



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ASOCIACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE FUMONISINA B1  
Y LA VIRULENCIA DE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

EDUARDO ALEJANDRO GALEANA SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2014



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:** Profesora: Dra. Sobeida Sánchez Nieto.  
**VOCAL:** Profesor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra.  
**SECRETARIO:** Profesora: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño.  
**1er. SUPLENTE:** Profesora: M en C. Beatriz Ruiz Villafán.  
**2° SUPLENTE:** Profesora: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez.

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 101 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA Y LA SUPERVISIÓN TÉCNICA DE LA M. EN C. MARÍA MANUELA NÁJERA MARTÍNEZ.**

---

**DR. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
ASESOR**

---

**M. EN C. MARÍA MANUELA NÁJERA MARTÍNEZ  
SUPERVISOR TÉCNICO**

---

**EDUARDO ALEJANDRO GALEANA SÁNCHEZ  
SUSTENTANTE**

## ABREVIATURAS.

**AAL** = Toxina producida por *Alternaria alternata*.

**ABA** = Ácido abscísico.

**ACN** = Acetonitrilo.

**AF** = Ácido ferúlico.

**AG** = Ácido giberélico.

**a<sub>w</sub>** = Actividad de agua.

**cm** = centímetro.

**DAMPs** = Patrones Moleculares Asociados a Daño.

**dpi** = días post-infección.

**EROs** = Especies Reactivas de Oxígeno.

**F.D.** = Factor de dilución.

**FB1** = Fumonisina B1.

**GIP1** = Proteína Inhibitoria de Glucanasa 1.

**GYAM** = Glucosa Extracto de levadura Asparagina Ácido málico.

**h** = hora.

**hpi** = horas post-infección.

**HPLC** = Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

**HR** = Respuesta de Hipersensibilidad.

**IC<sub>50</sub>** = Concentración inhibitoria 50.

**KDa** = Kilodaltón

**Kg** = Kilogramo.

**MAMPs** = Patrones Moleculares Asociados a Microbios.

**mg** = miliogramo.

**min** = minuto.

**mm** = milímetro.

**NADH** = Nicotinamida adenina dinucleótido.

**nm** = nanómetro

**OPA** = *o*-phthaldialdehido.

**PAGE** = Electroforesis en gel de poliacrilamida.

**PAL** = Fenilalanina amonio liasa.

**PAMPs** = Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

**PCD** = Muerte Celular Programada.

**PDA** = Agar Papa Dextrosa.

**PKS** = Policétido sintasa.

**PRs** = Relacionado a Patogénesis.

**rpm** = revoluciones por minuto.

**SAMs** = Micotoxinas Análogas a la Esfinganina.

**SDS** = Duodecil sulfato de sodio.

**TEMED** = N,N,N,N'-Tetrametileno Diamina.

**vol** = volumen.

**μL** = microlitro.

| <b>ÍNDICE GENERAL.</b>   | <b>Pag.</b> |
|--|-------------|
| <b>I. RESUMEN.</b>   | <b>1</b>    |
| <b>II. INTRODUCCIÓN.</b>   | <b>2</b>    |
| <b>1. <i>Fusarium verticillioides</i>: Patógeno del maíz (<i>Zea mays</i>).</b>  | <b>2</b>    |
| 1.1 Generalidades.   | 2           |
| 1.2 Taxonomía de <i>Fusarium verticillioides</i> .   | 3           |
| 1.3 Características de <i>Fusarium verticillioides</i> .   | 3           |
| 1.3.1 Características microscópicas.   | 3           |
| 1.3.2 Características macroscópicas.   | 4           |
| 1.4 Genética y Genómica.   | 5           |
| 1.5 Producción de micotoxinas.   | 6           |
| 1.6 Importancia, ubicuidad y pérdidas económicas.  | 8           |
| <b>2. Fumonisina B1 (FB1).</b>   | <b>9</b>    |
| 2.1 Importancia.   | 9           |
| 2.2 Estructura y propiedades químicas.   | 10          |
| 2.3 Mecanismos de acción de la FB1 (Blancos moleculares).  | 12          |
| 2.3.1 Efecto sobre la N-acetil transferasa y el metabolismo de esfingolípidos.   | 12          |
| 2.3.2 Inhibición de la ATPasa de protones (H <sup>+</sup> ) membranal.   | 12          |
| 2.3.3 Acción sobre las enzimas de defensa fúngica: Las glucanasas β-(1-3).   | 13          |
| 2.4 Síntesis de Fumonisininas.   | 15          |
| 2.5 Factores que afectan la síntesis de Fumonisininas.   | 17          |
| 2.5.1 Temperatura y Humedad.   | 17          |
| 2.5.2 Efecto del pH y factores nutricionales.  | 18          |
| 2.6 Genes que participan en la regulación de la síntesis de fumonisininas.   | 19          |
| <b>3. Interacción <i>F. verticillioides</i> – maíz.</b>  | <b>21</b>   |
| 3.1 Generalidades e importancia de la planta del maíz.   | 21          |
| 3.2 Etapas de desarrollo de la planta de maíz.   | 22          |
| 3.2.1 Germinación.   | 22          |
| 3.2.2 Establecimiento de la plántula.  | 22          |
| 3.2.3 Desarrollo vegetativo.   | 23          |
| 3.2.4 Floración y polinización.  | 23          |
| 3.2.5 Llenado de grano y senescencia.  | 24          |
| 3.3 Función de las enzimas hidrolíticas en la respuesta de defensa vs. hongos necrótrofos (β-1,3-Glucanasas y quitinasas). | 25          |
| 3.4 Resistencia en maíz a <i>Fusarium verticillioides</i> y a FB1.   | 27          |
| 3.4.1 Mecanismos de resistencia.   | 29          |
| <b>4. ANTECEDENTES</b>   | <b>31</b>   |
| <b>III. HIPÓTESIS.</b>   | <b>32</b>   |
| <b>IV. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULARES.</b>   | <b>32</b>   |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>  | <b>33</b>   |
| <b>A. Preparación de medios de cultivo y material biológico.</b>   | <b>33</b>   |
| 1. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).  | 33          |
| 2. Preparación del inóculo y conteo de conidias.   | 33          |
| 3. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz.   | 34          |
| 4. Preparación de medio GYAM e inoculación con <i>F. verticillioides</i> .   | 34          |
| 5. Inoculación de embriones de maíz con <i>F. verticillioides</i> .  | 35          |
| 6. Extracción de FB1 de embriones de maíz infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> .                                 | 35          |

|   | Pag.      |
|---|-----------|
| <b>B. Análisis de FB1 en medio GYAM y en embriones infectados por HPLC.</b>   | <b>36</b> |
| 7. Preparación de estándares de FB1 y muestras.   | 36        |
| 8. Corrida de muestras por HPLC.  | 36        |
| <b>C. Ensayo de Actividad de las <math>\beta</math>-1,3-glucanasas de maíz en respuesta a la infección por <i>F. verticillioides</i>.</b>         | <b>38</b> |
| 9. Infección y recolección de embriones para extracción de proteína total.  | 38        |
| 10. Extracción de proteínas totales de los embriones de maíz.   | 38        |
| 11. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford (Bradford, 1976).  | 38        |
| 12. Electroforesis nativa para observar la actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas en gel. (Sánchez-Rangel, et al 2012).                             | 38        |
| 13. Revelado de la actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en gel. (Sánchez-Rangel et al, 2012).   | 39        |
| 14. Ensayo de actividad total de glucanasas.  | 39        |
| <b>D. Ensayos de infección en plántulas de maíz.</b>  | <b>40</b> |
| 15. Desinfección de semillas de maíz.   | 40        |
| 16. Infección en semillas germinadas de maíz (Gao, et al 2007).   | 40        |
| 17. Desarrollo de plántulas de maíz.  | 41        |
| 18. Ensayo de infección en hojas (Covarelli et al. 2012).   | 41        |
| 19. Ensayo de infección en tallo (Sagaram et al. 2007).   | 42        |
| 20. Efecto de la infección en el crecimiento de las plántulas (Covarelli et al. 2012).  | 42        |
| <b>VI. RESULTADOS.</b>  | <b>43</b> |
| <b>1. Producción de FB1 en las distintas cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>.</b>  | <b>43</b> |
| <b>2. Relación entre la producción de FB1 y la conidiación <i>in planta</i>.</b>  | <b>45</b> |
| <b>3. Efectos de <i>Fusarium verticillioides</i> en la germinación y colonización de embriones de maíz.</b>                                       | <b>47</b> |
| <b>4. Efecto de la infección de <i>Fusarium verticillioides</i> sobre la actividad de <math>\beta</math>-1,3-glucanasas de maíz.</b>              | <b>49</b> |
| 4.1 Actividad total de $\beta$ -1,3-glucanasas en respuesta a la infección de <i>F. verticillioides</i> .   | 49        |
| 4.2 Actividad en gel de las distintas isoformas de las $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en respuesta a la infección de <i>F. verticillioides</i> . | 50        |
| <b>5. Ensayos de Infección en plántulas de maíz.</b>  | <b>53</b> |
| 5.1 Severidad en tejido infectado de embriones post-germinados de maíz.   | 54        |
| 5.2 Efecto en la elongación radicular.  | 54        |
| 5.3 Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz.  | 56        |
| 5.4 Infección de <i>F. verticillioides</i> en tallos de maíz.   | 58        |
| 5.5 Infección de <i>F. verticillioides</i> en hojas de maíz.  | 60        |
| <b>VII. DISCUSIÓN.</b>  | <b>62</b> |
| <b>VIII. CONCLUSIONES.</b>  | <b>70</b> |
| <b>IX. PERSPECTIVAS.</b>  | <b>71</b> |
| <b>X. REFERENCIAS.</b>  | <b>72</b> |
| <b>XI. APÉNDICE.</b>  | <b>79</b> |

| <b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>  | <b>Pag.</b> |
|--|-------------|
| <b>Figura 1.</b> Características microscópicas de <i>Fusarium verticillioides</i> .  | 4           |
| <b>Figura 2.</b> Estructura de algunas micotoxinas y metabolitos secundarios producidas por algunos hongos del género <i>Fusarium</i> .  | 8           |
| <b>Figura 3.</b> Estructura básica de las fumonisinas del grupo B.   | 10          |
| <b>Figura 4.</b> Estructura de las bases esfingoideas de cadena larga.   | 11          |
| <b>Figura 5.</b> Mecanismos de acción de la FB1.   | 14          |
| <b>Figura 6.</b> Clúster FUM con los genes de biosíntesis, transporte y excreción de la FB1.   | 14          |
| <b>Figura 7.</b> Ruta de biosíntesis propuesta para la FB1.  | 16          |
| <b>Figura 8.</b> Etapas de desarrollo de la planta de maíz.  | 24          |
| <b>Figura 9.</b> Estructuras químicas de los principales componentes de la pared de hongos filamentosos.   | 26          |
| <b>Figura 10.</b> Principales enfermedades del maíz asociadas a <i>F. verticillioides</i> .  | 29          |
| <b>Figura 11.</b> Estructura química de los ácidos fenólicos: ácido ferúlico y ácido cumárico.   | 30          |
| <b>Figura 12.</b> Derivatización de la FB1 con OPA para formar el complejo fluorescente.   | 37          |
| <b>Figura 13.</b> Fundamento de los ensayos de la determinación de la actividad de las $\beta$ -1,3 glucanasas de maíz en la respuesta a la infección de <i>F. verticillioides</i> . | 40          |
| <b>Figura 14.</b> Análisis de fumonisina B1 por HPLC.  | 43          |
| <b>Figura 15.</b> Producción de FB1 por cuatro distintas cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> .  | 44          |
| <b>Figura 16.</b> Conidiación de las cuatro cepas de <i>F. verticillioides</i> utilizadas en la infección de embriones de maíz tras 48 horas de inoculación.                         | 45          |
| <b>Figura 17.</b> Relación entre la producción de FB1 y la conidiación de las diferentes cepas de <i>F. verticillioides</i> .  | 46          |
| <b>Figura 18.</b> Embriones de maíz infectados con 50,000 conidias de las distintas cepas de <i>F. verticillioides</i> .   | 47          |
| <b>Figura 19.</b> Efecto en la germinación de embriones de maíz y su colonización por cepas de <i>F. verticillioides</i> con distinta producción de FB1.                             | 48          |

|  | <b>Pag.</b> |
|--|-------------|
| <b>Figura 20.</b> Efecto de la infección de 4 cepas de <i>F. verticillioides</i> en embriones de maíz sobre la actividad total de las $\beta$ -1,3-glucanasas.                   | <b>49</b>   |
| <b>Figura 21.</b> Actividad de las diferentes isoformas de $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en gel resuelto en condiciones nativas.   | <b>51</b>   |
| <b>Figura 22.</b> Actividad de las isoformas de las $\beta$ -1,3-glucanasas por la infección de cepas de <i>F. verticillioides</i> .   | <b>52</b>   |
| <b>Figura 23.</b> Geles cargados con las proteínas totales del extracto de los embriones infectados con las diferentes cepas a las 24 h y 30 h.                                  | <b>53</b>   |
| <b>Figura 24.</b> Embriones de maíz inoculados con 50,000 conidias de las distintas cepas de <i>F. verticillioides</i> tras 72 horas de germinación mediante punción.            | <b>55</b>   |
| <b>Figura 25.</b> Efecto de la elongación radicular tras 48 horas de infección por punción con 50,000 conidias de las cepas PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3 en semillas de maíz ZR-76. | <b>55</b>   |
| <b>Figura 26.</b> Efecto de la elongación radicular tras 48 horas de infección por punción con 50,000 conidias de las cepas PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3 en semillas de maíz ZR-76. | <b>56</b>   |
| <b>Figura 27.</b> Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz tras 21 días post-plantadas.   | <b>57</b>   |
| <b>Figura 28.</b> Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz tras 21 días post-plantadas.   | <b>57</b>   |
| <b>Figura 29.</b> Tallos de maíz infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> .  | <b>59</b>   |
| <b>Figura 30.</b> Lesiones provocadas por las 4 cepas de <i>F. verticillioides</i> en hojas de maíz.   | <b>61</b>   |
| <b>Figura 31.</b> Inoculación de <i>F. verticillioides</i> en hojas de maíz.   | <b>61</b>   |

## ÍNDICE DE TABLAS.

Pag.

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Producción de los principales cereales en el mundo durante el año 2012/2013.                          | 21 |
| <b>Tabla 2.</b> Principales países productores de maíz y su producción durante el año 2012/2013.                      | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> Efecto de la FB1 en dos distintos genotipos de maíz.  | 28 |
| <b>Tabla 4.</b> Efecto del ácido ferúlico en la producción de fumonisinas de dos cepas de <i>F. verticillioides</i> . | 30 |
| <b>Tabla 5.</b> Contenido de ácido ferúlico en distintos genotipos de maíz frente a la pudrición de mazorca.          | 30 |
| <b>Tabla 6.</b> Producción de FB1 de diferentes cepas aisladas en México en 2 distintos sustratos sólidos.            | 31 |
| <b>Tabla 7.</b> Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu, Modelo RF-10AXL.                                  | 37 |
| <b>Tabla 8.</b> Porcentaje de germinación y de colonización de embriones infectados de maíz.                          | 48 |

## I. RESUMEN.

*Fusarium verticillioides* es el principal microorganismo patógeno aislado del maíz (*Zea mays L.*) y causa enfermedades en distintos tejidos de la planta como la pudrición de mazorca y tallo. Este hongo filamentoso produce varias toxinas de las cuales, la fumonisina B1 (FB1) es la más abundante e importante por su actividad biológica. Esta micotoxina, además de ser un factor potencial en la virulencia del hongo, se acumula en granos y mazorcas por lo que el consumo de productos contaminados se ha asociado a distintos padecimientos en animales y humanos.

En maíz, se han identificado tres blancos moleculares de la FB1 pues inhibe la enzima esfinganina *N*-aciltransferasa, a la ATPasa de protones de membrana plasmática y a las  $\beta$ -1,3 glucanasas básicas. Estas últimas participan en la respuesta de defensa de la planta contra hongos patógenos.

La producción de FB1 es altamente variable entre las diferentes cepas de este hongo; algunas de ellas no producen FB1 o la sintetizan en niveles muy bajos y otras cepas producen altas cantidades de esta micotoxina. En este trabajo se aprovechó esta diversidad genética y se caracterizaron cepas de *F. verticillioides* con alta producción de FB1 y dos cepas de baja producción. Estas cepas se emplearon en varios ensayos en plántulas y plantas de maíz para evaluar su virulencia relativa. En general, se encontró que las cepas con alta producción de FB1 causaron síntomas y daños más severos en la mayoría de los parámetros estudiados, así como una mayor capacidad de colonización del tejido de maíz.

Debido a que la FB1 es un modulador de la actividad de las  $\beta$ -1,3 glucanasas, también se probó el efecto de estas cuatro cepas en la actividad enzimática en un modelo de embriones en germinación. Se encontró que las cepas de alta producción de FB1 suprimieron la actividad de las glucanasas básicas a las 24 horas post-infección, mientras que el efecto a las 30 horas no fue tan claro debido a la inducción de las isoformas ácidas.

Los resultados obtenidos muestran una asociación entre la producción de FB1 de las distintas cepas y la capacidad de estas de infectar tejidos y causar lesiones o colonizar el mismo. Además aporta información sobre la función efectora de la FB1 en la modulación de las  $\beta$ -1,3 glucanasas como respuesta de defensa en esta interacción planta-patógeno.

## II. INTRODUCCIÓN.

### 1. *Fusarium verticillioides*: Patógeno del maíz (*Zea mays*).

#### 1.1 Generalidades

Diversos microorganismos patógenos son capaces de producir daños en la planta del maíz (*Zea mays* L.). Estos microorganismos –bacterias, virus y hongos– son agentes causales de diversas enfermedades que afectan a la planta en distintos estadios de desarrollo. Entre estos patógenos destaca el hongo *Fusarium verticillioides* por su alta incidencia en maíz y por la capacidad de producir daños en diversos tejidos de la planta, lo que reduce la cantidad y calidad del grano que se traduce en graves pérdidas económicas (Leslie et al. 1996).

*F. verticillioides* sobrevive como endófito, sin causar síntomas o daño aparente a la planta, en hojas, tallos, granos y raíces (Fanelli et al. 2011). También puede presentarse como necrótrofo, pues causa daño en tallo, raíces, mazorca y granos para luego proliferar como saprófito en el tejido muerto (Kommedahl et al. 1981). El hongo afecta todos los estados de crecimiento de la planta y tiene la capacidad de producir diversas micotoxinas (Marasas et al. 1984, Desjardins 2006) que contribuyen al proceso de infección. Además, muchas micotoxinas son contaminantes de los productos alimenticios que se derivan de esta planta y causan distintas toxicosis a animales y humanos que los consumen.

*Fusarium* spp. está ampliamente distribuido en el suelo y subsuelo, así como en partes aéreas de la planta, residuos vegetales y otros sustratos orgánicos. Es común su aislamiento tanto en regiones tropicales y templadas, como en regiones desérticas, alpinas e incluso zonas árticas (Nelson et al. 1994).

El amplio rango de distribución de *F. verticillioides* se debe también a la facilidad que tienen sus conidias de dispersarse por el aire e infectar partes aéreas de la planta como son el estigma (flor femenina) y algunas partes del tallo, hojas, granos o mazorcas que tienen algún tipo de herida mecánica o lesión generada principalmente por insectos. Los propágulos –micelio, conidias– sobreviven en el

suelo por periodos largos de tiempo y de ahí infectan a las semillas cuando éstas germinan. El hongo se mueve hasta el centro de la plántula subiendo por el tallo hasta alcanzar la mazorca y de ahí se expande a otros granos (Oren et al. 2002).

## **1.2 Taxonomía de *Fusarium verticillioides*.**

La taxonomía de las especies del género *Fusarium* es sumamente compleja pues la morfología de los conidióforos y macroconidias depende del medio de cultivo en el que crezcan. En 1935 Wollenweber y Reinking publicaron su trabajo monumental tras años de investigación sobre la taxonomía de estas especies en “*Die Fusarien*”. Este trabajo fue el punto de partida para posteriores investigaciones. Se tenían más de 1000 especies, variedades y formas llamadas en base a observaciones y clasificaciones que con el tiempo siguieron dando lugar a problemas con algunas especies ya que no era clara su inclusión en alguno de los grupos descritos.

