When *F. verticillioides* strains, not pathogenic in maize and unable to produce fumonisins, are transformed with the entire FUM cluster, fumonisin production is restored, as well as pathogenicity in maize. These strains are now able to cause stunting and leaf lesions in seedlings developed from inoculated seeds [12]. These symptoms are reproduced when seedlings are watered with an FB1 solution that causes an increase in level of the long-chain bases sphinganine, phytosphingosine and their corresponding phosphate derivatives [13]. Thus disruption of sphingolipid metabolism appears to be an important component on maize seedling blight that leads to cell and tissue death.

Sphingolipids are a complex group of molecules derived from a long-chain sphingoid base (LCB) and are major components of the plasma membrane, tonoplast and other endomembranes of plant cells. Recent analytical developments revealed their abundance and diversity as over 300 species have been determined by mass spectrometry in *Arabidopsis thaliana* leaves [14]. LCB and other

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56225275; fax: +52 55 56225329.

E-mail address: [javierp@servidor.unam.mx](mailto:javierp@servidor.unam.mx) (J. Plasencia).

sphingolipid intermediaries are not only essential as structural membrane components but also as signaling molecules in mediating plant cell death and other responses. An accelerated cell-death phenotype (ACD) is observed in *A. thaliana* mutants that lack a sphingosine transfer protein (ACD11, [15]) or a ceramide kinase (ACD5, [16]) suggesting that both, cellular location and levels of phosphorylated intermediaries are relevant in regulating cell death program. This phenotype concurs with the constitutive expression of various pathogenesis-related genes and the generation of reactive oxygen species (ROS), linking sphingolipid metabolism to plant defense response. Moreover, exogenously added sphinganine, phytosphingosine and sphingosine induce ROS production and cell death in *A. thaliana* leaves [17].

Endonuclease activation has been associated to several programmed cell death (PCD) programs in plants. When the endosperm degenerates during barley seed maturation and germination, a 35-kDa endonuclease (BEN1) is activated and secreted as its transcript also accumulates [18]. During tracheary element differentiation to form vessel, a 43-kDa, and  $Zn^{2+}$ -dependent nuclease is activated in *Zinnia elegans* [19]. Endonucleases have also been identified as leaf senescence progresses in wheat and barley and they appear to be of both types,  $Zn^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -dependent endonucleases [20]. During the hypersensitive response (HR) in tobacco to tobacco mosaic virus, three nucleases with molecular masses ranging from 36 to 100 kDa are activated [21,22]. HR is a form of PCD limited to the site of pathogen infection.

Another component commonly associated to the HR is salicylic acid (SA). Salicylic acid is a phenolic compound that accumulates during the HR in plant cells under pathogen attack. This hormone plays a central role in defense as it induces the transcription of pathogenesis-related (PR) genes, and also accumulates in distant, non-infected tissues so it has been linked to the systemic acquired resistance [23].

Here, we report the early events that occur during maize germination and seedling establishment in the presence of fumonisin B1, which causes cell death, genomic DNA degradation and induction of a nuclease activity. These effects are associated to the defense response as salicylic acid accumulates concomitantly. Our results suggest that these responses are mediated by long-chain sphingoid bases that accumulate as a result of FB1 action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Maize seeds (landrace “Chalqueño”) were obtained from a local grower in Chalco, Mexico, and when indicated, embryos were manually dissected from dry seeds. Seeds and embryos were surface disinfected by immersion in a 0.5% sodium hypochlorite solution for 10 min and then washed four times with sterile water. Seeds or embryos were plated in petri dishes containing 1.2% agar (Invitrogen). Chemicals (FB1, sphinganine, phytosphingosine, salicylic acid) were obtained from Sigma Chemical Co. and an aliquot of the corresponding stock solution was added to the melted agar (45 °C) before pouring into the plate. Plates were incubated at 29 °C under fluorescent light and biological samples were taken at different times.

### 2.2. Isolation of nuclear DNA

At various germination times, the embryos and radicles were excised from the germinated seeds, frozen with liquid nitrogen in a mortar and ground with a pestle until obtaining a fine powder that was transferred to a 1.5-mL Eppendorf tube. One milliliter of

DNAzol (Invitrogen) was added to the tube and gently agitated. The tube was centrifuged for 10 min at room temperature in a Sorvall MC12 microcentrifuge (10,000 rpm). The supernatant was transferred into a fresh tube and 500  $\mu$ L of cold isopropanol were added and mixed. After a 3 min incubation period, the tube was centrifuged as described above, the supernatant was discarded and the pellet was washed with 70% ethanol. The pellet was air-dried, redissolved in 50  $\mu$ L of 10 mM NaOH and incubated at 37 °C for 15 min. Tubes were centrifuged as described for 5 min and 40  $\mu$ L of the supernatant were collected and neutralized with 1 M Tris, pH 8.0. DNA was resolved in 0.8% agarose gels, stained with ethidium bromide and documented.

### 2.3. Electrolyte leakage

Embryos from FB1-treated and non-treated seeds were transferred to tubes containing deionized water and conductivity was determined with a Conmet1 (Hanna Instruments) conductimeter at 22 °C. After the final reading was taken, the tube was incubated in a boiling-water bath for 10 min, cooled back to 22 °C and conductivity was determined again to set 100% electrolyte leakage.

### 2.4. Salicylic acid analysis

Salicylic acid (SA) was extracted and analyzed by HPLC using a modification of the method described by Meuwly and Metraux [24]. Briefly, embryo samples were frozen with liquid nitrogen and ground to a fine powder with a pestle in a mortar, and extracted twice with 90% methanol using *o*-anisic acid as internal standard. The extract was dried under a stream of nitrogen and resuspended in 5% trichloroacetic acid and salicylic acid was extracted twice with a 1:1 (v/v) mixture of ethyl acetate–cyclopentane. The pooled organic phases were dried under a stream of nitrogen and redissolved in 500  $\mu$ L of methanol. HPLC analysis was performed with a Shimadzu LC-10ADVP solvent delivery module and an RF-10AXL fluorescence detector set at 305 nm excitation/405 nm emission wavelengths. The mixture was resolved isocratically in a 15 cm  $\times$  4.6 mm i.d, 5  $\mu$ m Supelcosil LC-18 analytical C18 column using 40% methanol –60% water, 4% acetic acid, as mobile phase, with a flow rate of 0.8 mL/min.