La clasificación actual agrupa varias especies con características comunes en secciones y en la cual *F. verticillioides* pertenece a la sección *Liseola* (Nelson et al. 1983). Por su reproducción sexual, *F. verticillioides* pertenece a la subdivisión *Ascomycota* y la fase perfecta o telomorfa corresponde a *Gibberella moniliformis*.

## **1.3 Características de *Fusarium verticillioides*.**

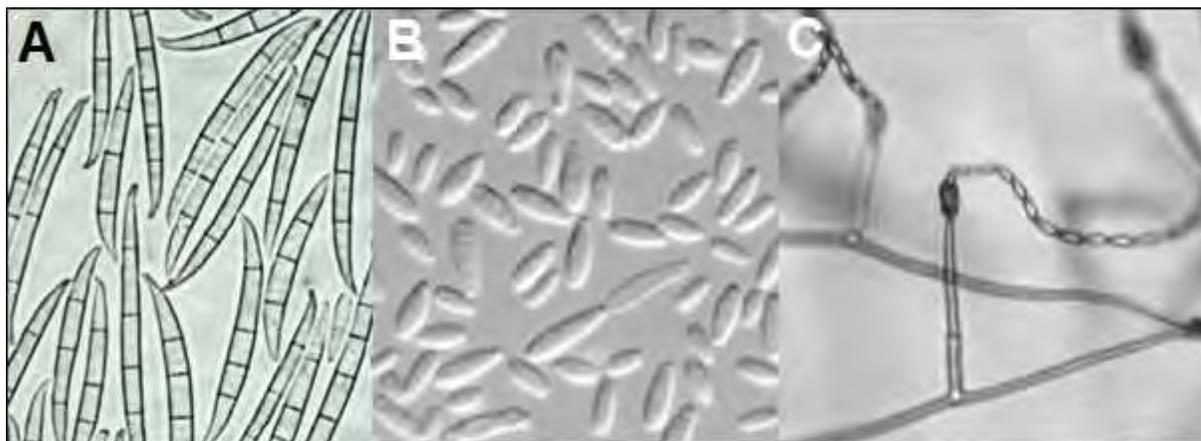
### **1.3.1 Características microscópicas:**

**Macroconidias:** Son estructuras pluricelulares largas y delgadas que contienen comúnmente entre 5 y 6 septos. Pueden tener forma de hoz o media luna o ser casi rectos con la superficie dorsal y ventral casi paralela (Nelson et al. 1992). La morfología de la célula apical es curva y a veces cónica en la punta, mientras que la célula basal tiene forma de pie (Nelson et al. 1983). *F. verticillioides* forma pocas macroconidias y en algunas cepas no se observan. Estas estructuras se derivan de los esporodocios de color marrón-amarillo o naranja (Leslie et al. 2006) (**Fig 1A**).

**Microconidias:** Son células ovaladas y comúnmente sin septos y de base aplanada (**Fig 1B**). Son abundantes y se ordenan en cadenas largas para formar pequeños agregados que se conocen como cabezas falsas (Nelson et al. 1983) (**Fig**

**1C).** Ocasionalmente, las monofiáides (estructuras de reproducción que parten del micelio y donde brota una conidia por célula) pueden estar cercanas una de otra y pueden observarse en forma de “V” o con apariencia de “orejas de conejo” (Leslie et al. 2006). Los conidióforos pueden ser ramificados o no ramificados. Por su número y tamaño, las microconidias son fácilmente dispersadas por el aire, sirviendo como inóculo para la infección (Munkvold. 2003).

Algunas especies del género *Fusarium* producen normalmente clamidiosporas (estructuras de reproducción que se originan directamente del micelio y constan de varias células). *F. verticillioides* no produce estas estructuras pero algunas cepas presentan células hinchadas en la hifa que pueden confundirse con clamidiosporas o pseudoclamidiosporas (Leslie et al. 2006), y conducir a una clasificación errónea.



**Figura 1. Características microscópicas de *Fusarium verticillioides*:** A. Morfología de macroconidios, B morfología de microconidias y C. Microconidias agrupadas en cadenas largas. (Nelson et al. 1983; Leslie et al. 2006).

### 1.3.2 Características macroscópicas.

En el medio de cultivo agar papa dextrosa o PDA (Potato Dextrose Agar) *F. verticillioides* desarrolla al inicio un micelio blanco que se va pigmentando conforme envejece el cultivo. Estos pigmentos varían entre violeta, rosa o naranja. Con el tiempo se desarrollan esclerocios, que es micelio cubierto por melanina de color azul oscuro. (Leslie et al. 2006). El medio agar hoja de clavel o CLA (Carnation leaf agar) se utiliza para promover el desarrollo del micelio y la producción de macroconidias

difíciles de encontrar. Su morfología es cercana a la observada en condiciones naturales con una variación fenotípica reducida. Es el medio de elección para la identificación de especies (Nelson et al. 1994).

Para facilitar la observación de las cadenas largas de microconidias se suele utilizar el medio KCl ya que promueve aún más el alargamiento de estas cadenas haciéndolas más fáciles de observar ya que disminuye la humedad en el micelio e incluso se puede llegar a apreciar la presencia de monofiálides y polifiálides (Nelson et al. 1994).

#### **1.4 Genética y Genómica.**

*F. verticillioides* tiene 12 cromosomas de los cuales el número 12 es dispensable ya que el tamaño de este es de menor y los genes contenidos no codifican para funciones relevantes (Xu et al. 1995). En contraste, dentro del cromosoma 1, se localiza el clúster FUM, que contiene los genes responsables de la síntesis de fumonisinas.

El tamaño total de su genoma es aproximadamente 46 Mb (Leslie et al 2006). En 2006 se completó la secuencia del genoma de *F. verticillioides* (Borad Institute/MIT CenterforGenomeResearch[[www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium\\_verticillioides/Home-html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_verticillioides/Home-html)]; Ma et al. 2010) . El análisis *in silico* permitió identificar decenas de genes candidatos a enzimas de síntesis de micotoxinas y de otros metabolitos con actividad biológica (Desjardins et al. 2007). Existen diversas mutantes dentro de esta especie que pueden variar en fenotipos que van desde cambios morfológicos en las cadenas de microconidias, desarrollo anormal en ciertas condiciones hasta variaciones en la cantidad de pigmentos, micotoxinas y resistencia a ciertos metabolitos (Leslie et al. 2006).

Hay reportes de fragmentos de DNA que son específicos tanto para *F. verticillioides* como para genes de biosíntesis de fumonisinas. La mayoría de los estudios de estos fragmentos se basan en grupos relativamente pequeños de cepas por lo que ninguno de estos diagnósticos ha sido aceptado aún para un uso amplio y a gran escala (Leslie et al. 2006).

## 1.5 Producción de micotoxinas.

Las toxinas producidas por hongos son llamadas micotoxinas y son metabolitos secundarios que pueden llegar a tener una alta toxicidad y causar graves daños a plantas, animales y humanos. Tienen diferentes propiedades físicas, químicas, biológicas y toxicológicas. Entre las principales micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium* se encuentran:

**Fumonisinias:** Son el principal grupo de micotoxinas producidas por *F. verticillioides* y otras especies de la sección *Liseola* (Stepien et al. 2010). La mayoría de las cepas de esta especie las sintetizan pero los niveles son muy variables; algunas cepas producen cantidades muy altas y otras solamente trazas (Nelson et al. 1995; Sánchez-Rangel et al. 2005, Marasas 2001). Estas toxinas se descubrieron en 1988 como promotores de cáncer hepático en ratas (Marasas et al. 1988). Por su relevancia para este trabajo, se describirá con más detalle un apartado completo referente a las fumonisinias (**Fig 2a**).

**Tricotecenos:** Son sesquiterpenos tricíclicos que contienen una doble ligadura en el carbono 9 y 10 (C-9, C-10) y un anillo epóxido entre los carbonos 12 y 13. Hay cuatro clases de tricotecenos y *Fusarium spp.* produce los tipos A y B. Estas toxinas están ligadas a toxicosis crónicas y letales en humanos y animales. Su consumo provoca irritación dérmica severa en la piel de animales de experimentación, así como hemorragias en el tracto gastrointestinal y necrosis de diversos tejidos. El principal mecanismo de estas toxinas es la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariontes. (Desjardins & Proctor 2007).

Los tricotecenos de *Fusarium* tienen varios patrones de oxigenación y esterificación en distintas posiciones. Los principales compuestos de esta familia son la toxina T-2, toxina HT-2 y el diacetoxiescirpenol (DAS) del grupo A, el nivalenol y desoxinivalenol (DON) o vomitoxina del grupo B (Nicholson 2009) (**Fig 2b**). Los tricotecenos de este último grupo tienen una potente actividad inmunosupresiva.

**Zearalenonas:** Son moléculas estrogénicas no esteroideas y los porcinos son los mamíferos más susceptibles a esta toxina (Desjardins & Proctor 2007) (**Fig 2c**).

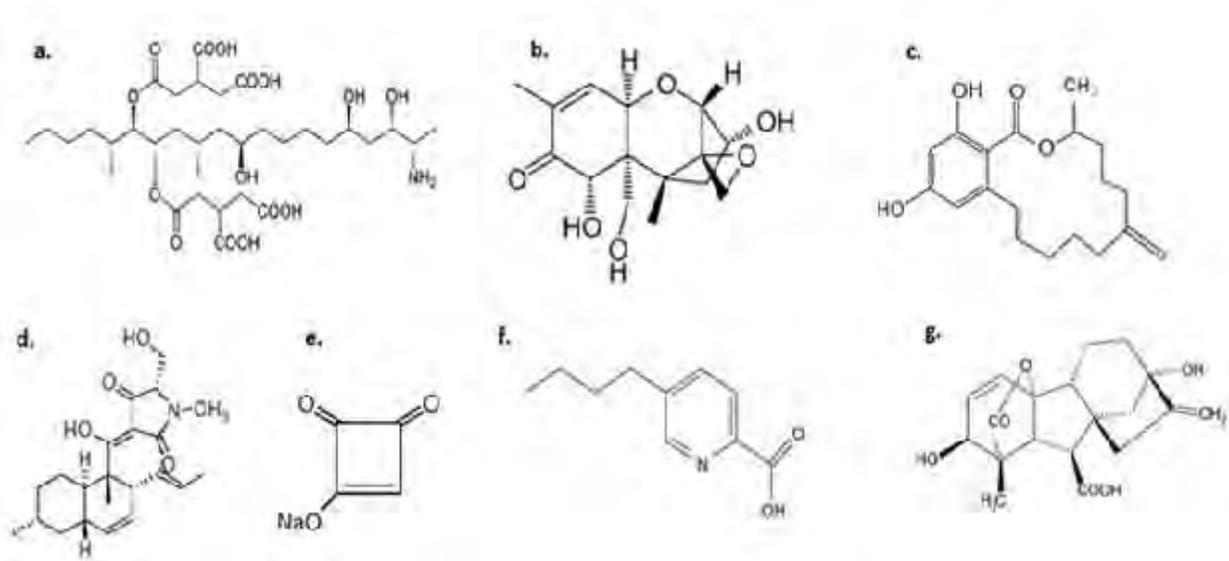
**Equisetina:** Es un derivado del *N*-metil-2,4-pirrolidona (1-metil-3-acil-5-hidroximetil-2,4-diona) y tiene un interés particular debido a su actividad contra el VIH debido a que inhibe la integrasa de este virus. Estructuralmente tiene una gran similitud con la lovastatina (anti-hipercolestéremico), lo que ha hecho buscar a esta molécula como precursora de síntesis de la equisetina (Sims et al. 2005) (**Fig 2d**). Tiene una actividad discreta contra bacterias Gram-positivas y toxicidad moderada en ratones.

**Fusarinas:** Las fusarinas son 2-pirrolidonas con una metilación en un lado de la cadena poliinsaturada. La fusarina C contiene un epóxido entre el carbono 13 y 14. Son compuestos mutagénicos, y por la prueba de Ames se determinó que es 50% más activa que las aflatoxinas. Sin embargo, no se ha demostrado que tengan actividad como promotor de cáncer (Desjardins & Proctor 2007).

**Moniliformina:** Esta micotoxina tiene una estructura de ciclobuteno y es producida por distintas especies del género *Fusarium* (**Fig 2e**). Es un compuesto altamente tóxico que causa rápidamente la muerte y lesiones patológicas principalmente la degeneración y necrosis en el miocardio (Nelson 1992).

**Ácido fusárico:** Es una micotoxina de toxicidad baja a moderada que sinergia la actividad de otras micotoxinas. Existen dos compuestos análogamente relacionados y tienen una alta actividad fitotóxica. Puede quelar metales como el Fe lo que le permite inhibir enzimas –porfirina oxidasa– ocasionando una reducción en la respiración de la planta y la falta de desarrollo en raíces (Jackson et al 1996) (**Fig 2f**)

**Giberelinas:** Fueron descubiertas como causantes de una enfermedad en plantas de arroz que provocaba una elongación anormal en los tallos. Esto se debía a la infección del hongo *Gibberella fujikuroi* que sintetiza el ácido giberélico (**Fig 2g**). Esta molécula actúa como hormona vegetal y permitió el descubrimiento de las giberelinas como hormonas producidas en plantas (Lincoln & Zeiger 2002). Las giberelinas son diterpenos tricíclicos de 20 carbonos y existen más de 40 compuestos semejantes (Malonek et al. 2005).



**Figura 2. Estructura de algunas micotoxinas y metabolitos secundarios producidas por algunas especies del género *Fusarium*. a. Fumonisina B1. b. DON (Tricoteceno). c. Zearalenona. d. Equisetina. e. Moliniformina. f. Ácido fusárico. g. Ácido giberélico.**

### 1.6 Importancia, ubicuidad y pérdidas económicas.

Además del maíz, *F. verticillioides* ataca otros cultivos de importancia económica como son trigo, arroz, sorgo, avena, cebada, caña de azúcar, mango, piña, plátano entre otros (Malonek et al. 2005; Nicholson 2009).

Las pérdidas materiales ocasionadas por la infección de este hongo pueden llegar a ser hasta de un 50%-60% (Nicholson 2009). Se estima que durante la década de los 90's, las pérdidas económicas de cereales relacionadas con infecciones de *Fusarium* fueron de \$1000 millones en E.U.A. y de \$220 millones en Canadá (Windels 2000).

En México hay reportes que en estados como Tlaxcala, Puebla y México la reducción en la producción de maíz es de un 25%-35% (DGSA-CNRF, SENASICA 2011). Aunado a esto, las condiciones socioeconómicas pueden agravar las pérdidas ocasionadas, así como la aparición de enfermedades relacionadas al consumo de estas micotoxinas (FAO, 2001; García-Aguirre 2010).

## 2. FUMONISINA B1 (FB1).

### 2.1 Importancia

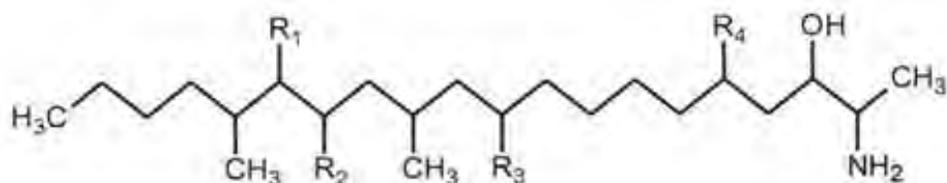
Las fumonisinas son metabolitos secundarios e inicialmente se asumía que por ello eran producidos en etapas tardías de la interacción planta-microorganismo, durante la etapa saprofitica del hongo. Sin embargo, se ha demostrado que éstas son sintetizadas durante las etapas tempranas de la infección e incluso durante el estado endofítico. Asimismo se han encontrado niveles importantes de esta micotoxina en granos sin evidencias de infección (5-38 µg/g) (Bacon et al. 1992; Munkvold & Desjardins 1997).

La consecuencia de la infección de granos por *F. verticillioides* es la contaminación de éstos con fumonisinas. El consumo de estos granos se ha asociado a distintas toxicosis en animales y humanos. Se ha visto que la ingesta de maíz contaminado con fumonisinas provoca leucoencefalomacia en equinos y edema pulmonar en puercos (Kellerman et al. 1990; Harrison 1990). La fumonisina es un iniciador de cáncer experimental de hígado en ratas y tiene actividad nefrotóxica en animales de laboratorio (IARC 2002). El consumo de maíz contaminado se ha asociado a una alta incidencia de cáncer de esófago en humanos (Li et al. 1980; Makaula et al. 1996). También se ha sospechado como agente causal de defectos del tubo neural asociados por el consumo de tortillas de maíz contaminadas con fumonisinas (Marasas et al. 2004).

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) clasifica a las fumonisinas dentro del grupo 2B como “posibles carcinogénicos en humanos” (IARC, 2002). Además, la “Food and Drug Administration” (FDA) de E.U.A. ha publicado diversas guías, recomendando límites máximos de contenido de fumonisinas para ciertos productos de consumo humano o animal. Por ejemplo para productos de maíz molido seco como harinas no deben tener niveles superiores a 2 mg/Kg o el contenido de fumonisinas en alimentos para caballos no debe ser mayor de 5 mg/kg. Actualmente en el país no existen normas que regulen la cantidad de fumonisinas permitidas para consumo humano o animal.

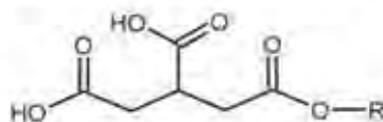
## 2.2 Estructura y propiedades químicas.

Se han identificado aproximadamente 60 distintos tipos de fumonisinas y moléculas análogas, las cuales se han dividido en cuatro grupos: A, B, C y P (Musser & Plattner 1997). Las fumonisinas del grupo B son las más abundantes y de mayor importancia por su actividad biológica. Tienen un esqueleto de 20 carbonos con un grupo amino en el carbono 2 (C-2) y ácidos tricarboxílicos esterificados en C-14 y C-15. Los compuestos de este grupo (FB1, FB2, FB3, FB4) difieren por la presencia y posición de grupos hidroxilo. La fumonisina B1 (FB1) tiene hidroxilaciones en C-5 y C-10 mientras que la FB4 no posee ninguna (**Fig. 3**). La FB1, FB2 y FB3 son las principales fumonisinas encontradas naturalmente en tejidos de maíz y la FB1 constituye hasta un 75% de estas (Proctor et al. 2006).



| Compuesto       | Acrónimo | Grupo funcional |                |                |                | Peso molecular |
|-----------------|----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                 |          | R <sub>1</sub>  | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |                |
| Fumonisina B1   | FB1      | ATC             | ATC            | OH             | OH             | 721            |
| Fumonisina B2   | FB2      | ATC             | ATC            | H              | OH             | 705            |
| Fumonisina B3   | FB3      | ATC             | ATC            | OH             | H              | 705            |
| Fumonisina B4   | FB4      | ATC             | ATC            | H              | H              | 689            |
| FB1 Hidrolizada | HFB1     | OH              | OH             | OH             | OH             | 405            |

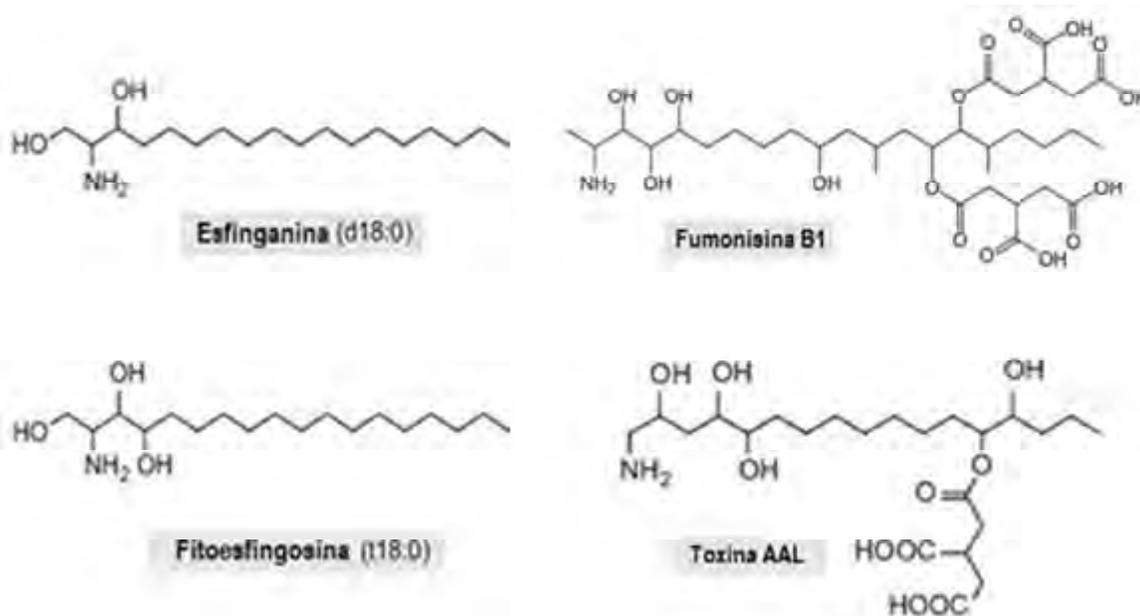
ATC Denota ácido tricarboxílico (propano-1,2,3-ácido tricarboxílico).