### 2.5. Long-chain sphingoid bases analysis

Long-chain sphingoid bases were extracted and analyzed according to Castegnaro et al. [25]. Briefly, maize embryos (250–300 mg) were frozen with liquid nitrogen, ground in a mortar and the powder resuspended in 1.5 mL of 50 mM  $K_2HPO_4$  (pH 7.0) solution. A 0.5 mL aliquot of the solution was transferred to a centrifuge tube containing 1.5 mL of 0.8% KCl, 50  $\mu$ L of 1 M KOH, 4 mL of ethyl acetate and 600 pmol sphingosine as internal standard. Extraction proceeded by incubation at room temperature with gentle shaking and phases were separated by centrifugation. The organic phase was transferred into a fresh tube and evaporated under a stream of nitrogen. The residue was redissolved in 500  $\mu$ L of absolute ethanol and analyzed by HPLC with fluorescence detection of *o*-phthalaldehyde (OPA) derivatives. The equipment and column used were the same as described above and excitation and emission wavelengths were set at 337 and 448 nm respectively. LCB derivatives were resolved isocratically using methanol – 5 mM phosphate buffer, pH 7 (89:11 v/v) as mobile phase at a flow rate of 2 mL/min.

### 2.6. Protein extraction and nuclease activity assay

Plant tissue was frozen with liquid nitrogen and ground to obtain a fine powder. One mL of protein extraction buffer (70 mM



Tris; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM KCl; 0.25 mM sucrose; 15 mM 2-mercaptoethanol; 0.1% Triton X-100 and a tablet of COMPLETE™ protease inhibitor cocktail/50 mL buffer) was added and centrifuged at 60,000 rpm for 30 min at 4 °C in a Beckman TL-100 centrifuge. The supernatant was taken and protein was quantified using Bradford colorimetric method [26].

Nuclease activity was determined in 16% polyacrylamide gels polymerized in presence of DNA (50 µg salmon-sperm DNA/mL) with no SDS. Five microgram of total protein were loaded in each lane and run for 45 min. Following electrophoresis, the gel was washed twice with 25% propanol in 10 mM Tris, pH 8.0 for 10 min at room temperature and once with 2 µM ZnCl<sub>2</sub> in 100 mM sodium succinate, pH 6.0. The gel was then incubated in the activity buffer (10 mM KCl, 40 µM MgCl<sub>2</sub>, 40 µM ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM sodium succinate, pH 6.0) for 1 h at 55 °C with gentle shaking. Activity was revealed by staining with a 0.25 µg/mL ethidium bromide solution for 10 min, then visualized and documented with a UV-light box. This protocol was a modified version of the technique described by Muramoto et al. [27]. Nuclease activities were identified as bands devoid of DNA and relative signal was quantified by densitometry with a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad).

### 2.7. Two-dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was performed on a Bio-Rad Mini-Protean II Gel System apparatus according to the manufacturer's instructions and following the procedure of O'Farrell [28]. Proteins were separated in the first dimension by isoelectric focusing in gels containing 5% acrylamide/bis-acrylamide and 2.4% ampholytes (pH 3–10). Anode and cathode solutions were 10 mM phosphoric acid and 20 mM NaOH respectively. Protein (10 µg) was loaded onto the gel, subjected to 200 V for 90 min and 400 V for an additional 90 min. After focusing, the gel lane was excised and loaded on the second dimension slab gel that contained DNA as described above.

### 2.8. Molecular cloning and expression of a maize nuclease

Total RNA from FB1-treated maize embryos was extracted using the Trizol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer instructions. Reverse transcription was performed with 5 µg RNA using *SuperScript II* reverse transcriptase (Invitrogen) and the following primers to obtain the in-frame cDNA (Forward Primer: 5' GGATCCGAGCGTCAGCAGAGAGACATG 3'; Reverse Primer: 5' CCCGGGAATTCATGCCAATTTATTGAC 3'). The PCR conditions were 94 °C 3 min, 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 1 min for 35 cycles; 72 °C for 7 min. The 1044-bp PCR product was resolved in 1.5% agarose gel and excised from the gel by GENECLEAN purification and cloning into the pGEM-T Easy Vector (Promega). The ligation product was transformed into competent DH5α *Escherichia coli* cells and the plasmid purified for DNA sequencing. Plasmid DNA was extracted and digested with *Bam*HI and *Sma*I and the DNA fragment was ligated to the pGEX-4T2 expression vector. The plasmid was transformed into competent BL21 *E. coli* cells and induction was carried out by incubating the cells with 0.25 mM IPTG for 3 h at 30 °C. Cells were lysed by sonication and total protein was solubilized in Laemmli buffer and resolved in 12% polyacrylamide gels. The 60-kDa IPTG-induced band was excised from the gel and electroeluted in a Bio-Rad 422 Electro-Eluter. Protein from various preparative gels was pooled for immunization.

Antibodies against ZmNUC30 were raised using the recombinant protein coupled to Keyhole limpet hemocyanin as described by Herrera et al. [29]. A female rabbit was injected intramuscularly with 100 µg of protein emulsified in complete Freund adjuvant. Subsequent immunizations were applied 14, 28 and 42 days later

using incomplete Freund adjuvant and serum was obtained three weeks after the last immunization. Total immunoglobulins were purified by ammonium sulfate precipitation according to Harlow and Lane [30].