**Figura 3. Estructura básica de las fumonisinas del grupo B.** Las principales diferencias entre estas moléculas están en la hidroxilación de los radicales indicados en esta figura.

Las fumonisinas son compuestos polares solubles en agua, acetonitrilo-agua (1:1) y metanol. Son termoestables y resistentes a la luz (Ariño 2008). Los procesos como la fermentación alcohólica o el uso de enzimas no reducen significativamente los niveles de estas toxinas. En cambio, durante la nixtamalización, el tratamiento alcalino hidroliza los enlaces éster de los ácidos tricarboxílicos (Jackson 1996).

Las fumonisinas y la toxina-AAL (producida por el hongo *Alternaria alternata*) están clasificadas como toxinas del tipo SAM's (Sphinganine Analog Mycotoxins) por su similitud estructural con la esfinganina y otras bases esfingoideas de cadena larga (Sánchez Rangel y Plasencia, 2010) (**Fig 4**). Esta analogía estructural se asocia con su actividad biológica pues las SAMs interfieren en el metabolismo de esfingolípidos complejos al inhibir competitivamente a la enzima que acila a las bases esfingoideas, causando un desequilibrio en la homeostasis celular y provocando daños al tejido por necrosis (Abbas et al. 1994; Desjardins & Hohn 1997).



**Figura 4. Estructura de las bases esfingoideas y las SAMs:** Esfinganina y fitoesfinganina producidas en maíz; FB1 producida por *Fusarium verticillioides* y toxina AAL producida por *Alternaria alternata*.

Además de *F. verticillioides*, las otras especies que producen fumonisinas son *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum*, *F. napiforme*, *F. oxysporum* y *F. nygamai* (Nelson 1993; Desjardins & Munkvold 1997; Stepien et al. 2010). Asimismo, *Aspergillus niger* sintetiza principalmente FB2 y FB4, además de una nueva toxina de esta serie, la FB6 (Huffman et al. 2010).

## 2.3 Mecanismos de acción de la FB1 (Blancos moleculares).

La fumonisina B1 actúa sobre varias enzimas en células de maíz por lo que esta actividad podría contribuir a la infección y colonización de *F. verticillioides* (Fig 5). A continuación se describen los efectos y blancos moleculares de la FB1 en maíz.

### 2.3.1 Efecto sobre la N-acetil transferasa y el metabolismo de esfingolípidos.

La FB1 inhibe competitivamente a la enzima esfinganina *N*-acetiltransferasa que cataliza la acilación de esta base esfingoidea con palmitoil CoA para formar ceramida (Wang et al. 1991; Merrill et al. 1996; Williams et al. 2007). La inhibición provoca la acumulación del sustrato, la esfinganina, y en general un desbalance en los niveles de otras bases como la esfingosina y fitoesfingosina (Abbas et al 1994; Voss et al 2007). Debido a que las bases esfingoideas tienen funciones de mensajeros intracelulares que regulan varios procesos de crecimiento celular, desarrollo y en respuesta a estrés (Pata et al. 2010), esta alteración en los niveles induce la activación de cascadas de señalización que incluyen la expresión de genes de defensa, la activación de la vía del ácido salicílico, incremento en las especies reactivas de oxígeno y otros eventos asociados a la Respuesta de Hipersensibilidad (HR) (de la Torre-Hernández et al. 2010; Sánchez-Rangel et al. 2012).

La HR forma parte de una vía de defensa en plantas para contener la infección de patógenos biótropos que se alimentan de tejido vivo y evitar su propagación por el organismo pues el resultado es la muerte de varias células (Glazebrook 2005). Sin embargo, esta condición puede ser aprovechada por patógenos necrótrofos como *F. verticillioides*, por lo que la acción provocada por la FB1 promueve la infección y proliferación (Sánchez-Rangel y Plasencia, 2010).

### 2.3.2 Inhibición de la ATPasa de protones (H<sup>+</sup>) membranal.

La ATPasa de protones es una enzima localizada en la membrana plasmática encargada del transporte de H<sup>+</sup> desde el citoplasma al espacio apoplástico mediante la hidrólisis de ATP. Es la bomba primaria más abundante en la membrana plasmática vegetal y algunas de sus funciones son mantener el potencial de

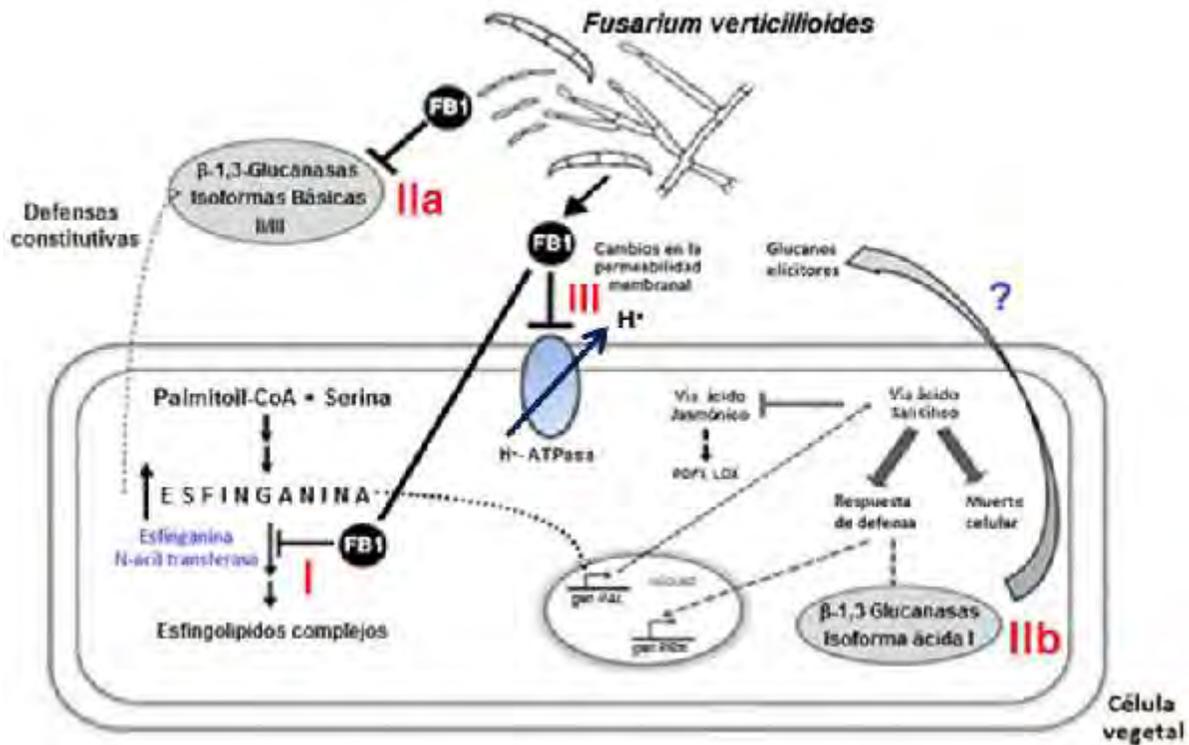
membrana y el gradiente transmembranal de protones, lo que permite la elongación celular y la apertura de estomas (Arango et al 2003; Morsomme & Boutry 2000).

*In vitro*, la FB1 inhibe a la ATPasa de protones de manera no competitiva y de forma reversible con una  $K_i$  de 10.5  $\mu\text{M}$ . Durante la germinación de embriones esta inhibición provoca una significativa reducción de la acidificación del medio, así como cambios en la permeabilidad de la membrana, y una disminución en la elongación radicular (Gutiérrez-Nájera et al 2005). De esta manera este blanco celular lleva a condiciones que podrían llegar a favorecer una infección más eficiente por parte de *F. verticillioides*.

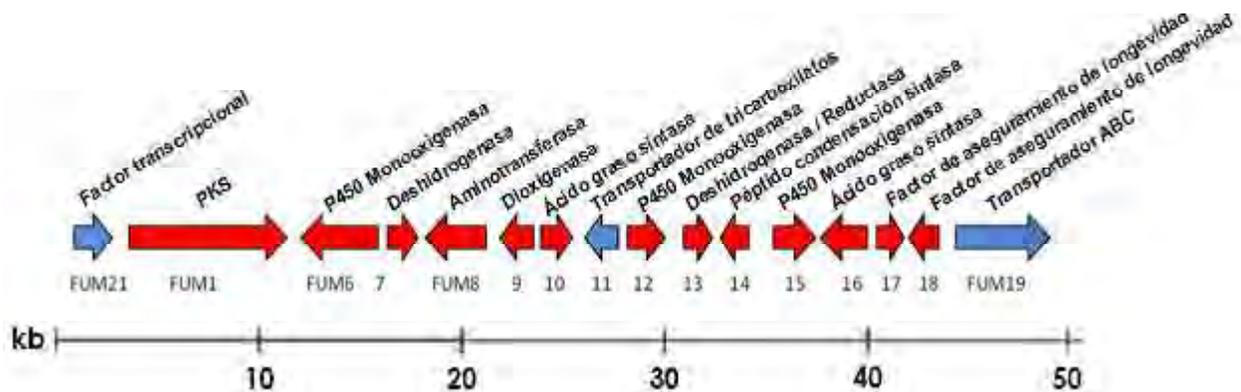
### 2.3.3 Acción sobre las enzimas de defensa fúngica: Las glucanasas $\beta$ -(1-3)

Además de los blancos descritos de la FB1, que son una enzima de retículo endoplásmico y una de membrana plasmática, recientemente se describió que la FB1 modula también la actividad de la respuesta de defensa de las  $\beta$ -1-3glucanasas en maíz (Sánchez-Rangel et al., 2012). Estas enzimas son producidas por las células vegetales e hidrolizan el enlace  $\beta$ -(1-3) en los polímeros de glucanos que forman la pared celular de los hongos. Por lo tanto, constituyen un importante mecanismo de defensa contra este tipo de microorganismos (Murillo et al. 1997).

La FB1 inhibe las isoformas constitutivas de las  $\beta$ -1,3 glucanasas aparentemente con una alta afinidad pues se estimó una  $IC_{50}$  alrededor de 50  $\mu\text{M}$ . La inhibición de estas hidrolasas que participan en la defensa, puede facilitar la colonización del hongo al suprimir parte de la respuesta inmune de la planta (Sánchez Rangel et al 2012). A su vez, una isoforma ácida es inducida al parecer mediante la vía del ácido salicílico como respuesta de defensa al ataque de este patógeno. Esta isoforma podría estar participando en la degradación de estos polímeros de glucano que generan compuestos que a su vez funcionan como elicitors que activan otras respuestas de defensa contra el hongo.



**Figura 5. Mecanismos de acción de la FB1.** I. La FB1 Inhibe la N-acil transferasa que conlleva a un aumento de esfinganina y la activación de la vía de SA que produce una muerte celular programada que es aprovechada por el patógeno necrótrofo. IIa. La FB1 inhibe también isoformas básicas de las β-1,3 glucanasas con lo que reducen las defensas del hospedero y facilita su infección. IIb. La isoforma ácida es en contraste inducida mediante la vía del SA que antagoniza la vía del JA contra patógenos necrótrofos. III. La inhibición de la H<sup>+</sup>ATPasa causa cambios en la permeabilidad de membrana y reducción en la acidificación del medio que podrían favorecer condiciones que faciliten la colonización de *F. verticillioides* durante la germinación. (Modificado de Sánchez-Rangel et al, 2012).



**Figura 6. Clúster FUM con los genes de biosíntesis, transporte y excreción de la FB1.** Las flechas indican los genes FUM y su dirección indica la ubicación y orientación. Las flechas rojas indican los genes que intervienen directamente en la biosíntesis mientras que los genes en azul codifican para otras funciones. (Modificado de Proctor et al. 2003).

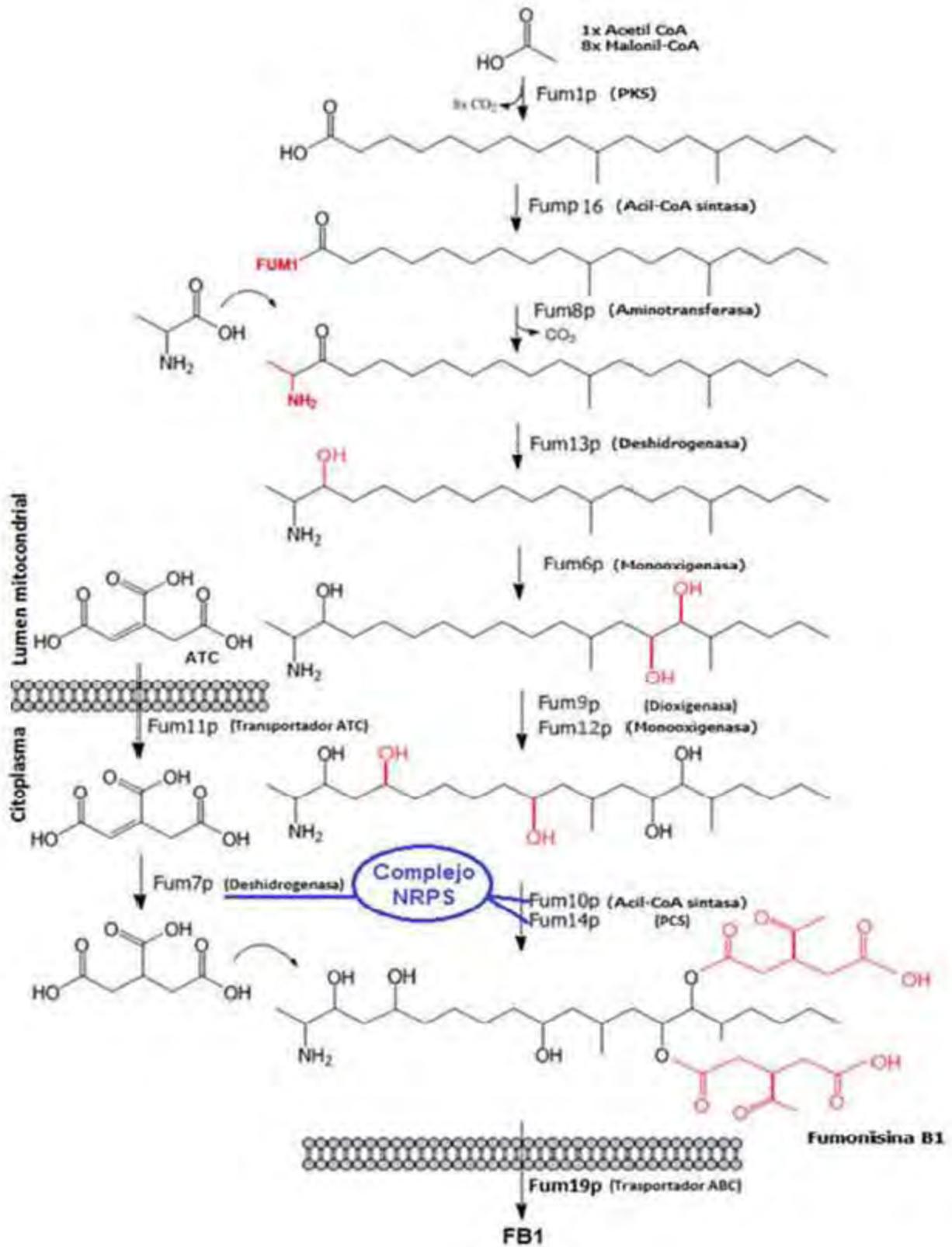
## 2.4 Síntesis de Fumonisinias

La capacidad de producir fumonisinias depende de la presencia del locus *FUM* que contiene 17 genes que codifican enzimas requeridas para la síntesis de fumonisina, y proteínas necesarias para la secreción y resistencia a la toxina. (Proctor et al. 1999, 2003; Huffman et al 2010) (**Fig 6**). Las mutaciones en algunos de estos genes, como *FUM1* y *FUM8* abaten la producción de fumonisina.

La fumonisina es sintetizada a partir de 9 unidades de acetato para formar un policétido lineal dimetilado de 18 carbonos mediante una policétido sintasa (PKS) codificada por *FUM1*, la cual es una enzima multifuncional de siete dominios catalíticos (Huffman et al. 2010) (**Fig 7**). El grupo amino de la fumonisina proviene del aminoácido *L*-alanina, añadido por una aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato (*FUM8*).

El producto de *FUM13* es una reductasa responsable de la hidroxilación del oxígeno del carbonilo en la posición 3, mientras que las hidroxilaciones de los carbonos C-5 y C-10 las realizan monoxigenasas dependientes de citocromo P450 (*FUM9* y *FUM12*). Una dioxigenasa (*FUM6*) se encarga de las hidroxilaciones en C-14 y C-15 para la esterificación posterior de los ácidos tricarbóxicos (Butchko et al. 2004; Bojja et al. 2004) que provienen probablemente de algunos derivados del ácido cítrico aunque no se ha demostrado concluyentemente cuál podría ser el precursor. Estas moléculas son introducidas al citosol por un transportador de ácidos tricarbóxicos codificado por *FUM11*.

Una vez en el interior de la célula, los productos de los genes de *FUM7*, *FUM10* y *FUM14* forman un complejo del tipo péptido sintetasa no ribosomal (nonribosomal peptide synthetase NRPS-like complex) (Zaleta-Rivera et al. 2006) que catalizan la esterificación de los ácidos tricarbóxicos mediante la formación de un enlace C-O (Huffman et al. 2010). Una vez sintetizada, la fumonisina es secretada por acción de un transportador tipo ABC codificado por *FUM19*. Los productos de *FUM17* y *FUM18* tienen una función protectora y la interrupción de estos genes no tiene efecto significativo en la síntesis de fumonisinias (Desjardins et al. 2007).



**Figura 7. Ruta de biosíntesis propuesta para la FB1.** Las proteínas codificadas por los genes FUM intervienen en diferentes reacciones de este proceso. (Modificado de Alexander, et al 2009).

## 2.5 Factores que afectan la síntesis de Fumonisinas.

Los niveles de fumonisinas que se encuentran como contaminantes en maíz son muy variables, lo que refleja la diversidad en la capacidad de producción de la micotoxina, además de que hay factores ambientales que influyen en la biosíntesis de este metabolito.

El conocer los principales factores que afectan el desarrollo y metabolismo de *F. verticillioides*, sobre todo en la biosíntesis de fumonisinas es muy importante ya que puede ayudar a controlar o mitigar en algunos casos la producción de estas micotoxinas en granos de maíz bajo ciertas condiciones.