### 2.9. Western blot and immunoprecipitation

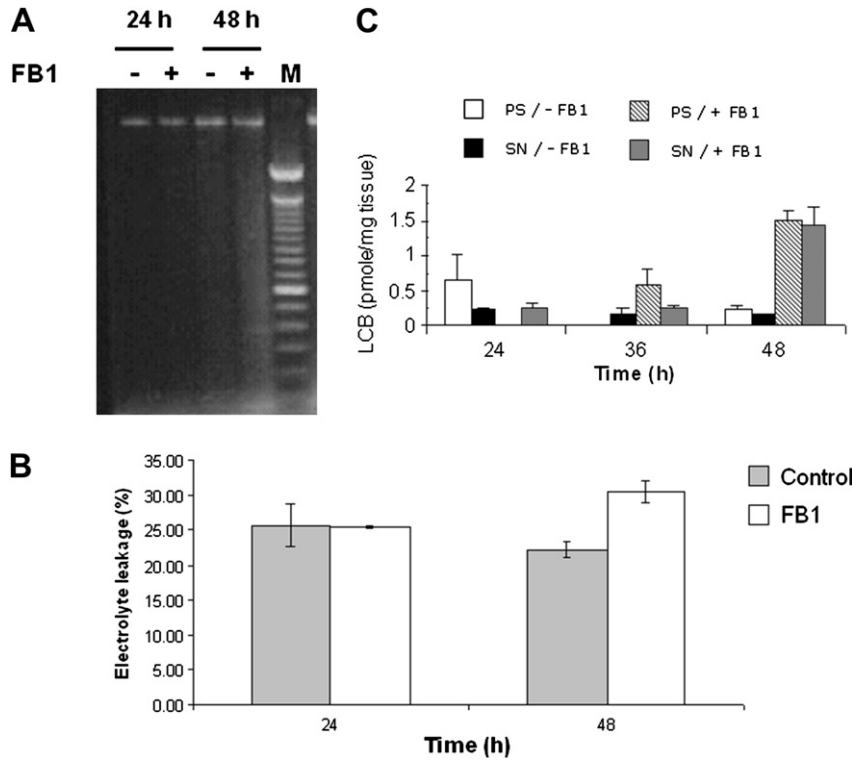
Proteins (20 µg per lane) were separated by SDS-PAGE electrophoresis (16%) for 90 min at 250 V. The gels were washed with transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% methanol) and proteins were transferred to Immobilon-P™ (Millipore) membranes using a Mini-V8-10 Vertical Gel Electrophoresis System (Life Technologies). Membranes were washed and blocked for 2 h in PBS supplemented with 5% semi-skimmed milk and 0.6% Tween-20 at room temperature. The solution was replaced with the same volume of blocking solution supplemented with the antibody diluted 1:1500 and incubated overnight at 4 °C with gentle agitation. Membranes were washed once with 1× PBS and twice with 1× PBS-0.5 M NaCl and then again with 1× PBS. Each wash lasted 15 min. Blocking solution containing anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibody (Amersham Biosciences) diluted 1:10,000 was added and incubated for 2 h at room temperature. The membrane was washed three times with 1× PBS and developed using the enhanced chemiluminescence reagent (Amersham). The anti-ZmNuc antibody was conjugated for 4 h at 4 °C with protein A Sepharose (Amersham Biosciences) at a 1:50 ratio. Protein (25 µg) from extracts was added and the resulting mixture was incubated overnight at 4 °C with agitation. The proteins bound to the conjugated antibodies were pelleted in a microfuge (12,000 rpm; 4 °C) and washed twice with 1× PBS. The immunoprecipitate complex was dissociated by mixing it with SDS loading-buffer and both, precipitate and supernatant, were analyzed in nuclease activity gels as described above.

## 3. Results

When maize seeds were imbibed in presence of 10 µM fumonisin B1, DNA degradation was observed as a smear in the agarose gel at 48 h post-germination (Fig. 1A). Such effect was not observed at 24 h germination in any of the control samples. A significant increase in electrolyte leakage was also observed at 48 h germination with 10 µM fumonisin B1 (Fig. 1B). These effects were accompanied by a 6-fold increase in sphinganine and phytosphingosine levels at 48 h (Fig. 1C).

The observed DNA degradation induced by FB1 correlated temporarily with nuclease activity. At 24 h germination, the activity of a 30-kDa nuclease activity increased 2-fold at the same time point with the FB1 and SA treatments. This activity increased at 36 h and reached its maximum at 48 h in SA, sphinganine and FB1 treatments (Fig. 2A, B). As pointed above, FB1 caused DNA degradation at 48 h germination. An increase in the activity of a second nuclease activity (39 kDa) was also detected, but only a minor activation was observed with FB1 (Fig. 2A, C).

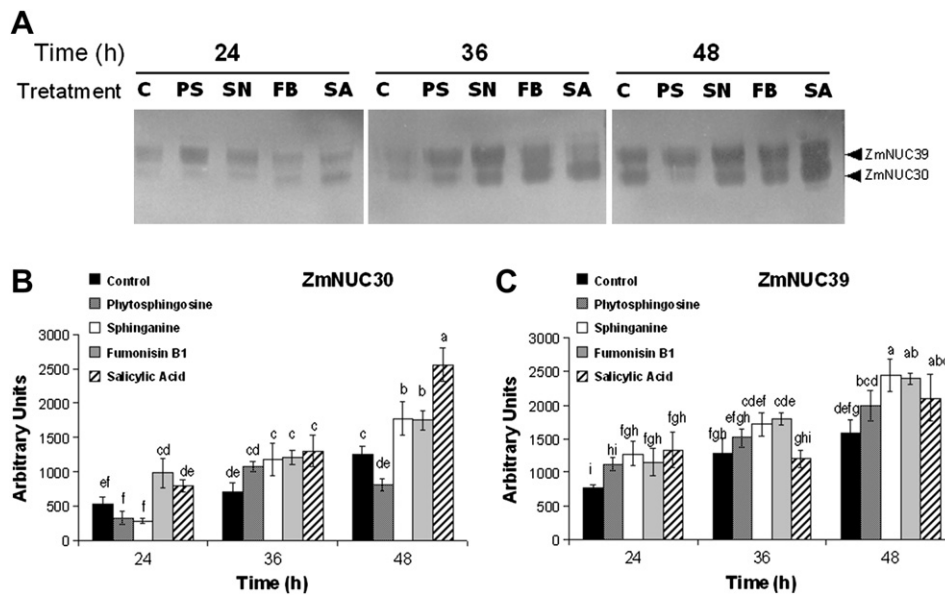
Because cell death and SA production are closely interlinked in the HR, we evaluated the effects of FB1 and LCBs on SA production. When maize embryos germinated in presence of 10 µM FB1, a modest but significant increase in SA content was recorded only at 36 h of imbibition (Fig. 3A; paired Students *t* test; *P* < 0.01) whereas in other times points were not statistically different with control. To confirm these results, maize embryos were treated with various toxin concentrations during germination and SA levels were determined at 36 h. As FB1 concentration increased, levels of SA in the germinated embryos were higher and a dose-response effect was observed (Fig. 3B). A two-fold increase in SA levels was observed with 25 µM FB1 (*P* < 0.01).



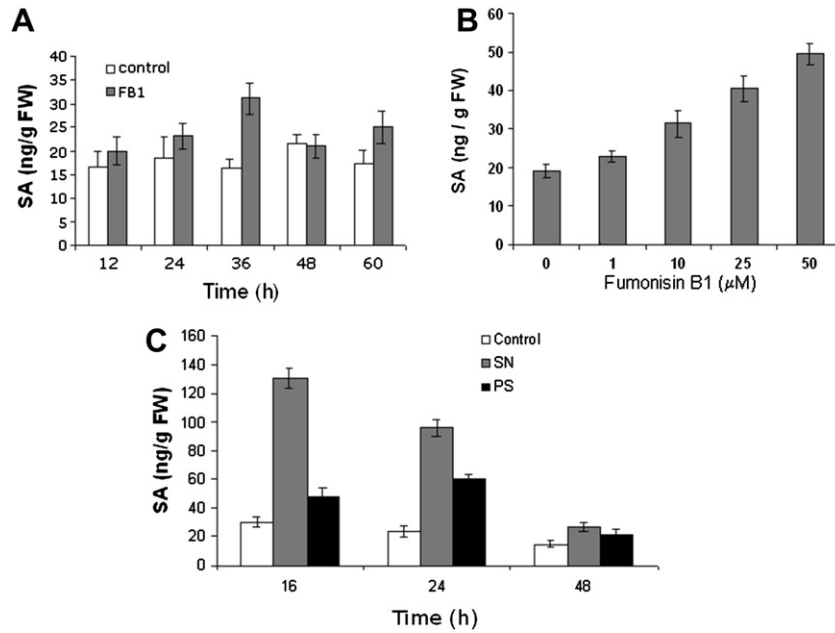
**Fig. 1.** A. DNA degradation induced 24 and 48 h post-germination in embryos. DNA was isolated and separated in an agarose gel. B. Levels of free sphinganine (SN) and phytosphingosine (PS) in germinating embryos from seeds germinated in absence or presence of 10  $\mu$ M fumonisin B1. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 3$  plates/treatment at each time point. Each plate contained 10 seeds that were pooled and ground for LCB determination. C. Electrolyte leakage from embryos treated with 10  $\mu$ M FB1 for 24, 36 and 48 h was determined by change in conductivity of bathing media.

To test whether this increase was associated to LCB accumulation, maize embryos were germinated with either 10  $\mu$ M sphinganine or 10  $\mu$ M phytosphingosine. Induction of SA accumulation by LCBs was observed at shorter times than with FB1 treatment.

Moreover, SA levels increased significantly: sphinganine caused a 6-fold increase at 16 h, whereas phytosphingosine caused a 3-fold rise at 24 h of germination (Fig. 3C). Such increase was transient as basal levels were reached at 48 h.



**Fig. 2.** A. Effect of 10  $\mu$ M phytosphingosine (PS), sphinganine (SN), fumonisin B1 (FB) and 5 mM salicylic acid (SA) on nuclease activity during maize germination. Maize seeds were germinated in presence of the indicated compounds and protein was extracted following 24, 36 and 48 h. DNase activity was determined in PAGE DNA activity gels. Relative signal was quantified densitometrically for ZmNUC30 (B) and ZmNUC39 (C) with a Fluor-S Multilimager; values are means  $\pm$  SD,  $n = 3$  gels. Means with the same letter do not differ significantly ( $P < 0.01$ ; Tukey test). Equivalent protein loading in each gel was confirmed by Coomassie blue staining (Fig. 1S).



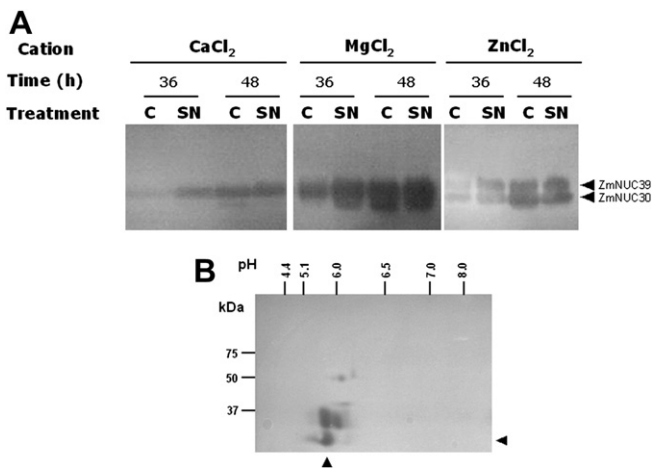
**Fig. 3.** A. Levels of free SA in maize embryos germinated in absence or presence of 10  $\mu\text{M}$  FB1. SA was extracted with 90% methanol, cleaned-up and quantified after HPLC separation by fluorescence detection. B. Dose-response effect of FB1 in free SA accumulation in maize embryos germinated for 36 h. C. Accumulation of free SA in germinating maize embryos induced by LCBs, sphinganine (SN) and phytosphingosine (PS). In every case, values are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  plates/treatment at each time point.