### 2.5.1 Temperatura y Humedad.

*F. verticillioides* crece en un amplio rango de condiciones de temperatura (20°C a 37°C) y humedad (una actividad de agua,  $a_w$  de 0.90 a 0.94). Las condiciones óptimas para la germinación de conidias son una temperatura de 30°C y  $a_w$  de 0.96 a 0.98. Otras condiciones pueden ser requeridas para la síntesis óptima de micotoxinas (Leslie et al. 2006). A mayor disponibilidad de agua se tiene un mayor crecimiento de *F. verticillioides* y una mayor producción de fumonisinas. Las condiciones óptimas de producción de fumonisinas son 0.97-0.98  $a_w$  y temperaturas entre 20°C y 30°C (Marín et al. 1999; Sanchis et al. 2006).

La síntesis de fumonisina no solamente ocurre en maíz almacenado, sino también en el campo, y de hecho en esta fase es muy relevante la producción e incidencia de la micotoxina. Se ha visto en campos de EU y Canadá que cuando la temperatura promedio aumenta 1 a 2°C con respecto a años anteriores (de 19-20°C a 21-22°C) poco antes de la polinización del maíz, se incrementan los niveles de fumonisinas, que se exacerban cuando hay baja disponibilidad de agua (Shelby et al. 1994; Miller et al 1995).

### 2.5.2 Efecto del pH y factores nutricionales.

Además de los factores ambientales, los factores fisicoquímicos del entorno como el pH y la accesibilidad a nutrientes esenciales como el carbono y nitrógeno afectan la síntesis de fumonisinas. Los hongos son capaces de desarrollarse en un amplio intervalo de pH (2.5-7.5) sin embargo su desarrollo óptimo se da en condiciones ácidas. La producción de fumonisinas también se ve favorecida en valores de pH bajos mientras que a pH alcalino se reduce drásticamente (Keller et al. 1997; Flaherty et al. 2003). El intervalo de pH óptimo para la producción de fumonisinas es entre 3.0 y 3.5, pero un pH mayor a 3.5 favorece el crecimiento del hongo y a mayor biomasa también se incrementan los niveles de la toxina excretada.

Varios genes, fuera del locus *FUM* que se encuentran distribuidos en el genoma de *F. verticillioides*, funcionan en la regulación del desarrollo, conidiación, producción de pigmentos y síntesis de fumonisinas. El gen *PAC1* está estrechamente relacionado con la represión de la síntesis de fumonisinas a pH alcalino ya que mutantes que tienen este gen interrumpido son capaces de producir fumonisinas en medio alcalinos mientras que cepas silvestres no lo hacen (Flaherty et al. 2003).

La disponibilidad de nutrientes es otro factor importante en la biosíntesis de fumonisinas, en particular la relación C:N, pues determina el desarrollo de biomasa y la producción de la micotoxina. No hay una preferencia por algún carbohidrato particular pues tanto glucosa, como fructosa, sacarosa, maltosa y trehalosa incluidos en el medio de cultivo sirven de igual forma como fuente de C para la biosíntesis de estas toxinas (Jiménez et al. 2003). La disminución en la concentración de aminoácidos favorece también la producción de fumonisinas aunque con una reducción en la masa del micelio. Se puede concluir entonces que una relación C/N alta favorece la producción de fumonisinas, y la función de algunos genes involucrados en la regulación se describen a continuación.

## 2.6 Genes que participan en la regulación de la síntesis de fumonisinas.

Diversos genes que no pertenecen al locus *FUM* participan en la regulación de la biosíntesis de fumonisinas, además del factor transcripcional *FUM21*. A continuación se hará una breve descripción de estos genes y su posible función:

***FUM21*** Codifica un factor transcripcional que tiene un dominio de unión al DNA del tipo dedo de zinc. Es el único regulador que se encuentra dentro del clúster *FUM*. Es un regulador positivo de la síntesis de fumonisina pues mutantes de este gen presentan una reducción o incluso abatimiento total de la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* (Brown et al. 2007).

El gen ***PAC1*** tiene como producto una ciclina de tipo C que regula transcripcionalmente la síntesis de fumonisina de manera negativa en respuesta a cambios de pH. Cuando el medio externo tiene un pH elevado, la síntesis de FB1 disminuye como respuesta a este cambio reprimiendo la expresión del gen *FUM1* (Flaherty et al. 2003; Picot et al., 2010).

El gen ***FCK1*** codifica para un tipo de proteína cinasa dependiente de ciclina C que interactúa con el producto del gen *FCC1* para regular el desarrollo y metabolismo secundario de *F. verticillioides*. El tipo de regulación que tiene es positiva sobre la síntesis de fumonisina. La interrupción de este gen ocasiona un fenotipo con defectos morfológicos, reducción de crecimiento, aumento de pigmentación y una menor producción de fumonisinas (Bluhm & Woloshuk 2006).

El gen ***FCC1*** codifica para una ciclina tipo C que interactúa físicamente con el producto de *FCK1* para formar un complejo que regula la expresión de genes del metabolismo secundario, responsables de la producción de pigmentos y de fumonisinas y que es sensible a cambios en el ambiente (Shim & Woloshuk 2001).

El producto del gen ***ZFR1*** es una proteína con un motivo de unión al DNA de tipo dedo de zinc binuclear ( $Zn(II)2Cys6$ ). Este factor transcripcional participa en la regulación del metabolismo primario y secundario de hongos filamentosos (Flaherty & Woloshuk 2004).

La presencia de este gen se requiere para la transcripción de la mayoría de los genes del locus *FUM*, y por lo tanto para la producción de FB1. En cepas con mutación en este gen hay una disminución sustancial de la producción de FB1, aunque el desarrollo y conidiación no se ven afectados (Flaherty et al. 2004).

El gen ***GBB1*** codifica para una proteína G monomérica que regula de manera negativa la producción de fumonisinas. Está encargada de distintos procesos celulares como el transporte y la transducción de señales. La represión en la expresión de esta proteína resulta en una elevada producción de FB1 por la mayor expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* aunque sin cambios en el desarrollo y crecimiento del hongo (Sagaram et al. 2006).

Los genes ***AREA*** regulan la expresión de genes del metabolismo del nitrógeno e influyen también en la síntesis de FB1. Este gen es reprimido en presencia de sales de amonio, glicina o glutamato, pero es activado en presencia de nitrato. Las mutaciones en este gen provocan una expresión disminuida en los genes *FUM1*, *FUM8* y *FUM12* (Kim & Woloshuk 2008).

***FvVE1*** es un gen regulador positivo del desarrollo sexual y el metabolismo secundario. La interrupción de este gen suprime completamente la producción de fumonisinas y fusarinas. La presencia de este gen es necesaria para la expresión de la vía de regulación específica del gen *FUM21* así como de los genes estructurales de biosíntesis de FB1. Regula otros procesos del desarrollo pues mutantes carentes de este gen muestran defectos en la integridad de la pared celular, hidrofobicidad y polaridad en sus hifas (Myung et al. 2009; Picot et al. 2010).

El producto del gen ***FST1*** es un transportador de azúcares que tiene un efecto positivo en la síntesis de FB1. Las mutantes carentes de este gen no muestran efectos en el crecimiento ni la colonización de plantas de maíz, pero sintetizan niveles menores de FB1 que las cepas silvestres. Esto parece estar relacionado con la disponibilidad de carbono que se traduce en una mayor producción de fumonisinas (Bluhm et al. 2008).

### 3. INTERACCIÓN *F. VERTICILLIOIDES* – MAÍZ.

#### 3.1 Generalidades e importancia de la planta del maíz.

El maíz (*Zea mays L.*) es una planta anual con tallo nudoso y macizo que consta de 15 a 30 hojas alargadas y abrasadoras. Las flores masculinas y femeninas están físicamente separadas en el mismo individuo, lo que favorece la polinización cruzada (Bonilla Morales, 2008). Pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta C4 cuyo metabolismo comienza con la incorporación de CO<sub>2</sub> a un compuesto C-4, como malato o aspartato, y posee una alta actividad fotosintética que le permite un gran desarrollo vegetativo.

Es un cultivo de suma importancia y el cereal de mayor producción mundial, por encima del trigo y el arroz (FAO, Agropanorama 2013) (Ver **Tabla 1**). En 2012 la producción anual de maíz rebasó las 900 millones de toneladas. Los principales países productores son Estados Unidos, China y Brasil; México se encuentra en el octavo lugar con una producción anual de 22 millones de toneladas (FAO, 2012) (ver **Tabla 2**). El maíz es la principal fuente de alimentación en países latinoamericanos y tiene diversas aplicaciones industriales.

El maíz es una planta domesticada que ha evolucionado con los humanos por miles de años. México es el centro de origen del maíz por lo que existe una gran cantidad de razas y variedades con distintas características. Estas se han adaptado para desarrollarse en diferentes condiciones climáticas, latitudes y altitudes; a periodos de desarrollo más cortos, y con resistencia a diversos factores ambientales.

**Tabla 1. Producción de los principales cereales en el mundo durante el año 2012/2013.**

[www.Agropanorama.com](http://www.Agropanorama.com). Consulta: ago 2013.

| Cereal    | Producción anual (ton) |
|-----------|------------------------|
| 1. Maíz   | 957 000 000            |
| 2. Trigo  | 708 891 000            |
| 3. Arroz  | 476 769 000            |
| 4. Soja   | 281 662 000            |
| 5. Cebada | 141 702 000            |

**Tabla 2. Principales países productores de maíz y su producción durante el año 2012/2013.**

[www.Agropanorama.com](http://www.Agropanorama.com). Consulta: ago2013.

| País                    | Producción anual (ton) |
|-------------------------|------------------------|
| 1. Estados Unidos       | 273 800 000            |
| 2. China                | 205 600 000            |
| 3. Brasil               | 84 000 000             |
| 4. Unión Europea        | 58 500 000             |
| 8. México               | 22 000 000             |
| <b>Total (Mundial):</b> | <b>957 000 000</b>     |

## **3.2 Etapas de desarrollo de la planta de maíz.**

### **3.2.1 Germinación.**

En esta fase la semilla activa rápidamente una serie de eventos metabólicos. Se inicia con la toma de agua o imbibición, en la cual las estructuras celulares se hidratan. La entrada de agua permite la activación enzimática y de procesos celulares como la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y la respiración. Este proceso está regulado también por fitohormonas como el ácido giberélico (GA) que actúa como hormona del crecimiento vegetal y el ácido abscísico (ABA) que actúa en la dormancia y frente a condiciones de estrés. Las funciones de estas hormonas se antagonizan entre ellas (Nonogaki et al. 2010).

Estos mecanismos permiten el desarrollo del meristemo radicular –que se localiza en el extremo del tejido y cuya proliferación celular es muy alta– donde se constituye la raíz primaria o radícula mientras que las raíces seminales se desarrollan alrededor de la semilla y juntas permitirán la toma de agua y nutrientes. También emerge el primer internodo: el mesocotilo, que junto con el coleoptilo se elongan hasta la emergencia de este último del suelo a la luz y que constituirá la primer hoja (Edwards 2009).

### **3.2.2 Establecimiento de la plántula.**

Una vez que han emergido las estructuras del eje embrionario empieza la principal movilización de reservas de la semilla para sostener el crecimiento de la plántula hasta que ésta sea fotosintéticamente activa. Esta movilización puede ocurrir en la radícula, plúmula y endospermo antes de que se complete la germinación (Nonogaki et al. 2010).

Cuando el coleoptilo emerge de la superficie del suelo se desarrollan las raíces nodales que absorben agua y nutrientes, mientras el crecimiento de raíces seminales decrece. Al exponerse el coleoptilo a la luz, las hormonas que regulan el crecimiento frenan el desarrollo del tallo hacia abajo y el coleoptilo se divide para formar dos hojas verdaderas (Bragachini et al. 2002). Siete días después de la

emergencia, la plántula tiene el sistema primario de raíces totalmente desarrolladas y es independiente de las reservas del grano.

### 3.2.3 Desarrollo vegetativo.

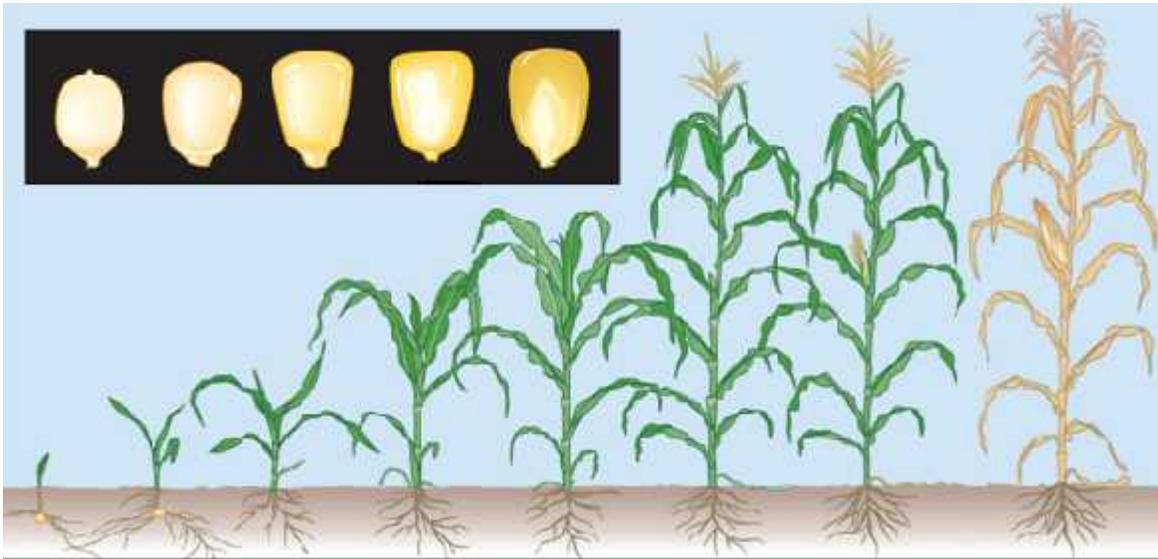
En esta etapa inicia el desarrollo de las raíces nodales en los nudos inferiores mientras que el tallo se elonga hasta lograr su altura final y las hojas se desarrollan hasta alcanzar un número final que varía entre 18 y 30, según el genotipo y las condiciones ambientales. Un elemento limitante en el suelo para el crecimiento es el nitrógeno. El follaje se expande y es capaz de capturar la mayor radiación disponible. Las flores masculinas y femeninas empiezan a desarrollarse en esta fase (CEDAF 1998).

En el momento que la planta está cerca de alcanzar su altura y número de hojas finales, los productos de la fotosíntesis que, hasta ahora se habían dirigido para el crecimiento de las hojas se destinan a la maduración de los órganos reproductivos. La mazorca empieza a crecer en uno de los nudos laterales mientras que la espiga emerge de la punta y crece rápidamente hasta alcanzar su madurez y el maíz pasa a su fase reproductiva.

La mazorca contiene las flores femeninas, cada una consiste en un ovario con un estigma y es capaz de producir un grano si es fertilizado. La espiga es el órgano reproductivo masculino y su función es producir polen para fertilizar a las flores femeninas. Se estima que cada espiga produce entre 2 y 5 millones de granos de polen. Entonces, si hay 1000 estigmas por mazorca se tendrán entre 2000 y 5000 granos de polen disponibles para cada estigma (Edwards 2009).

### 3.2.4 Floración y polinización.

Una vez que la espiga está totalmente expuesta, empieza a liberar polen en un periodo entre una a dos semanas. Para entonces la planta ha alcanzado el número final de hojas. Aunque las flores masculinas generalmente maduran antes que las femeninas este desfase es solo de unos cuantos días por lo que no impide la fecundación de los óvulos femeninos a través de los estigmas. El grano de polen toma aproximadamente 24 horas para fertilizar el óvulo (Ritchie et al. 1992).



**Figura 8. Etapas de desarrollo de la planta de maíz.** Una vez que la semilla germina y se ha establecido, inicia el desarrollo vegetativo en el que el tallo y las hojas crecen para tomar grandes cantidades de radiación solar. En esta etapa inicia también el desarrollo de las estructuras de reproducción. Una vez maduras inicia la polinización con el que se fertilizan los óvulos que darán origen a los granos. Durante el llenado del grano se almacenan grandes cantidades de carbohidratos como almidón y el embrión se forma. Una vez que se obtiene el peso máximo la planta empieza a secarse (senescencia) (Nafziger, 2009).

Si las condiciones ambientales como la cantidad de agua y nutrientes disponibles son óptimas, la planta dirige los productos de la fotosíntesis para el desarrollo de los órganos reproductivos y el llenado de grano, lo que se reflejará en altos rendimientos. Por el contrario, si la planta está sometida a estrés en esta etapa o en la parte previa al final del desarrollo vegetativo, esto repercute en una disminución del rendimiento y calidad del grano.

### 3.2.5 Llenado de grano y senescencia.

La planta concentra todos sus recursos para llenar los granos. Hay un crecimiento de los granos por división celular seguido por una alta tasa de llenado de los mismos con un fluido lechoso con alto contenido en azúcares, mismos que serán convertidos en almidón. También empieza el desarrollo del embrión con los meristemos apicales y la formación del coleoptilo. La tasa de llenado disminuye gradualmente hasta ser nula, mientras se presenta una importante pérdida de humedad (Edwards 2009).

Durante la etapa de dentado, el almidón de los granos se seca y éstos adquieren una mayor firmeza. Una vez que se forma una capa negra en la punta de los granos ésta ha llegado a su etapa final con lo que logran su máximo peso seco. La planta sufre una senescencia rápida de las hojas durante este proceso (Ritchie et al. 1992). Una vez que los granos se han desarrollado la planta entonces se seca.

### **3.3 Función de las enzimas hidrolíticas en la respuesta de defensa vs. hongos necrótrofos ( $\beta$ -1,3-Glucanasas y quitinasas)**

Las plantas contienen contra el ataque de microorganismos patógenos usando mecanismos constitutivos e inducibles. Los primeros los conforman barreras estructurales como ceras, lignina, celulosa y proteínas de la pared celular. Cuando estos mecanismos son superados por la infección se inducen respuestas de defensa que buscan limitarla, lo que requiere del reconocimiento del patógeno a distintos niveles.

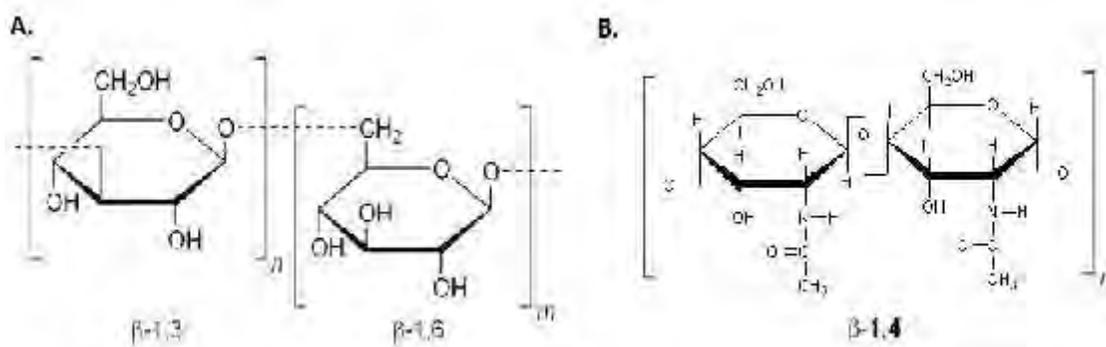
La primera línea de defensas inducibles responden a la presencia de moléculas que constan de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs). La naturaleza química de éstos es muy variada pues están la flagelina y lipopolisacáridos de bacterias, y la quitina de los hongos. Estas moléculas son reconocidas por receptores proteicos específicos. Entre las primeras respuestas que se inducen están la acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs). El sistema inmune de la planta también reconoce patrones moleculares internos asociados a daño (DAMPs) como por ejemplo oligosacáridos derivados de la pared celular (Pieterse et al. 2009; Doehlemann & Hemetsberger 2013).

Las proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) constituyen un grupo de proteínas que se inducen durante la respuesta de defensa. Se clasificaron en familias diferentes basadas en sus características y actividad biológica que van desde hidrolasas hasta funciones de transporte (van Loon et al. 2006).