Because multiple nucleases with distinct properties have been described in plants, we were interested in characterizing the nuclease that responds to FB1, sphinganine and SA. In order to characterize divalent cation requirements for nuclease activity, protein extracts from control and sphinganine-treated embryos were resolved in polyacrylamide gels containing DNA, which were incubated with  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , or  $\text{ZnCl}_2$ . Incubation with  $\text{CaCl}_2$  only allowed the visualization of one nuclease activity (ZmNUC39), whereas incubation with either  $\text{MgCl}_2$  or  $\text{ZnCl}_2$  revealed two activities (Fig. 4A) but they were higher in presence of  $\text{Mg}^{2+}$ . When maize nuclease activities were separated by two-dimensional gel electrophoresis, it was observed that the 39-kDa activity band resolved into two variants, whereas only one low-molecular weight

band with nuclease activity was detected (Fig. 4B). The estimated pI for the 30-kDa was above 5.2.

A cDNA coding for a maize nuclease was isolated from total RNA extracted from maize embryos germinating in presence of fumonisin B1. The cDNA (GenBank 710418) codes a 301-amino-acid protein that has an 86% identity with a bifunctional nuclease from *Oryza sativa*, and 56% and 58% identity with BEN1 and BnuC1 nucleases respectively, from *Hordeum vulgare* (Fig. 5A). These nucleases belong to the S1/P1 nuclease family as they contain the conserved S1/P1 nuclease and phospholipase/nuclease P1 domains (Fig. 5B).

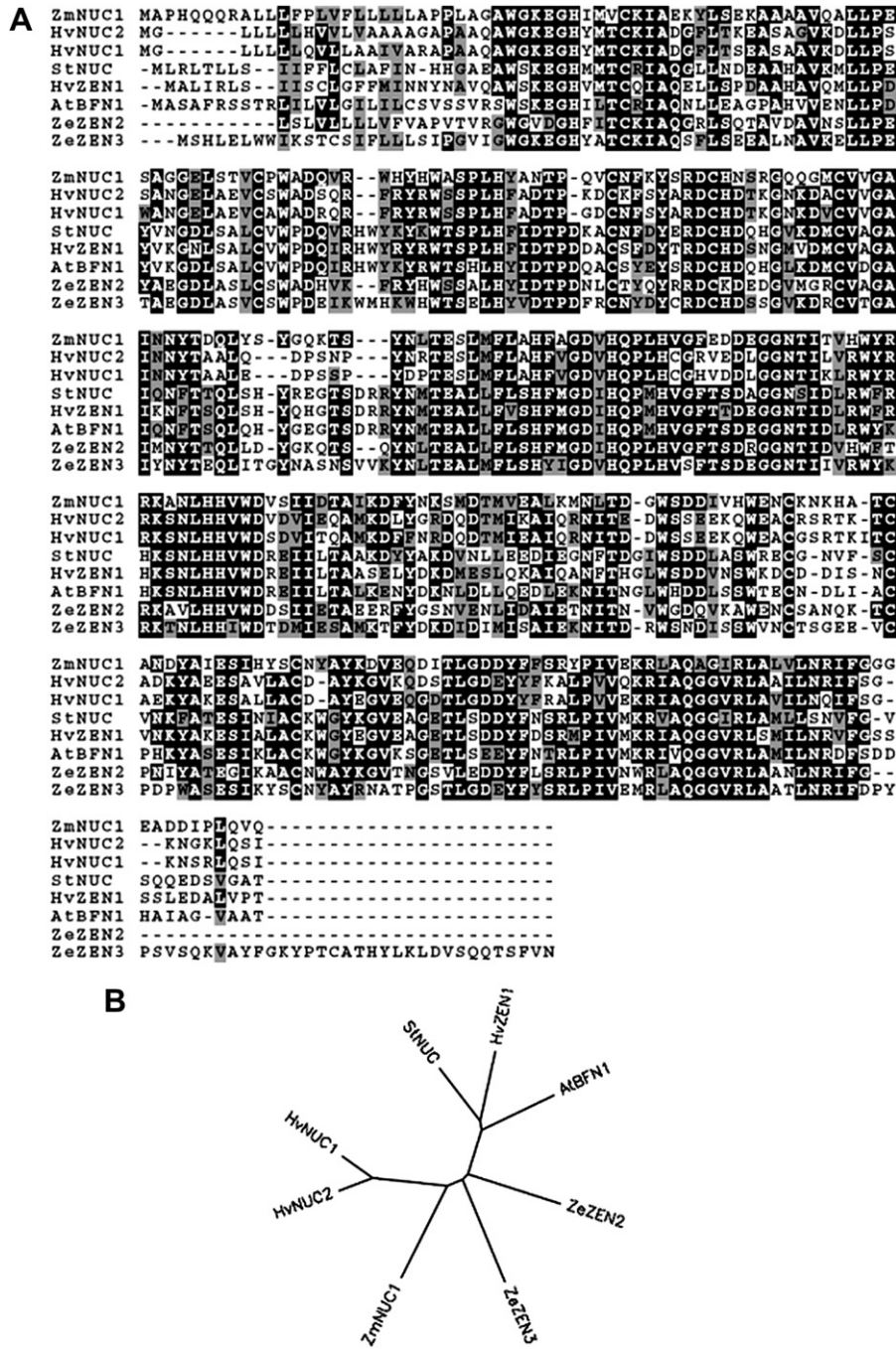
In order to determine if the isolated cDNA corresponded to the characterized nuclease, we generated antibodies against the recombinant protein. Heterologous protein synthesis was achieved by cloning the cDNA into an expression vector as a GST-fusion protein. Because the protein was insoluble in inclusion bodies, it was purified by SDS-PAGE and used to immunize rabbits for antibody production. The purified antibody recognized a 30-kDa band that was highly induced by phytosphingosine, sphinganine, FB1 and SA treatments at 48 h (Fig. 6A). The antibodies immunoprecipitated a 30 kDa-protein containing nuclease activity. A quantitative immunoprecipitation was carried out starting from the extracts of FB1 and SA-treated embryos, as well as from the embryos treated with sodium chloride. The extracts from the FB1 and SA-treated embryos showed higher nuclease activity (Fig. 6B).