Algunas de ellas se expresan en los tejidos y sus niveles aumentan durante la respuesta de defensa (van Loon et al. 2006). Muchas PRs son inducidas por fitohormonas como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) o etileno (ET) y poseen potente actividad antimicrobiana. Algunos de los mecanismos de estas proteínas son la hidrólisis de compuestos estructurales de la pared celular o ciertas proteínas, inhibidor de proteasas, toxicidad directa e involucradas en respuesta de señalización o del metabolismo (Ferreira et al. 2007).

Las principales PRs que responden durante la infección por hongos son las quitinasas y glucanasas (Cordero et al. 1994). Ambas proteínas tienen una función hidrolítica que debilita la pared celular de los hongos, retardando su crecimiento. Además se generan compuestos con función elicitora que activan respuestas de defensa. Los principales componentes estructurales de la pared celular de hongos filamentosos son polisacáridos como quitina (10-20%), glucano (50-60%) y algunas proteínas (30-50%) (Ferreira et al. 2007) (Ver **Figura 9**).

Las  $\beta$ -glucanasas (PR-2) de plantas se dividen en distintos grupos dependiendo del tipo de enlace que rompen [ $\beta$ -(1,3),  $\beta$ -(1,4)  $\beta$ -(1,6),  $\beta$ -(1,3-1,4)]. Tienen una alta especificidad por su sustrato. Las  $\beta$ -1,3 glucanasas son las principales proteínas inducidas por hongos filamentosos ya que son capaces de degradar el glucano formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6 y es un componente estructural muy importante de este tipo de hongos.



**Figura 9. Estructuras químicas de los principales componentes de la pared de hongos filamentosos. A.** Glucanos formados por unidades de glucosa con enlaces glucosídicos en posiciones  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6. **B.** Quitina formada por unidades de N-acetil glucosamina (NAG) enlazadas en posiciones  $\beta$ -1,4.

Existen isoformas ácidas y básicas de las  $\beta$ -1,3 glucanasas. Las isoformas ácidas tienen un peso molecular de alrededor de 36 kDa y por lo general son extracelulares. Las isoformas básicas tienen un peso molecular de 33 kDa y se localizan en las vacuolas. Su actividad contribuye a la hidrólisis de la pared del hongo y a su vez promueve la liberación de oligosacáridos de la pared celular que funcionan como moléculas elicitoras que activan otras vías de defensa en la planta (Rose et al. 2002). Las glucanasas también participan durante la germinación de la semilla al degradar diversas capas que cubren al embrión y promueven la protusión radicular (van Loon et al. 2006, Campo et al. 2004).

Las quitinasas (PR-3,-4,-8,-11) tienen una función similar ya que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos presentes en la quitina. La quitina es un polisacárido insoluble formado por unidades de N-acetilglucosamina, también muy abundante en la pared celular de hongos (Kasprzewska 2003). Las quitinasas se clasifican en dos categorías de acuerdo al sitio donde ocurre la reacción: endoquitinasas y exoquitinasas. Las primeras hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4 internos al azar, mientras que las segundas degradan al polisacárido a partir de uno de sus extremos. El peso molecular de las quitinasas varía entre 25 y 36 kDa y pueden ser ácidas o básicas, según su punto isoeléctrico (Henrissat & Bairoch 1996).

### **3.4 Resistencia en maíz a *Fusarium verticillioides* y a FB1.**

Como cultivo, el maíz ha evolucionado conjuntamente con el hombre a través de miles de años. La variedad de genotipos existentes de maíz es el resultado de años de diversas cruces y la selección de las mejores características agronómicas. Esto permitió la domesticación del maíz y la formación de razas (poblaciones de individuos asociados a una región geográfica, con genotipos similares y rasgos heredables que permiten separarlas de otras poblaciones), variedades (grupo de individuos dentro de una especie y raza con rasgos diferenciales más estrechos que aquellos manifestados entre razas) e híbridos (cruza entre dos variedades con características deseables mejores que las de sus parentales individuales) (Reyes Castañeda, 1990).

En la interacción maíz–*F. verticillioides* el genotipo de ambos organismos es importante, además de los factores ambientales. Si bien la virulencia de algunas cepas de *F. verticillioides* se asocia a la producción de FB1, también el genotipo de maíz es determinante. Hay genotipos de maíz resistentes a cepas de *F. verticillioides* incluso cuando éstas son virulentas y producen niveles altos de FB1 (Arias et al. 2012). El regado con soluciones de FB1 sobre plantas de distintos genotipos afectan el crecimiento de la parte aérea y la raíz. Cuando se aplica a una concentración de 1 µg/mL únicamente afecta al genotipo susceptible mientras que el genotipo resistente muestra un mayor crecimiento aunque discreto; sin embargo a una dosis de 20 µg/mL inhibe el crecimiento de ambos tejidos en los dos genotipos (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Efecto de la FB1 en híbridos de distintos genotipos de maíz. Se muestra el porcentaje respecto a la longitud de su respectivo grupo control a cada tratamiento.

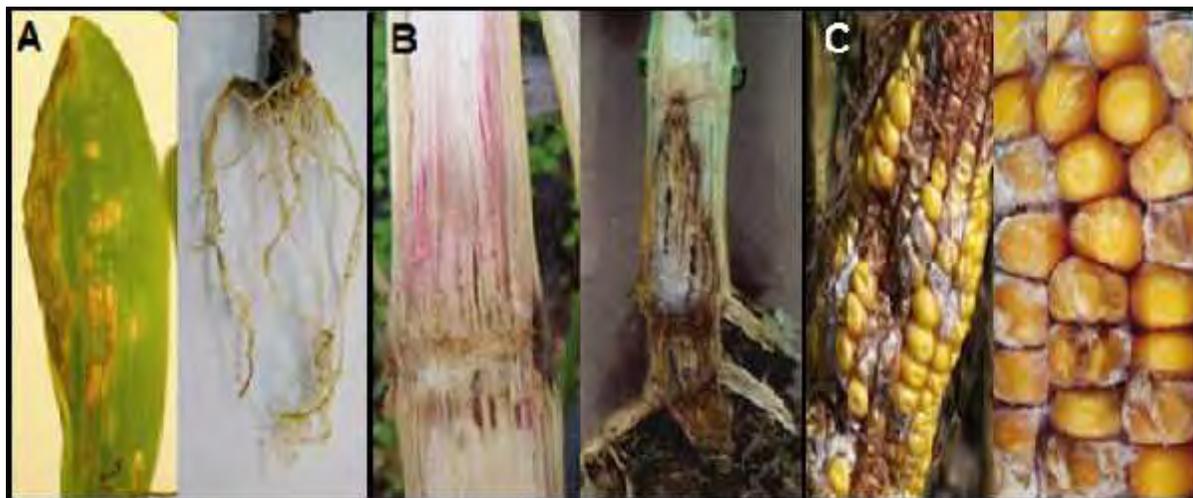
| *GENOTIPO | FB1 (1 µg/mL) |          | FB1 (20 µg/mL) |          | Infección <i>F.v.</i> |          |
|-----------|---------------|----------|----------------|----------|-----------------------|----------|
|           | Altura (%)    | Raiz (%) | Altura (%)     | Raiz (%) | Altura (%)            | Raiz (%) |
| RH        | +3            | -10      | -54            | -78      | +23                   | +34      |
| SH        | -1            | -16      | -45            | -76      | -9                    | -23      |

\*RH: resistente; SH: Susceptible. Efecto a los 21 días (Arias et al. 2012).

La evidencia más fuerte de la función de la FB1 en la virulencia de la FB1 es la transformación con el clúster *FUM* completo a una cepa no productora de fumonisinas de *F. verticillioides* (Glenn et al. 2008). La cepa transformada es capaz de sintetizar FB1 e infectar plántulas de maíz y provocar síntomas como lesiones necróticas, decremento del crecimiento y atrofia de diversos tejidos.

Entre las principales enfermedades causadas por la infección de *F. verticillioides* en maíz están: la necrosis o muerte celular en raíces, hojas y tallo con un daño irreversible a estos tejidos, se muestra una coloración que va de café a negro en la zona afectada (**Fig. 10 A**). La pudrición del tallo condicionada a diversos factores ambientales se caracteriza por una coloración rosa del tejido interno que se encuentra desintegrado. La infección debilita al tallo provocando que se seque y quiebre (**Fig. 10 B**) la pudrición de mazorca afecta los granos muchas veces

visiblemente infectados por micelio y de coloración que va de rosado a castaño, rojizo o gris. Las condiciones ambientales y el daño por insectos facilitan el desarrollo de esta enfermedad. Está altamente asociada a la acumulación de micotoxinas, lo que constituye un riesgo importante para la salud (**Fig. 10 C**).



**Figura 10. Principales enfermedades del maíz asociadas a *F. verticillioides*:** **A.** Lesiones necróticas en hoja y raíz (Arias et al. 2012); **B.** Pudrición del tallo (Steve Butzen & Bill Dolezal 2010) y lesiones en el nodo; **C.** Pudrición de mazorca y granos (Desjardins & Munkvold 1997).

#### 3.4.1 Mecanismos de resistencia.

Entre los mecanismos descritos sobre la resistencia de los genotipos de maíz frente a *F. verticillioides* están la capa cerosa presente en el pericarpio ya que cuando ésta es herida o retirada del grano la producción de FB1 aumenta considerablemente (Butrón et al. 2006; Samprieto et al. 2009, 2012) Además de la presencia de compuestos antioxidantes, en particular el ácido ferúlico (**Figura 11**). Hay una correlación negativa entre los niveles de ácido ferúlico en grano y los niveles de fumonisina acumulada, así como en los daños que se producen por pudrición de mazorca (Picot et al. 2013). La aplicación de ácido ferúlico exógeno al maíz resulta en una reducción en la cantidad de FB1 de los granos (**Tabla 4**). Asimismo, los genotipos de maíz con niveles endógenos bajos muestran mayor susceptibilidad a la pudrición de mazorca y niveles de FB1 (**Tabla 5**).

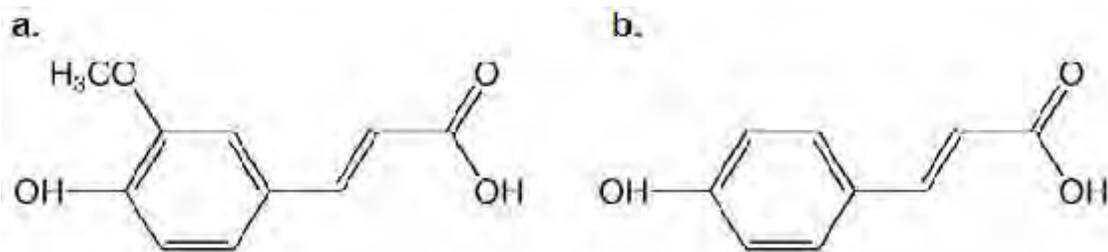
**Tabla 4.** Efecto del ácido ferúlico en la producción de fumonisinas de dos cepas de *F. verticillioides*. (\*) indica una diferencia significativa con el control ( $\alpha=0.05$ ). (Picot et al. 2013).

| Ácido ferúlico ( $\mu\text{M}$ ) | FB1 + FB2 + FB3 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) |                  |
|----------------------------------|---|------------------|
|                                  | INRA 63                                     | INRA 64          |
| 0                                | 2.52 $\pm$ 0.31                             | 3.13 $\pm$ 0.29  |
| 0.5                              | 1.67 $\pm$ 0.74                             | 3.07 $\pm$ 0.24  |
| 1                                | 0.36 $\pm$ 0.12*                            | 1.48 $\pm$ 0.66* |

**Tabla 5.** Contenido de ácido ferúlico en distintos genotipos de maíz frente a la pudrición de mazorca. MS indica un genotipo (moderadamente susceptible), S (susceptible) y VS (muy susceptible).

| GENOTIPO | Ácido ferúlico en pared celular ( $\text{mg}/\text{g}$ ) |
|----------|--|
| MS       | 7.8  |
| S        | 6.4  |
| VS       | 4.0  |

El mecanismo de protección de los ácidos fenólicos puede ser a través de reforzar los componentes estructurales funcionando como barreras contra el patógeno (Picot et al. 2010). También inhiben la actividad de enzimas líticas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* que facilitan la penetración al tejido del hospedero (Reynoso et al. 2002) y su actividad antioxidante podría contrarrestar el estrés oxidativo provocado por algunas micotoxinas. Además estos compuestos reducen la síntesis de FB1 y otras micotoxinas *In vitro*; posiblemente reprimiendo la transcripción de genes, o la actividad enzimática en procesos de oxidación como son las monooxigenasas y lipooxigenasas que producen lipoperóxidos que inducen esporulación y síntesis de micotoxinas, lo que pueda explicar también la reducción en la acumulación de micotoxinas en genotipos resistentes (Picot et al. 2013).



**Figura 11. Estructura química de los ácidos fenólicos: a. ácido ferúlico y b. ácido cumárico.** Estos compuestos han mostrado reducir los niveles de fumonisinas y la severidad de daños causados por pudrición de mazorca. Estos compuestos están presentes en cantidades importantes en líneas de maíz resistentes (Samprieto et al. 2012).

#### 4. ANTECEDENTES.

##### Diversidad de cepas de *Fusarium verticillioides* y su variabilidad en la producción de fumonisinas.

Dentro de las cepas de *Fusarium verticillioides* hay una alta diversidad en la capacidad de producir fumonisinas. Mientras que algunas de estas cepas no producen FB1 o la sintetizan en niveles muy bajos (0.1mg/g sustrato), otras cepas producen altas cantidades de toxina (4000 mg/g sustrato) (Nelson et al. 1991; Desjardins et al. 1994; Sánchez-Rangel et al 2005; van der Walt et al. 2006).

Una razón de esta variabilidad en la producción de FB1 puede ser la presencia natural de mutantes o la respuesta de genes responsables para la biosíntesis (Proctor et al 1999; Glenn et al 2008). Esta complejidad se refleja en una colección de cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz en México (Sánchez-Rangel et al., 2005; **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Producción de FB1 de diferentes cepas aisladas en México en 2 distintos sustratos sólidos. **a) arroz.** Sánchez-Rangel, et al. 2005, **b). maíz.** Desjardins, et al. 1994. ND. No detectado. Las cepas resaltadas fueron las utilizadas para este estudio.

| Especie                          | Cepa           | Lugar de origen | Producción de FB1 (µg/g) |
|----------------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| <i>F. verticillioides</i>        | MY1            | Sonora, MEX     | 1718 <sup>a</sup>        |
| <b><i>F. verticillioides</i></b> | <b>MY3</b>     | Sonora, MEX     | <b>1699<sup>a</sup></b>  |
| <b><i>F. verticillioides</i></b> | <b>MY5</b>     | Sonora, MEX     | <b>1.3<sup>a</sup></b>   |
| <i>F. verticillioides</i>        | L-176-1        | Sonora, MEX     | 454 <sup>a</sup>         |
| <b><i>F. verticillioides</i></b> | <b>PAL1</b>    | Edo. Méx, MEX   | <b>ND<sup>a</sup></b>    |
| <i>F. verticillioides</i>        | PAL2           | Edo. Méx, MEX   | ND <sup>a</sup>          |
| <b><i>F. verticillioides</i></b> | <b>H-135-1</b> | Edo. Méx, MEX   | <b>174<sup>a</sup></b>   |
| <i>F. verticillioides</i>        | H-135-2        | Edo. Méx, MEX   | 99 <sup>a</sup>          |
| <i>F. verticillioides</i>        | H-135-3        | Edo. Méx, MEX   | ND <sup>a</sup>          |
| <i>F. verticillioides</i>        | MZ2B-2         | Nvo León, MEX   | 3.6 <sup>c</sup>         |
| <i>F. verticillioides</i>        | MZ2B-3         | Nvo León, MEX   | 0.9 <sup>c</sup>         |
| <i>F. verticillioides</i>        | M-7431         | Nvo León, MEX   | 3600 <sup>b</sup>        |
| <i>F. verticillioides</i>        | M-7370         | Nvo León, MEX   | 690 <sup>b</sup>         |

### III. HIPÓTESIS.

Si la toxina Fumonisina B1 es un factor de virulencia de *Fusarium verticillioides* y la capacidad de sintetizar la toxina varía entre las cepas del hongo, las cepas que producen niveles mayores de la toxina tendrán mayor capacidad de inhibir a las glucanasas básicas y causar una infección más severa en plantas de maíz susceptibles.

### IV. OBJETIVOS.

**Objetivo General.** Evaluar si en *Fusarium verticillioides* hay una asociación positiva entre la producción de Fumonisina B1 y la virulencia y capacidad de inhibir a las  $\beta$  1-3-glucanasas de maíz.

#### **Objetivos Particulares.**

- ◆ Evaluar la capacidad *in vitro* e *in planta* de producción de Fumonisina B1 en cuatro cepas de *Fusarium verticillioides*.
- ◆ Evaluar la capacidad de colonización de embriones de maíz e inhibición de la germinación en cuatro cepas de *Fusarium verticillioides*.
- ◆ Estudiar el efecto de la actividad de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en embriones de maíz infectado por las distintas cepas de *Fusarium verticillioides*.
- ◆ Evaluar la actividad de las distintas isoformas de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en respuesta a la infección de las distintas cepas de *F. verticillioides*.
- ◆ Determinar los efectos en el desarrollo de raíces y de la parte aérea de plántulas de maíz infectadas con *F. verticillioides*.
- ◆ Evaluar el daño producido por las distintas cepas de *F. verticillioides* en tejidos de las plantas como embriones, tallo y hojas.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS.

### A. Preparación de medios de cultivo y material biológico.

Se utilizaron semillas de maíz raza “Chalqueño”, obtenidas en Chalco, Edo. de México, y de un híbrido de maíz (ZR-76) aportado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Se utilizaron cuatro distintas cepas de *Fusarium verticillioides* (**MY3**, **MY5**, **H-135-1** y **PAL-1**) previamente caracterizadas con una distinta producción de FB1 en sustrato de arroz (Sánchez-Rangel et al. 2005) Estas cepas fueron preservadas en sustrato estéril a -20°C.

#### 1. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA).

Para preparar 200 mL de medio PDA al 0.5× se pesaron: 3.9 g PDA (Fluka), 0.9 g Agar (Invitrogen). Los ingredientes se mezclaron en un matraz con 200 mL de agua desionizada con agitación manual y éste se esterilizó por autoclave (20 minutos, 1.2 kg/cm<sup>2</sup> y 120°C). El medio se dejó enfriar a 40°C aproximadamente y se vació en cajas petri estériles y se dejó solidificar y secar en la campana. Una vez solidificados las cajas se guardaron a 4°C hasta su utilización.

#### 2. Preparación del inóculo y conteo de conidias.

Se utilizaron cultivos de 10 días de cada una de las cepas de *F. verticillioides* en medio PDA a 29°C bajo luz fluorescente. Se adicionaron entre 5 a 10 mL de agua estéril dependiendo de la cantidad de micelio y las cajas se agitaron (150 rpm) durante 1.5 h. Se hizo un raspado sobre la superficie del medio con una punta estéril para desprender las conidias del micelio y estas suspensiones se recolectaron en tubos eppendorf. Si existía demasiado material particulado o se requería concentrar las conidias, el tubo se centrifugó a 13400 rpm por 15 min en una centrífuga minispin eppendorf.

Para el conteo de conidias se hizo una dilución probando la más adecuada y se colocaron en la cámara de Neubauer. Esta cámara se colocó en el microscopio óptico y se contaron las conidias de los cuatro cuadrantes de las esquinas usando el objetivo de 40x.

El número de conidias se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (\bar{x})(F.D.)(10 \text{ conidias}/\mu\text{L}).$$

Dónde:

$\bar{x}$ : es el promedio del conteo de los cuatro cuadrantes.

**F.D.** es el factor de dilución empleado.

Entonces, se calculó el volumen necesario para preparar suspensiones a concentraciones requeridas para los diversos experimentos. Generalmente se usaron suspensiones de 5,000 conidias/ $\mu\text{L}$ .

### 3. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz.

Se seleccionaron semillas de maíz largas, planas y en buen estado de la raza “Chalqueño”. Los embriones se obtuvieron de la semilla haciendo cortes con una navaja cuidando de no afectar su integridad estructural. Se retiró la cubierta seminal o testa y los embriones colectados se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

Para la desinfección se prepararon 100 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%; los embriones se colocaron en un recipiente bajo inmersión de esta solución y se agitó vigorosamente por 2 minutos. Se realizaron cuatro lavados con agua estéril por 2 minutos cada uno en agitación vigorosa hasta que el olor a cloro desapareció. Los embriones se dejaron secar sobre papel filtro bajo campana.

Los embriones se distribuyeron en cajas petri con agar al 0.9% colocando el embrión en contacto con el medio. Las cajas petri se incubaron a 29°C bajo luz fluorescente. Los embriones empiezan a germinar entre 24 y 48 horas.

### 4. Preparación de medio GYAM e inoculación con *F. verticillioides*.

El medio GYAM es un medio que induce la producción de FB1 (Bojja et al. 2004). Para su elaboración se preparó una solución stock de 10X de todas las sales (**APÉNDICE:** ver tabla I, componentes I - V). Para preparar 100 mL se pesaron 2.16 g de glucosa y 0.05 g de extracto de levadura y se disolvieron en 20 mL de agua estéril. Se agregaron 10 mL de la solución stock de sales y 70 mL de agua

desionizada. Se esterilizó por autoclave (20 minutos, 1.2 kg/cm<sup>2</sup> y 120°C) y una vez esteril y frío se adicionaron 20 mL de una solución de asparagina 40 mM preparada por separado y esterilizada por filtración (Membrana Millipore, 0.22 µm).

Se agregaron 12 mL del medio en cada matraz Erlenmeyer de 25 mL cada uno y se inocularon con 125,000 conidias por cuadruplicado de cada una de las cepas de *F. verticillioides* y se agitó suavemente. Los matraces se incubaron sin agitación a 29°C por 12 días. Tras este periodo de tiempo se tomó una alícuota de 2 mL a tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugó por 10 min a 13400 rpm en una centrífuga minispin eppendorf. Se recuperó aproximadamente 1.8 mL de medio y los tubos se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

#### 5. Inoculación de embriones de maíz con *F. verticillioides*.

Se obtuvieron y desinfectaron embriones como se describe en la sección 3. Los embriones desinfectados se colocaron en cajas petri con agar al 0.9%. Cada embrión se inoculó mediante la deposición de una gota de 10 µL de la suspensión de conidias (5,000 conidias/µL) en la superficie evitando que se derramara. Las cajas petri se incubaron a 29°C bajo luz fluorescente. Los embriones control se inocularon con el mismo volumen de agua estéril.

#### 6. Extracción de FB1 de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides*.

Una vez transcurridas 24 horas, los embriones se transfirieron a un mortero y se congelaron con nitrógeno líquido. Se pulverizaron con el mortero hasta conseguir un polvo fino y éste se transfirió a un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de una mezcla de acetónitirlo:agua (1:1; vol/vol). Los tubos se agitaron en vortex y se taparon e incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los tubos se agitaron nuevamente.

Posteriormente se agitaron durante 2 horas a 220 rpm y se centrifugaron durante 20 minutos a 3,400 rpm en centrifuga Beckman GS-GR. El sobrenadante se transfirió a un tubo de ensaye de 13 x 100 mm y se evaporó el solvente a 55°C bajo un flujo de nitrógeno.

## **B. Análisis de FB1 en medio GYAM y en embriones infectados por HPLC.**

La técnica comúnmente utilizada para el análisis de FB1 es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detección fluorescente de los derivados de las fumonisinas. Es una técnica cromatografía que permite la separación de los compuestos que son arrastrados por una fase móvil y separados en una columna.

Para su análisis, las fumonisinas reaccionan con o-phthaldialdehído (OPA) a través de su grupo  $-NH_2$  para formar un complejo fluorescente y estable en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (**Figura 12**). Este es el método oficial por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists International AOAC Official Method 2001.4).

### 7. Preparación de estándares de FB1 y muestras.

Se realizaron las diluciones de FB1 para la curva patrón. A partir de la solución 1 mM se prepararon diluciones seriadas para obtener concentraciones de FB1 de 150, 100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25  $\mu$ M. Para cada una se hizo la reacción con cada una de las concentraciones de la curva con OPA según se detalla en el **APÉNDICE** (tabla II). Se mezclaron 10  $\mu$ L de la muestra con 25  $\mu$ L de OPA y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se agregaron 465  $\mu$ L de mezcla ACN:agua (1:1) vol/vol. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el análisis y en estas condiciones el complejo es estable por 4 – 5 horas.

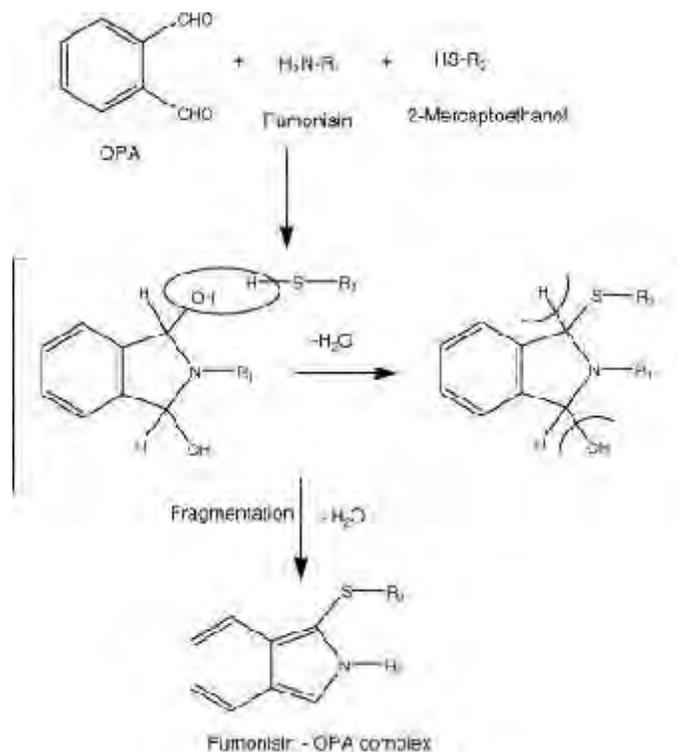
### 8. Corrida de muestras por HPLC.

Para la cuantificación de FB1 se inyectaron 20  $\mu$ L en el HPLC de una dilución 1:200 ( 5 $\mu$ L de la reacción y diluidos con 995  $\mu$ L de acetonitrilo-agua 1:1). Para las muestras se realizó el mismo procedimiento de derivatización, adecuando la dilución final al inyectar en el HPLC según las condiciones de la muestra. Los parámetros del detector de fluorescencia se ajustaron como se indica en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu, Modelo RF-10AXL.

| Función         | Valor |
|-----------------|-------|
| $\lambda_{exc}$ | 335   |
| $\lambda_{em}$  | 440   |
| GAIN            | 2     |
| SCAN            | 2     |
| RANGE           | 1     |
| SENSITIVITY     | 1     |
| RESPONSE        | 4     |

Los parámetros utilizados en las corridas del HPLC para el integrador Shimadzu C-R5A fueron las siguientes: Atenuación 4; Pendiente 35 000- 40 000; Método 2021; Formato 40; Flujo 1.0 – 1.2 mL/min; PSI 102 Kg/cm<sup>2</sup>. Se construyó la curva de calibración de FB1 y se ajustaron las diluciones de las muestras. Los parámetros del análisis del HPLC se modificaron dependiendo de las condiciones del análisis.



**Figura 12.** Reacción de formación del derivado fluorescente FB1- OPA. El β-mercaptoetanol da una mayor estabilidad al compuesto (Samapundo et al. 2006).

### **C. Ensayo de Actividad de las $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en respuesta a la infección por *F. verticillioides*.**

#### 9. Infección y recolección de embriones para extracción de proteína total.

Los embriones inoculados con *F. verticillioides* se incubaron por 24 y 30 h y se congelaron con nitrógeno líquido para almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 10. Extracción de proteínas totales de los embriones de maíz.

Se realizó la molienda de aproximadamente 15-18 embriones (2 g) con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se agregaron 2.5 mL de Buffer de extracción (**APÉNDICE**: ver tabla III) y se mezcló con una espátula hasta obtener una pasta. El macerado se transfirió a tubos eppendorf de 2 mL. Los tubos se centrifugaron en microfuga minispin eppendorf a 13,400 rpm por 10 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Se tomó el sobrenadante y se colectó en tubos eppendorf de 1.5 mL. Si aún se presentaba demasiado material particulado, los tubos se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Se almacenaron en alícuotas de entre 150-200  $\mu\text{L}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$  para los distintos experimentos.

#### 11. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Se preparó la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) y los componentes indicados en la tabla IV (**APÉNDICE**). Se realizaron 3 réplicas por cada punto de la curva. Se realizaron duplicados y se calculó la concentración de proteína de cada muestra mediante regresión lineal. La absorbancia de las muestras se leyó a  $\lambda=595$  nm en celdas de plástico.

#### 12. Electroforesis nativa para observar la actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas en gel. (Sánchez-Rangel, et al 2012).

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

De cada muestra se cargó en el pozo un volumen equivalente a 150-175 µg de proteína total mezclado con el amortiguador de muestra en una proporción 1:4. El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster) a 60-70 V por 12 h o bien a 120-150 V por 5 h a 4°C en presencia del buffer de corrida compuesto por Tris 25 mM, glicina 192 mM. El azul de bromofenol debía salir del gel y la electroforesis continuaba por 1 o 2 horas más.

13. Revelado de la actividad de β-1,3-glucanasas de maíz en gel. (Sánchez-Rangel et al, 2012).

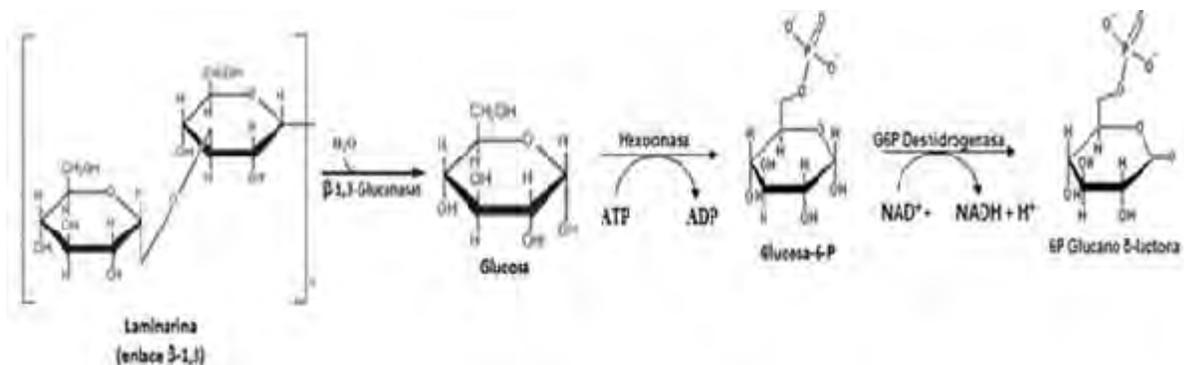
El gel se desprendió cuidadosamente de los vidrios y se colocó en un recipiente con 5 mL de solución de laminarina (2.5 mg/mL; Sigma L9634) en buffer de acetato de potasio, pH=5, y se incubó por 2 h a 40°C con agitación suave y constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó la solución anterior y se realizó un lavado de 5 min con buffer de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH=7.0 seguido de otro lavado de 5 min con agua desionizada.

El agua se sustituyó por 5 mL de reactivo de glucosa (Sigma G3293) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Para el desarrollo del color se añadió a la solución anterior 0.25 mg de azul de tetrazolio por cada mL de medio de reacción y se incubó a 37° C hasta la aparición de las bandas de color.

14. Ensayo de actividad total de glucanasas.

Se incubaron 50 µg de proteína en solución de laminarina (2.5 mg/mL) en buffer de acetato de potasio (0.05 M, pH=5) por 1 h a 40°C. Se tomaron 115 µL de la mezcla de reacción y se mezclaron con 900 µL de reactivo de glucosa (Sigma G3293). La mezcla se incubó 25 min a temperatura ambiente y se realizó la determinación del NADH liberado espectrofotométricamente (λ= 340 nm). Se utilizó el espectrofotómetro de PG Instruments modelo T60 UV-VIS.

Este ensayo se basa en la determinación de la glucosa liberada de la laminarina por acción de las  $\beta$ -1,3 glucanasas. La glucosa es fosforilada por la hexocinasa y este producto se oxida por acción de la G6P-deshidrogenasa con la concomitante reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH. El NADH formado ocasiona un incremento en la absorbancia a 340 nm que es directamente proporcional a la concentración de la glucosa liberada. (Fig. 13).



**Figura 13. Fundamento de los ensayos de la determinación de la actividad de las  $\beta$ -1,3 glucanasas de maíz en la respuesta a la infección de *F. verticillioides*.** La acción enzimática del reactivo de glucosa produce glucosa 6-P con un aumento en la formación de NADH detectada a  $\lambda = 340$  nm.

#### D. Ensayos de infección en plántulas de maíz.

##### 15. Desinfección de semillas de maíz.

Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% siguiendo los pasos descritos en la sección A3 modificando el tiempo de lavado y enjuague por 4 minutos.

##### 16. Infección en semillas germinadas de maíz (Gao et al. 2007).

Las semillas desinfectadas se colocaron en agar (0.9%) a  $29^\circ\text{C}$  bajo luz fluorescente. Tras 72 horas de germinación se transfirieron un igual número de semillas sobre cajas con papel filtro húmedo. Las semillas no germinadas fueron descartadas.

Se hizo una punción en la zona del embrión con una aguja estéril del número 21G y se inocularon 50,000 conidias en 10 µL sobre el orificio del embrión. Se dejaron 1 hora en la campana para permitir una mejor penetración del inóculo. Las cajas se incubaron a 29°C por 3 días. Tras este periodo de tiempo se midió la longitud de la raíz primaria y se realizó un corte longitudinal para documentar lesiones internas.

#### 17. Desarrollo de plántulas de maíz.

Las semillas de maíz desinfectadas germinaron en agar como se describió previamente. Tras 72 horas las semillas se sembraron en una mezcla de sustrato orgánico (SUNSHINE Mezcla No. 3, Sun Gro Horticulture)-vermiculita (7:3) estéril. Las macetas se regaron todos los días la primera semana y cada 2 días por el tiempo que duró el experimento o según las plántulas lo requirieran. Si era necesario se adicionaba fertilizante Osmocote después de las primeras tres semanas.

#### 18. Ensayo de infección en hojas (Covarelli et al. 2012).

Se crecieron plantas de maíz por 4 semanas en el invernadero. Se desprendieron aproximadamente entre 6 y 8 cm de material vegetal de la segunda y tercera hoja. Las hojas fueron heridas por compresión con la punta de una pipeta Pasteur (1 mm) en diferentes partes de la hoja (entre 5 y 6 punciones).

Se colocaron las hojas en cajas Petri con papel filtro saturado con 12 mL de agua. Se adicionó una gota de 10 µL de suspensión de conidias  $5 \times 10^5$  en las heridas. Se dejaron secar en la campana por 1 hora o al menos dejar que sedimentaran las conidias. Las cajas petri se colocaron a 22°C por 7 días en un fotoperiodo 16/8h luz/oscuridad. A los 2, 4 y 7 días se evaluó visualmente la severidad de los daños.

#### 19. Ensayo de infección en tallo (Sagaram et al. 2007)

Este ensayo se realizó en plantas de 5 semanas crecidas en el invernadero. Se realizó una punción en la parte internodal del tallo o cercano al nodo (5mm) en un ángulo aproximado de 45° con ayuda de una asa micológica. Se inocularon 50,000 conidias en un volumen de 10 µL de suspensión de conidias para cada cepa. Se introdujo la punta de la micropipeta lo suficiente para prevenir el derrame de la suspensión. Las plantas se mantuvieron en el invernadero bajo riego y fertilización por tres semanas más. Después se realizó un corte longitudinal de los tallos y se realizó un análisis visual y microscópico de las lesiones internas.

#### 20. Efecto de la infección en el crecimiento de las plántulas (Covarelli et al. 2012).

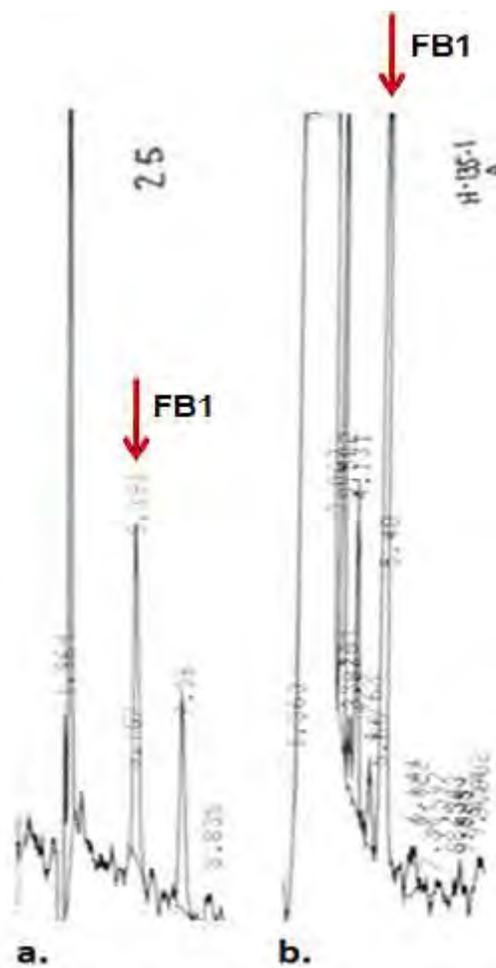
Para evaluar este parámetro se utilizó otro método de inoculación de semillas. Las semillas desinfectadas se transfirieron a un tubo falcon de 50 mL que contenía 15 mL de una suspensión de conidias (50, 000 conidias/mL). El tubo se agitó durante 15 horas. Las semillas se transfirieron a papel filtro y se dejaron secar antes de sembrarlas en agar (0.9%). Las semillas germinaron a 29°C bajo luz fluorescente durante 72 horas y las plántulas se trasplantaron a macetas que contenían una mezcla de sustrato orgánico (SUNSHINE Mezcla No. 3, Sun Gro Horticulture)-vermiculita (7:3) estéril.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero bajo riego y después de tres semanas se realizó una inspección visual y se midió la longitud de la plántula tomando la base del tallo hasta la punta de la hoja más larga.

## VI. RESULTADOS

### 1. Producción de FB1 en las distintas cepas de *Fusarium verticillioides*.

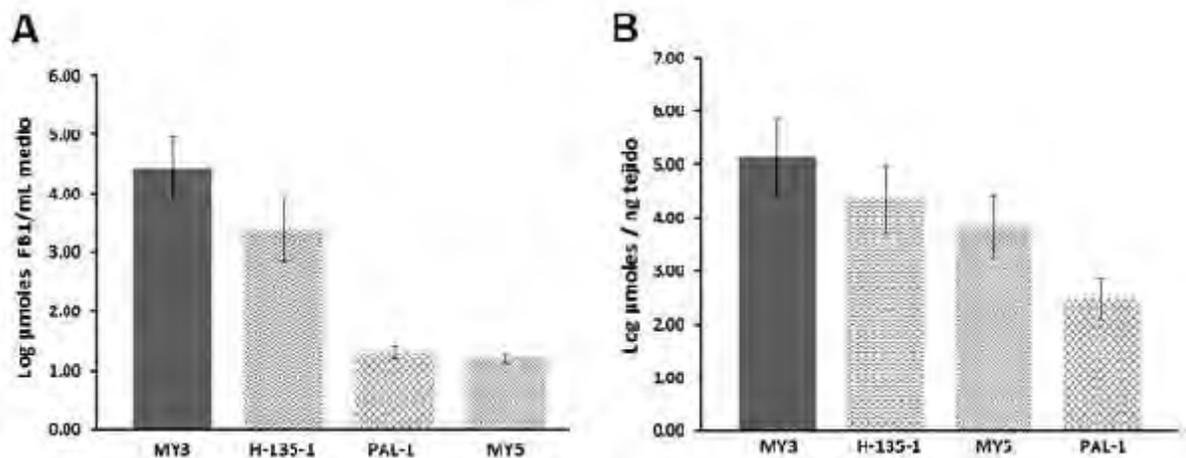
Los niveles de FB1 producida por cada cepa en medio GYAM y en los embriones de maíz se evaluaron por HPLC fase reversa. La **Figura 14** muestra un cromatograma típico de un estándar de FB1-OPA y una del derivado de la toxina proveniente de una muestra.