**Fig. 4.** A. Effect of divalent cations on the 30-kDa, LCB-induced nuclease activity. Gels were incubated with  $\text{CaCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgCl}_2$  (5  $\mu\text{M}$ ) or  $\text{ZnCl}_2$  (20  $\mu\text{M}$ ) to reveal activity. B. 2-D activity gel of nucleases contained in a 48-h protein extract from maize embryos incubated with 10  $\mu\text{M}$  fumonisin B1.

#### 4. Discussion

The inhibitory activity of FB1 on sphinganine N-acyl-transferase was originally characterized on rat hepatocytes [6], but many plant species are susceptible to this mode of action as demonstrated by free LCB accumulation. In duckweed *Lemna paucicostata* leaf disks, 1  $\mu\text{M}$  FB1 causes a 76- and 18-fold increase in sphinganine and phytosphingosine levels respectively, whereas a 7- and 4-fold increase is observed in tobacco callus with 14  $\mu\text{M}$  FB1 [7]. LCB accumulation has also been observed in the model plant *A. thaliana*. A dose of 5  $\mu\text{M}$  FB1 applied to 3 week-old seedlings causes a 80-fold



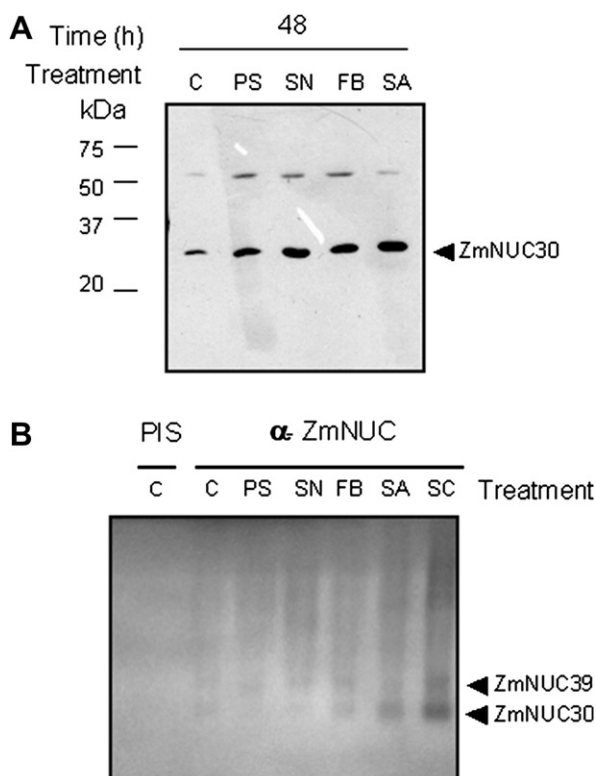
**Fig. 5.** A. Alignment of amino-acid sequences of the plant nucleases compared to ZmNuc. Identical residues are indicated with a dark background and similar residues with a gray background. GenBank accession numbers are as follows: ZmNUC (Hx1178302868), HvNUC2 (CAC33831), HvNUC1 (BAA82696), StNUC (AAT79582), HvZEN1 (BAA28948), AtBFN1 (H86264), ZeZEN2 (AAD00694), ZeZEN3 (AAD00695). B. Unrooted tree illustrating the relationship among the selected plant nucleases.

increase in sphinganine and a 12-fold increase in phytosphingosine [17]. However, because maize is the natural host of *F. verticillioides*, the FB1-producing pathogen, it is relevant to study its effects on this species. Maize seedlings watered with 14 μM fumonisin accumulated LCBs as a 6- and 2.5-fold increase was observed in sphinganine and phytosphingosine levels respectively [13]. In our work a maximum 6-fold increase of free sphinganine and phytosphingosine was observed in the excised maize embryos from seeds germinated in presence of 10 μM FB1. Such result is physiologically relevant because fumonisin is bioavailable in *F. verticillioides*-infested soils where maize seeds might be germinating [31]. LCB

accumulation coincided temporally (48 h) with the maximum DNA degradation and electrolyte leakage observed in this study. Both measurements are parameters of cell death in plant cells and have been used to describe FB1 effects in *L. paucicostata* leaf disks [32] and tomato leaves [33].

Cell death-inducing activity of sphingoid compounds has been demonstrated by the direct addition of LCBs and ceramides to various plant cell cultures and tissues. When C2 ceramide (50 μM) is added to an *A. thaliana* cell suspension culture, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases followed by reactive oxygen species production and cell death induction [34]. In *A. thaliana* leaves, exogenous application of





**Fig. 6.** A. ZmNUC protein accumulation induced by the LCBs phytosphingosine (PS; 10  $\mu$ M), sphinganine (SN; 10  $\mu$ M), fumonisin B1 (FB; 10  $\mu$ M) and salicylic acid (SA; 5 mM). Total protein (10  $\mu$ g) was loaded in a 16% SDS-PAGE and resolved. B. Immunoprecipitates of plant extracts obtained with the pre-immune serum (PIS) and the anti-ZmNuc antibody ( $\alpha$ -ZMNUC). Immunoprecipitates were resolved from control embryos (C) and embryos treated with phytosphingosine (PS), sphinganine (SN), fumonisin B1 (FB), salicylic acid (SA) and sodium chloride (SC) were resolved in a DNA-containing gel and revealed for nuclease activity.

2  $\mu$ M sphinganine, sphingosine and phytosphingosine causes a localized accumulation of reactive oxygen intermediates and ultimately cell death [17]. The link between plant cell death and sphingolipid metabolism has also been provided by the characterization of two *A. thaliana* mutants with an accelerated death (*acd*) phenotype. The *acd11* mutant constitutively express cell senescence-associated genes and the *ACD11*-encoded polypeptide transports sphingosine *in vitro* [15]. A second mutant, *acd5*, develops normally but shows unlimited cell death when infected by *Pseudomonas syringae*. The *ACD5* protein has ceramide kinase activity thus a balance between its product, ceramide-1-phosphate and ceramide might regulate the cell death program [16]. Interestingly, both mutants show activation of the defense response as high transcript levels of HR-related genes, accumulation of phytoalexins and callose have been reported.

The role of endonucleases in plant cell death is associative at best. An increase in nuclease activity has been related with cell death during endosperm development in wheat [35], endosperm degradation during barley seed germination [36], and the HR triggered by pathogen attack [21]. In this work we found two nuclease activities in maize embryos, both are up-regulated during germination, but FB1, LCBs, and SA activated only ZmNUC30. FB1 activation was concomitant to cell death as evaluated by electrolyte leakage and probably dependent on LCB accumulation. Interestingly, the phytohormone SA, that plays a key role in cell death, also induced the 30-kDa nuclease activity strongly. Our data suggest that SA accumulation is also mediated by LCB build-up in germinating maize. There are some pharmacological and genetic

approaches that involve sphingolipid metabolism disruption in *Arabidopsis* which support our hypothesis. FB1 induces the expression of the SA-inducible gene *PR-1* in a dose-dependent manner in *Arabidopsis* seedlings [37]. In addition, several mutations in sphingolipid biosynthesis pathway such as *acd5* [16,38], *acd11* [15,39], *sbh1 sbh2* [40] and *erh1* [41], induce the expression of defense related genes including *PR-1*. Moreover, three of these mutations, affecting a ceramide kinase (*acd5*), a LCB transporter (*acd11*) and an inositolphosphorylceramide synthase (*erh1*) promote SA accumulation and their cell-death phenotypes are significantly attenuated or even suppressed by disruption of the SA signaling pathway with the *nahG* transgene, or mutations like *npr1*, *sid2* and *pad4*. Although a precise time course of events is difficult to establish in this system because of differential partition and penetration kinetics of the compounds tested in the maize tissue, our data support that FB1 causes LCB accumulation that in turn might activate the SA pathway and cell death. Both sphingoid compounds and SA are well-established as important regulators of cell death in plants and we provide evidence that support that sphingolipid signaling is upstream of SA signaling pathway.

Our data support that ZmNUC30 is a Zn-dependent endonuclease that shares some properties with the bifunctional type nucleases characterized in plants. Zn-dependent endonucleases have an optimum pH ranging from 5.0 to 6.5 and are localized in vacuoles or in the extracellular fluid [20]. These types of endonucleases prefer RNA or single-stranded DNA as substrates, although they lack specificity and can hydrolyze double-stranded DNA as well [19,42]. Among these endonucleases, the fungal S1 and P1 from *Aspergillus oryzae* and *Penicillium citrinum* respectively have been well characterized and crystallized [43,44]. ZmNUC30 hydrolyzed both single-stranded DNA and RNA and its activity was dependent on the presence of  $Zn^{2+}$ . ZmNUC30 showed a high sequence identity (51%) to AtBFN1 and the antibody we produced recognized a 30-kDa protein in *A. thaliana* protein extracts (Suppl. Fig. 2). Its activation pattern was also similar to other bifunctional nucleases such as AtBFN1 [45] and OsNuc37 [46] as it was induced during the cell death process triggered by salt stress. Zn-dependent endonucleases participate in the final stages of cell death as they accumulate in the vacuole and apoplast, to continue the genomic DNA degradation upon cell rupture [20,47]. ZmNUC30 is a 301-amino-acid protein with a secretion peptide signal at the N-terminal and was barely detectable at 24 h but increased at later times during germination. Because PCD also plays an important role during plant development, nucleases are activated physiologically during germination [20,48]. At this developmental stage in cereals, gibberellins only promote the metabolic activation of the dormant aleurone cells and accelerate their cell death. This hormone induces nuclease activity during germination [49]. In germinating maize embryos,  $Ca^{2+}$ -dependent nucleases increase during the first phase of endosperm degeneration, an event associated to internucleosomal DNA fragmentation [50]. During stage II germination in barley seeds, the DNA in the starchy endosperm is hydrolyzed by a  $Zn^{2+}$ -dependent bifunctional nuclease. This enzyme has a Mr of 36 kDa and is secreted from the aleurone layer [51,52]. We detected a second nuclease activity that is up-regulated during germination (Mr 39 kDa) and was abundant at 24 h, but was induced moderately with the treatments (Fig. 2).

Although FB1 is a potent inhibitor of the maize plasma membrane  $H^+$ -ATPase [53] and might have other molecular targets, most attention has been given to its activity as a sphinganine-analog mycotoxin. Thus FB1 production for *F. verticillioides* pathogenicity might be particularly relevant because recent evidence support the role of sphingolipids in the plant defense response. Clearly, LCB accumulation promotes cell death that favors necrotrophs development. Despite the fact that LCB build-up also regulates

SA accumulation and probably SA-dependent PR-gene expression, it is unknown whether this response might be effective against *F. verticillioides*. In *A. thaliana*, SA accumulation is relevant for the response against *Fusarium oxysporum* as NahG transgenic plants show increased susceptibility to the fungus and exogenously applied SA promotes resistance to infection [54]. However, because of the pathways employed by *F. oxysporum* to penetrate and to induce disease, it has been considered a hemibiotroph [55] as opposed to the necrotrophic *F. verticillioides*. In the interaction between *F. verticillioides* and germinating maize, pathogenesis-related proteins [56] and proteins involved in oxidative stress tolerance are induced [57]. Although the defense pathway has not been characterized in this pathosystem, it would be expected that jasmonic acid and ethylene would play a role in mediating the defense response. In fact, it is interesting that the increase in LCBs induced by fumonisin B1 activates the SA pathway, which in turn might antagonize the JA/ET pathways. Demonstrating this role for sphingosine-analog mycotoxins would contribute to elucidate their function in pathogenesis.

### Acknowledgements

The authors thank M. Najera-Martinez and L. Fabila-Ibarra for technical assistance. METH was recipient of a doctoral fellowship from CONACYT (138459). This work was supported by a research grant from CONACYT (50503-Z).

### Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.pmp.2010.05.004.