**Figura 14. Análisis de fumonisina B1 por HPLC.** Cromatograma representativo de **a)** estándar de FB1 50 fmoles de derivado con OPA. **b)** una muestra de una de las réplicas de la cepa H-135-1 en medio GYAM. Los picos tienen el mismo tiempo de retención (aprox 5.40 min).

La **Figura 15** resume los resultados de la cuantificación de FB1. Se observaron diferencias significativas en la capacidad de las 4 cepas de producir FB1. En el medio GYAM (Fig 15 A), la cepa MY3 tuvo una media de 26 mmoles/mL, seguida de la cepa H-135-1 con una producción 10 veces menor aproximadamente (2.4 mmoles/mL) mientras que las cepas MY5 y PAL-1 apenas tuvieron una producción de 0.020 mmoles/mL y 0.016 mmoles /mL respectivamente. Hubo una diferencia de aproximadamente 1,300 veces entre la cepa MY3 y estas dos cepas.

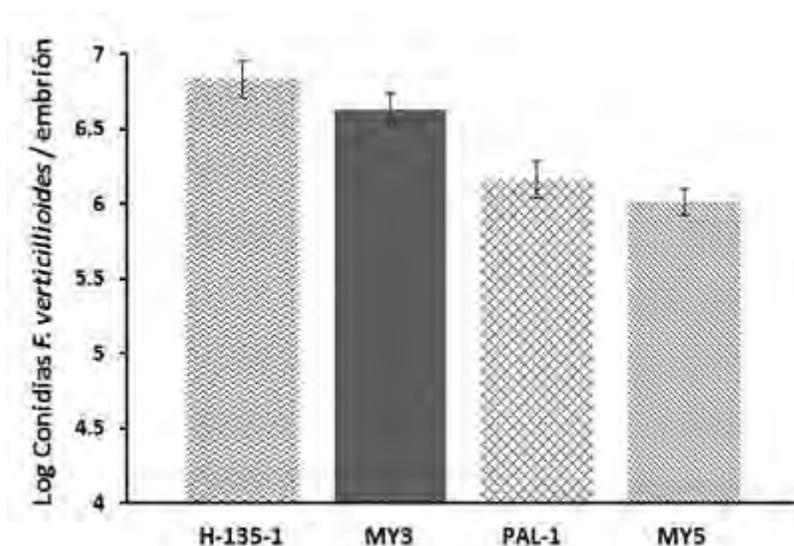
Al evaluar la producción *in planta* (Fig 15 B), también fue la cepa MY3 la que produjo mayor cantidad de FB1 (135,000  $\mu$ moles/ng). En estas condiciones las diferencias con MY5 y PAL-1 fueron de 20 y 500 veces menor respectivamente (MY5 con 6900  $\mu$ moles/ng y PAL-1 con 295  $\mu$ moles/ng de tejido). En ambos sustratos, la cepa H-135-1 tuvo una producción considerable de FB1, solamente superada por la cepa MY3 (22000  $\mu$ moles/ng de FB1 *in planta*). Con base en estos resultados se consideraron a las cepas MY3 y H-135 como de producción alta y a MY5 y PAL-1 de producción baja.



**Figura 15. Producción de FB1 por cuatro distintas cepas de *Fusarium verticillioides*.** A. Niveles de FB1 producida *in vitro*. Se inocularon 125,000 conidias en medio GYAM y se incubaron por 12 días. B. Niveles de FB1 producida *in planta*. Se inocularon 50,000 conidias por embrión y se extrajo la FB1 48 horas después. Ambas escalas de concentración de FB1 son logarítmicas.

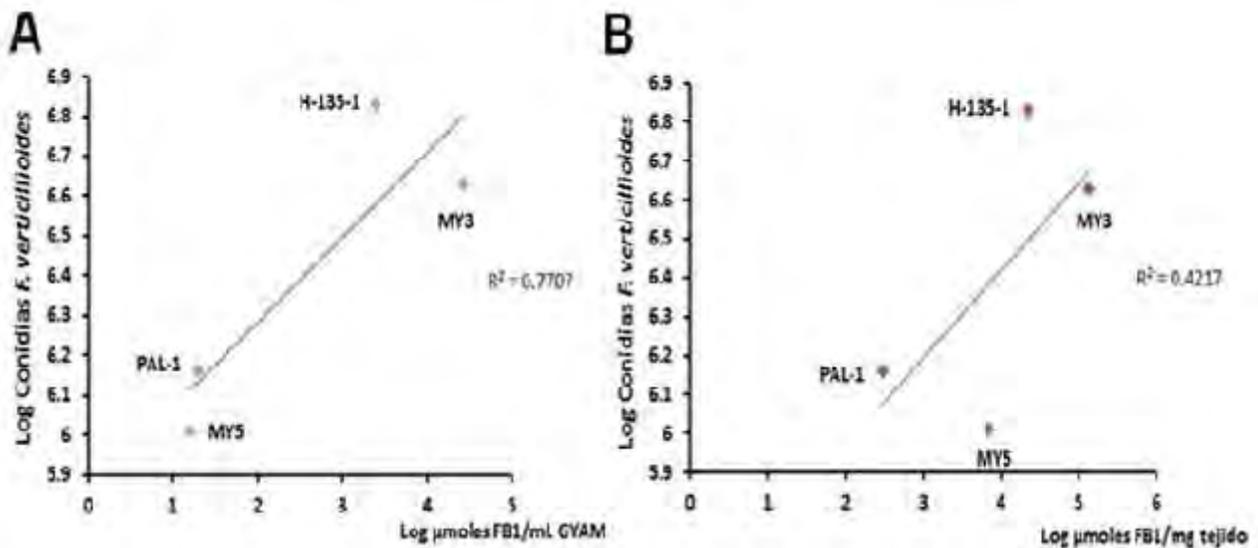
## 2. Relación entre la producción de FB1 y la conidiación *in planta*.

Para evaluar la capacidad de colonización y proliferación de las distintas cepas de *F. verticillioides* se contaron las conidias desprendidas por agitación de los embriones de maíz infectados después de 48 horas de inoculación. El resultado de este análisis se resume en la **Figura 16**. La cepa H-135-1 generó el mayor número de conidias seguida de la cepa MY3, aunque no hubo diferencias significativas entre ambas cepas. El número de conidias en las cepas PAL-1 y MY5 fue menor que el del grupo de las cepas MY3 y H-135-1, pero no hubo diferencias significativas entre estas dos cepas. Si las agrupamos y comparamos con el par de cepas H-135-1 y MY3 se nota claramente la diferencia entre ambos grupos.



**Figura 16.** Conidiación de las cuatro cepas de *F. verticillioides* utilizadas en la infección de embriones de maíz tras 48 horas de inoculación. Nótese que la escala del número de conidias/embrión es logarítmica.

En el parámetro de producción de conidias no hubo diferencias tan pronunciadas entre las cepas, como en el caso de la síntesis de FB1: entre la cepa con mayor conidiación (H-135-1) y la menor (MY5) hay apenas una diferencia de 7 veces. Sin embargo se distingue un grupo con una mayor conidiación *in planta* respecto del otro y esta agrupación se puede asociar a la de producción de FB1 entre cepas (**Figura 17**).

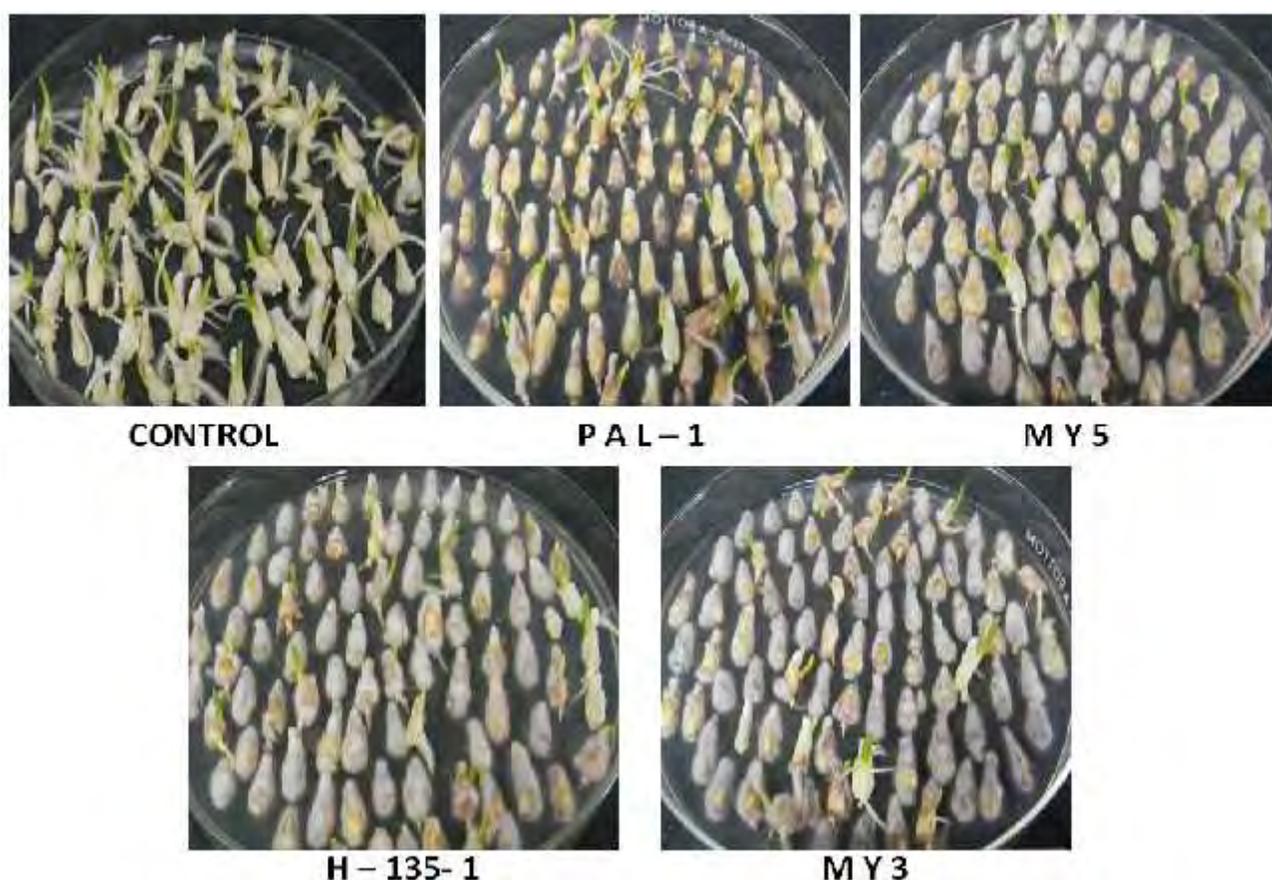


**Figura 17. Relación entre la producción de FB1 y la conidiación de las diferentes cepas de *F. verticillioides*.** **A.** Asociación entre la producción de FB1 en medio líquido y la conidiación de *F. verticillioides* en embriones. **B.** Asociación entre la producción de FB1 *in planta* y la conidiación de *F. verticillioides* en embriones.

En ambos casos las cepas PAL-1 y MY5 quedan agrupadas y alejadas del grupo que incluye a las cepas H-135-1 y MY3. En esta figura claramente se distingue que el grupo con mayor conidiación tiene una mayor producción de FB1 mientras que el grupo de PAL-1 y MY5 tienen una conidiación y producción de FB1 más baja debido a que la conidiación *in planta* es un parámetro que indica la capacidad de una cepa de colonizar el tejido vegetal, estos resultados establecen una asociación positiva entre la producción de FB1 y la colonización.

### 3. Efectos de *Fusarium verticillioides* en la germinación y colonización de embriones de maíz.

Las cepas de *F. verticillioides* utilizadas en este estudio mostraron distintas capacidades de colonizar y afectar la germinación de los embriones de maíz. (Figura 18, Tabla 8). La cepa MY3 tuvo un mayor grado de colonización y un mayor efecto en la inhibición de la germinación; seguido por las cepas H-135-1, MY5 y PAL-1. Esta última cepa presentó una colonización muy baja y los embriones tuvieron un mayor grado de germinación.

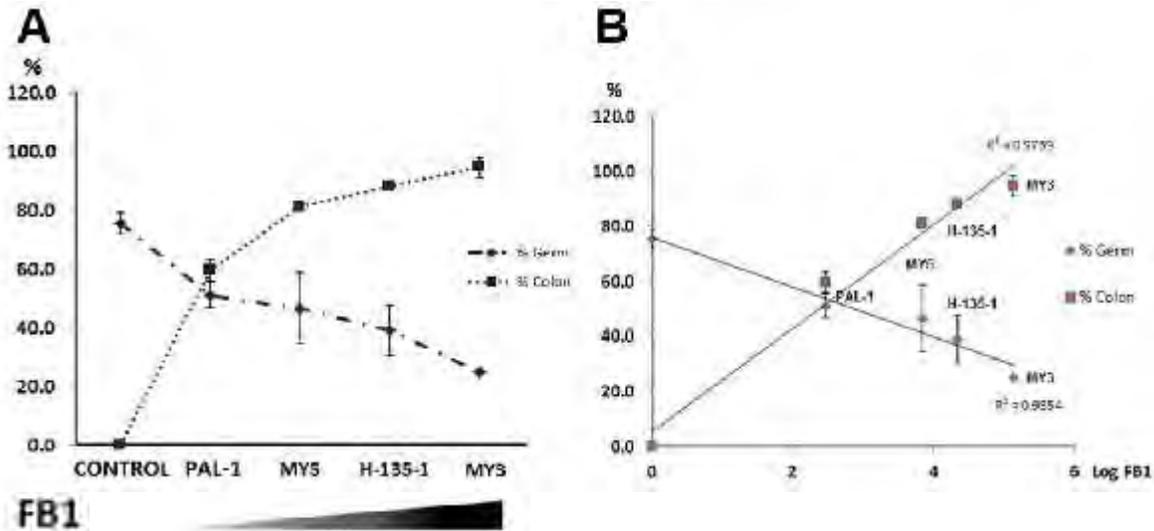


**Figura 18. Embriones de maíz infectados con 50,000 conidias de las distintas cepas de *F. verticillioides*.** Se observa el distinto grado de colonización de tejido por parte del hongo observándose el desarrollo de micelio y la aparición de pigmentación violácea en los embriones. Se muestra también la inhibición de la germinación en los embriones infectados.

**Tabla 8. Porcentaje de germinación y de colonización de embriones infectados de maíz.** Ambos parámetros muestran cambios por la infección de las distintas cepas de *F. verticillioides*. Se observa como al aumentar el % de colonización, disminuye el % de germinación. Las cepas están ordenadas de menor a mayor producción de FB1 (MY3)

| CEPA    | Experimento 1 |                | Experimento 2 |                |
|---------|---------------|----------------|---------------|----------------|
|         | % Germinación | % Colonización | % Germinación | % Colonización |
| CONTROL | 73            | -              | 78            | -              |
| PAL-1   | 54            | 57             | 48            | 62             |
| MY5     | 55            | 80             | 38            | 82             |
| H-135-1 | 45            | 88             | 33            | 88             |
| MY3     | 25            | 92             | 25            | 97             |

Ambos parámetros presentan una asociación con la producción de FB1 de manera positiva en el caso de la colonización y negativa número de embriones germinados respecto al control (**Figura 19**).



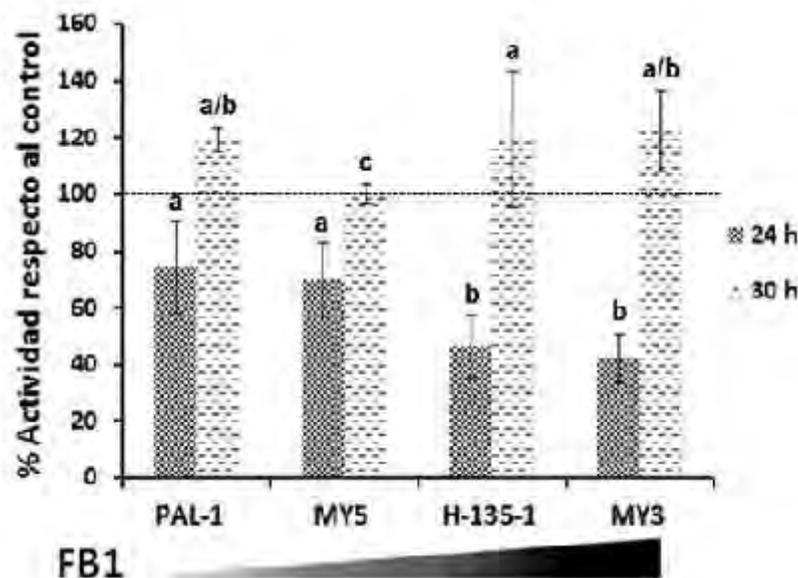
**Figura 19. Efecto en la germinación de embriones de maíz y su colonización por cepas de *F. verticillioides* con distinta producción de FB1. A.** Relación entre el % de germinación y colonización de embriones de maíz infectados con las cuatro cepas. **B.** Relación entre el % de germinación y % de colonización en relación a la producción de FB1 de las cuatro cepas.

#### 4. Efecto de la infección de *Fusarium verticillioides* sobre la actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz.

El trabajo previo en el laboratorio demostró que la FB1 inhibe a las  $\beta$ -1,3-glucanasas básicas e induce la activación de una isoforma ácida (Sánchez-Rangel et al., 2012). Para extender estos resultados, se probó el efecto de las 4 cepas de *F. verticillioides* que producen niveles distintos de FB1. Se evaluó tanto la actividad total de  $\beta$ -1,3-glucanasas, mediante ensayos espectrofotométricos, así como la actividad de las distintas isoformas por ensayos en gel.

##### 4.1 Actividad total de $\beta$ -1,3-glucanasas en respuesta a la infección de *F. verticillioides*.

Se determinó la actividad total de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de embriones de maíz como respuesta a la infección de las distintas cepas de *F. verticillioides* a las 24 y 30 horas después de la inoculación mediante ensayo espectrofotométrico (**APÉNDICE, Figura I**). Los resultados se muestran en la **Figura 20**.



**Figura 20.** Efecto de la infección de 4 cepas de *F. verticillioides* en embriones de maíz sobre la actividad total de las  $\beta$ -1,3-glucanasas. Se cosecharon muestras de embriones a 24 hpi con una actividad basal de 0.17 mg glucosa/mg proteína y 30 hpi con una actividad de 0.11 mg glucosa/mg proteína. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes evaluados por triplicado. Para cada tiempo, las medias con distintas letras sobre la barra indica diferencia significativa ( $P < 0.01$ ; prueba de Tukey).