### References

- [1] Munkvold GP, Desjardins AE. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis* 1997;81:556–65.
- [2] Munkvold GP, McGee D, Carlton WM. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 1997;87:209–17.
- [3] McGee D. Maize diseases. A reference source for seed technologist. St. Paul, MN: APS Press; 1988.
- [4] Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein expressing transgenic isolate. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:1695–701.
- [5] Munkvold GP. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *Eur J Plant Pathol* 2003;109:705–13.
- [6] Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AH. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* 1991;266:14486–90.
- [7] Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, et al. Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 1994;106:1085–93.
- [8] Musser SM, Plattner RD. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *J Agric Food Chem* 1997;45:1169–73.
- [9] Desjardins AE, Munkvold GP, Plattner RD, Proctor RH. FUM1 – a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol Plant Microbe Interact* 2002;15:1157–64.
- [10] Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:79–85.
- [11] Desjardins AE, Busman M, Muhich M, Proctor RH. Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays*–*Gibberella moniliformis* interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 2007;70:149–60.
- [12] Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH. 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* 2008;21:87–97.
- [13] Williams LD, Glenn AE, Zimeri AM, Bacon CW, Smith MA, Riley RT. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. *J Agric Food Chem* 2007;55:2937–46.
- [14] Markham JE, Jaworski JG. Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:1304–14.
- [15] Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, et al. Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 2002;16:490–502.
- [16] Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 2003;17:2636–41.
- [17] Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, et al. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* 2007;17:1030–40.
- [18] Aoyagi S, Sugiyama M, Fukuda H, BENI and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett* 1998;429:134–8.
- [19] Thelen MP, Northcote DH. Identification and purification of a nuclease from *Zinnia elegans* L—a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 1989;179:181–95.
- [20] Sugiyama M, Ito J, Aoyagi S, Fukuda H. Endonucleases. *Plant Mol Biol* 2000;44:387–97.
- [21] Mittler R, Lam E. Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* 1995;7:1951–62.
- [22] Mittler R, Lam E. Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol Biol* 1997;34:209–21.
- [23] Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 1993;261:754–6.
- [24] Meuwly P, Mettraux JP. Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem* 1993;214:500–5.
- [25] Castegnaro M, Garren L, Galendo D, Gelderblom WCA, Chelule P, Dutton MF, et al. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatogr B* 1998;720:15–24.
- [26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [27] Muramoto Y, Watanabe A, Nakamura T, Takabe T. Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* 1999;234:315–21.
- [28] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007–21.
- [29] Herrera I, Sánchez MP, Molina J, Plasencia J, Vázquez-Ramos JM. Proliferating cell nuclear antigen expression in maize seed development and germination. Regulation by phytohormones and its association with putative cell cycle proteins. *Physiol Plant* 2000;110:127–34.
- [30] Harlow E, Lane D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
- [31] Williams LD, Glenn AE, Bacon CW, Smith MA, Riley RT. Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J Agric Food Chem* 2006;54:5694–700.
- [32] Abbas KH, Duke SO, Merrill AHJ, Wang E, Shier WT. Phytotoxicity of australifungin, AAL-toxins and FB1 to *Lemna paucicostata*. *Phytochemistry* 1998;8:1509–14.
- [33] Wang H, Li J, Bostock RM, Gilchrist D. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* 1996;8:375–91.
- [34] Townley HE, McDonald K, Jenkins GI, Knight MR, Leaver CJ. Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem* 2005;286:161–6.
- [35] Young TE, Gallie DR. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 1999;39:915–26.
- [36] Wang M, Oppeddijk BJ, Lu X, Van Duijn V, Schilperoot RA. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. *Plant Mol Biol* 1996;32:1125–34.
- [37] Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM. Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 2000;12:1811–22.
- [38] Greenberg JT, Silverman FP, Liang H. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* 2000;156:341–50.
- [39] Brodersen P, Malinovsky FG, Hématy K, Newman MA, Mundy J. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiol* 2005;138:1037–45.
- [40] Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB. Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008;20:1862–78.
- [41] Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, et al. An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant

- programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2008;20:3163–79.
- [42] Uchida H, Wu YD, Takadera M, Miyashita S, Nomura A. Purification and some properties of plant endonuclease from scallion bulbs. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993;57:2139–43.
- [43] Iwamatsu A, Aoyama H, Dibó G, Tsunasawa S, Sakiyama F. Amino acid sequence of nuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *J Biochem* 1991;100:151–8.
- [44] Volveda A, Lahm A, Sakiyama F, Suck D. Crystal structure of *Penicillium citrinum* P1 nuclease at 2.8 Å resolution. *EMBO J* 1991;10:1607–18.
- [45] Pérez-Amador MA, Abler ML, Rocher EJD, Thompson DM, van Hoof A, LeBrasseur ND, et al. Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2000;122:169–79.
- [46] Jiang A, Cheng Y, Li J, Zhang W. A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cells of rice. *J Plant Physiol* 2008;165:1134–41.
- [47] Jones AM. Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 2001;125:94–7.
- [48] Mino M, Inoue M. DNA synthesis and nuclease activity during germination of a heterotic F<sub>1</sub> hybrid of maize. *Can J Bot* 1989;67:73–5.
- [49] Domínguez F, Moreno J, Cejudo FJ. A gibberellin-induced nuclease is localized in the nucleus of wheat aleurone cells undergoing programmed cell death. *J Biol Chem* 2004;279:11530–6.
- [50] Young TE, Gallie DR, DeMason DA. Ethylene mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and *shrunken2* genotypes. *Plant Physiol* 1997;115:737–51.
- [51] Brown PH, Ho THD. Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid: purification and partial characterization of the associated ribonuclease, deoxyribonuclease, and 3'-nucleotidase activities. *Plant Physiol* 1986;82:801–6.
- [52] Brown PH, Ho THD. Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease. *Eur J Biochem* 1987;168:357–64.
- [53] Gutierrez-Najera N, Muñoz-Clares R, Palacios-Bahena S, Ramirez J, Sanchez-Nieto S, Plasencia J, et al. Fumonisin B<sub>1</sub>, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 2005;221:589–96.
- [54] Berrocal-Lobo M, Molina A. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends Plant Sci* 2008;13:145–50.
- [55] Thatcher LF, Manners JM, Kazan K. *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *Plant J* 2009;58:927–39.
- [56] Murillo I, Cavallarin L, San Segundo B. The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* 1997;9:145–56.
- [57] Campo S, Carrascal M, Coca M, Abián J, San Segundo B. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* 2004;4:383–96.