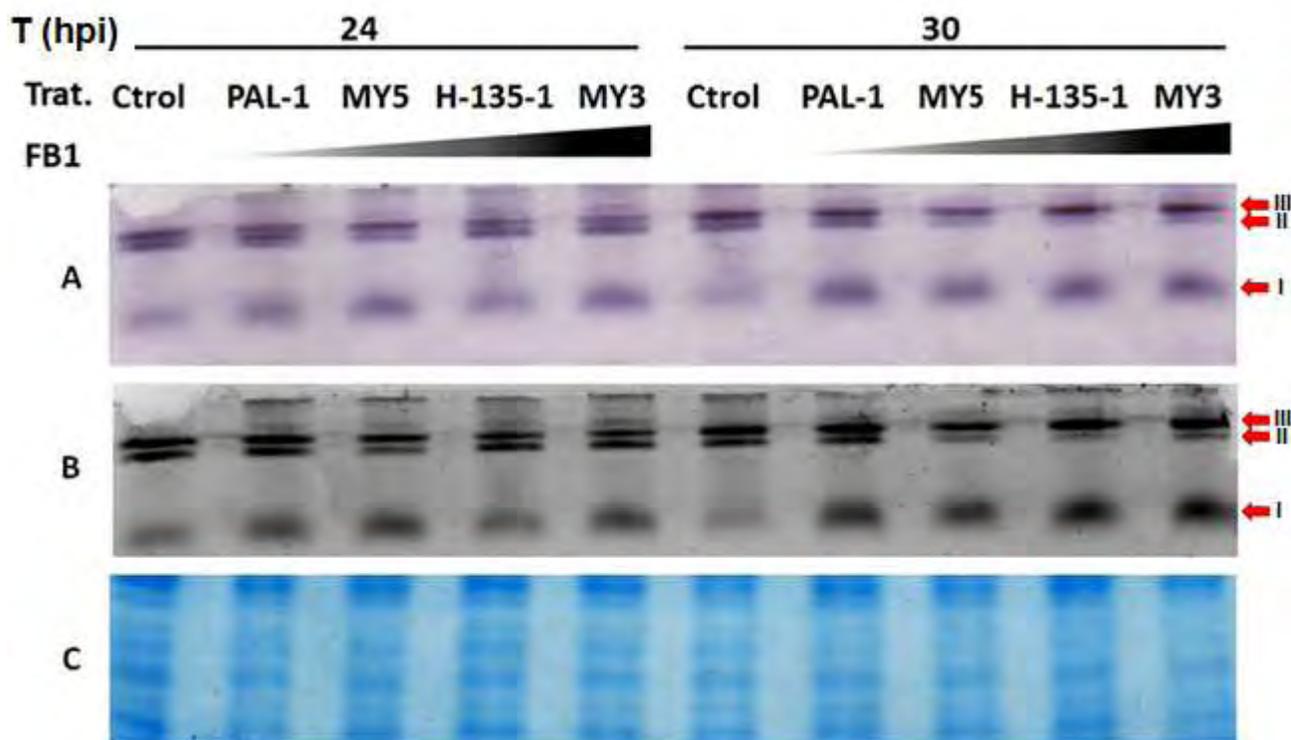
A las 24 horas después de la inoculación se observa una reducción de la actividad total de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de embriones infectados con las 4 cepas de *F. verticillioides* respecto al control. Esta disminución fue más acentuada con las H-135-1 y MY3, pues se alcanzó hasta 50% de inhibición y fue significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) que la inhibición provocada por las cepas MY5 y PAL-1 (30% de inhibición).

A las 30 horas de infección el patrón de actividad de las glucanasas cambió radicalmente pues se observó una inducción discreta de la actividad con tres cepas (PAL1, H135 y MY3). Con la cepa MY3 se observó un incremento de aprox. 30%; sin embargo, la variancia no permitió definir diferencias claras entre las cepas.

En este ensayo se evalúa la actividad de las distintas isoformas de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en su conjunto, por lo que se recurrió a un ensayo en gel para poder distinguir las y saber de una forma más definida la manera en que es afectada la actividad de cada una de ellas.

#### 4.2 Actividad en gel de las distintas isoformas de las $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en respuesta a la infección de *F. verticillioides*.

Las proteínas extraídas de embriones de maíz infectados con las cepas de *F. verticillioides* se separaron por electroforesis en condiciones nativas sin SDS ni agentes reductores. El patrón de proteínas y la actividad de las glucanasas en respuesta a la infección de las distintas cepas de *F. verticillioides* se muestran en la **Figura 21** y **Figura II (APÉNDICE)**.



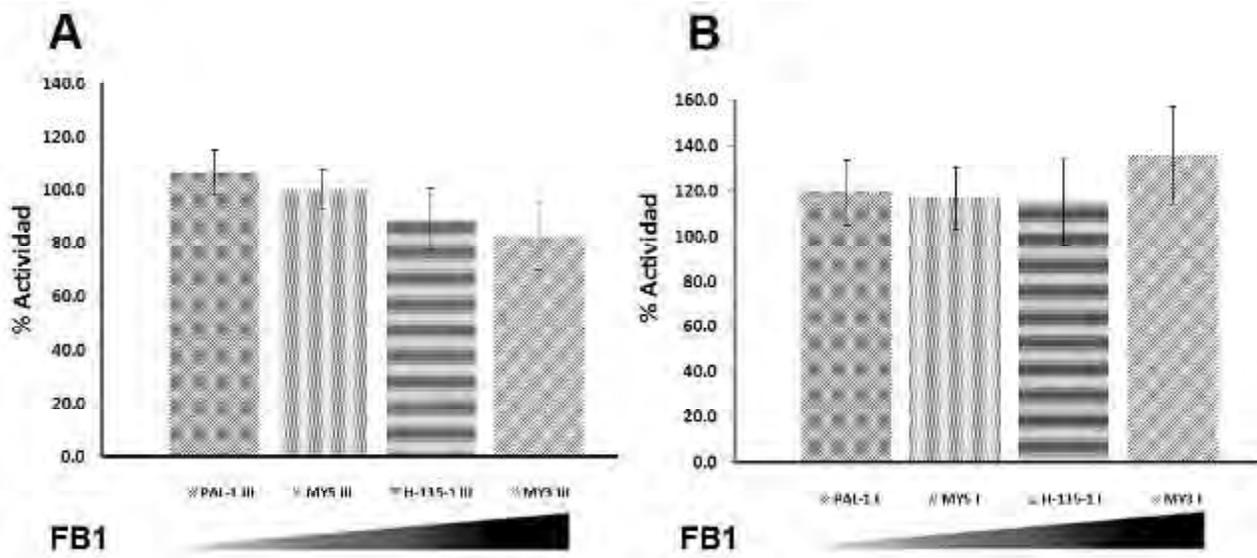
**Figura 21. Actividad de las diferentes isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en gel resuelto en condiciones nativas.** Cada carril corresponde a cada una de las cepas utilizadas a las 24 y 30 horas. Geles representativos de actividad documentados en scanner HP G3110 (A) y en Chemidoc Bio-Rad (B). C. Control de carga del gel corrido en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y teñido con azul de Coomassie.

En este tipo de geles se observan consistentemente dos isoformas básicas de lento corrimiento en la parte superior del gel (III y II) y una isoforma ácida de corrimiento rápido en la parte inferior (I). Estas mismas isoformas corresponden a las reportadas por Sánchez-Rangel (2012). En ellos se muestra el efecto de la infección en la actividad de las distintas isoformas de las  $\beta$ -1,3-glucanasas sobre todo tras 30 hpi.

Se puede observar una reducción discreta en la actividad de la isoforma básica III siendo más notorio en aquellas con infección de las cepas MY5, H-135-1 y MY3 a las 24 horas, mientras que a las 30 horas se observa más con la cepa MY5.

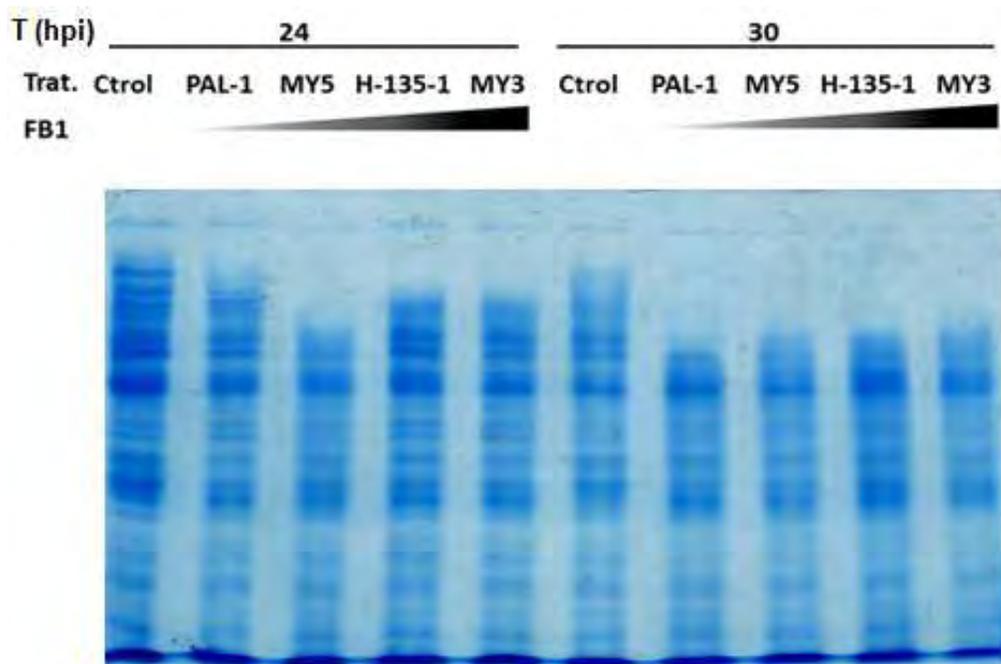
La actividad de la isoforma básica II mostró una disminución apreciable a las 24 y 30 h en las muestras provenientes de la inoculación con las cepas MY5, H-135-1 y MY3. La isoforma ácida I mostró una mayor actividad respecto al control por parte de las cuatro cepas de *F. verticillioides*, siendo las de mayor actividad las cepas MY5 y MY3 a las 24 horas y PAL-1, H-135-1 y MY3 a las 30 horas.

Para tener una estimación cuantitativa de la actividad de las isoformas se hizo un análisis densitométrico de las bandas en el equipo Chemidoc Bio-Rad y el software Image Lab Bio-Rad y se obtuvo el promedio de 4 geles. Los resultados de parte de este análisis se muestran en la **Figura 22**. Para la isoforma básica III, la cepa MY3 provocó una reducción discreta pero significativa ( $p < 0.05$ ) del 20% en su actividad (Fig. 22A). A las 30 h, las 4 cepas activaron la isoforma III ácida entre un 20% y 35% con respecto al control no inoculado (Fig. 22B). El análisis densitométrico de las otras isoformas a las 24 y 30 h no reportó diferencias significativas y las gráficas se presentan en la **Figura IV** del **APÉNDICE**.



**Figura 22.** Actividad de las isoformas de las  $\beta$ -1,3-glucanasas por la infección de cepas de *F. verticillioides*. **A.** isoforma básica III a las 24 horas posinfección. Se puede observar una relación inversa entre la actividad de la isoforma y la cantidad de FB1 producida por las distintas cepas. **B.** isoforma ácida I tras 30 hpi. Se puede observar el incremento de la actividad por la infección de MY3, cepa con la mayor producción de FB1. Actividad determinada mediante densidad óptica con el software Image Lab Bio-Rad.

Para verificar el cargado homogéneo de proteína en los geles de actividad, se corrieron geles réplica SDS-PAGE. En las muestras correspondientes a los embriones de maíz inoculados carecían de proteínas de alto peso molecular, sobre todo a las 30 horas. Es posible que esto se deba a la actividad de proteasas inducidas por la infección (**Figura 23** y **Figura III del APÉNDICE**).



**Figura 23.** Geles cargados con las proteínas totales del extracto de los embriones infectados con las diferentes cepas a las 24 h y 30 h. Este gel se resolvió por SDS-PAGE.

## 5. Ensayos de Infección en plántulas de maíz.

Se realizaron diversos ensayos para observar los fenotipos que desarrollaban distintos tejidos de la plántula de maíz en respuesta a la infección de las cuatro cepas de *F. verticillioides* con distintos niveles de producción de FB1. Para ello se emplearon plantas de maíz en distintos estados de desarrollo de la raza “Chalqueño” y en algunos casos también el híbrido ZR-76. Ambos genotipos presentan susceptibilidad a la FB1.

### 5.1 Severidad en tejido infectado de embriones post-germinados de maíz.

Los embriones germinados por 72 horas se inocularon mediante una punción con 50,000 conidias en la parte central del embrión. Tras 72 horas se evaluó el efecto en el área de lesión y en la severidad del daño producido (**Figura 24**).

En la figura 24 se observan las lesiones causadas por la inoculación de las cepas utilizadas como áreas del tejido necrosadas que se observan de una coloración más intensa en las cepas MY5, H-135-1 y MY3. Se observa también el desarrollo de micelio y la pigmentación rosa-rojiza característica de *F. verticillioides* en semillas infectadas con las cepas MY5, H-135-1 y MY3. Las semillas control se trataron únicamente con agua estéril y muestran que el daño mecánico producido por la punción no afectó la germinación.

### 5.2 Efecto en la elongación radicular.

La FB1 afecta la elongación radicular de semillas de maíz por lo que se evaluó este parámetro con las 4 cepas. Para este experimento se siguió el mismo protocolo realizado para el experimento anterior únicamente cambiando la variedad de maíz utilizado que ha sido el “Chalqueño” para todos los experimentos anteriores por el híbrido ZR-76 que también ha mostrado susceptibilidad a la FB1. Este cambio se realizó ya que existía una alta variabilidad en la elongación radicular mientras que este genotipo ha mostrado un crecimiento radicular más uniforme. Los resultados se muestran en las **Figuras 25 y 26**.

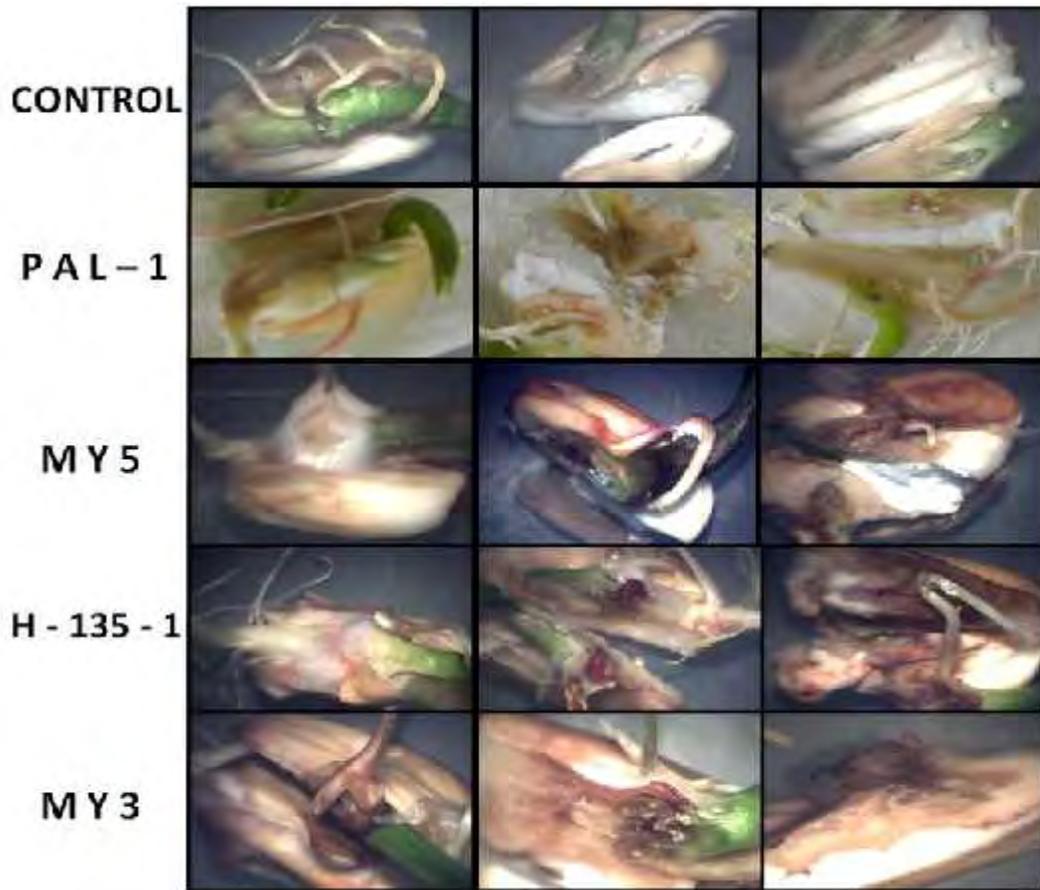


Figura 24. Embriones de maíz inoculados con 50,000 conidias de las cuatro cepas de *F. verticillioides* a 72 horas de germinación por punción. Se muestra la semilla completa y el corte longitudinal de la misma. Se observa un mayor índice de daño con las cepas MY5, H-135-1 y MY3.

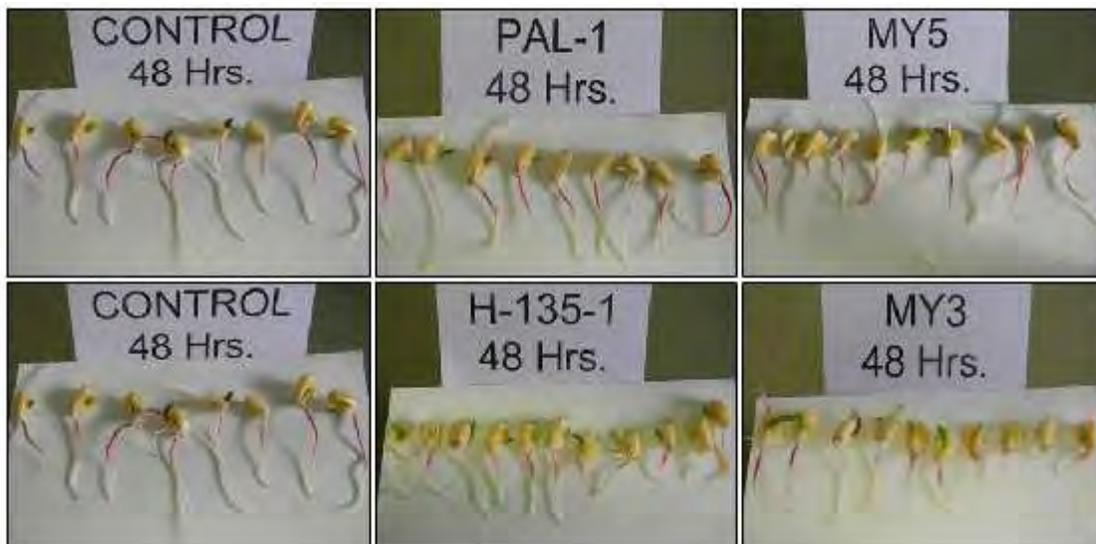
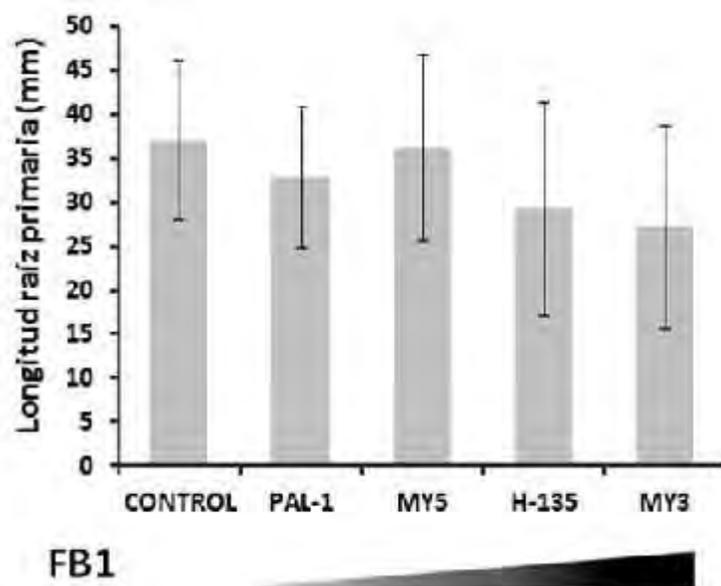


Figura 25. Efecto de la elongación radicular tras 48 horas de infección por punción con 50,000 conidias de las cepas PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3 en semillas de maíz ZR-76. Se alcanzan a distinguir semillas inoculadas con las cepas H-135-1 y MY3 con una menor elongación radicular.



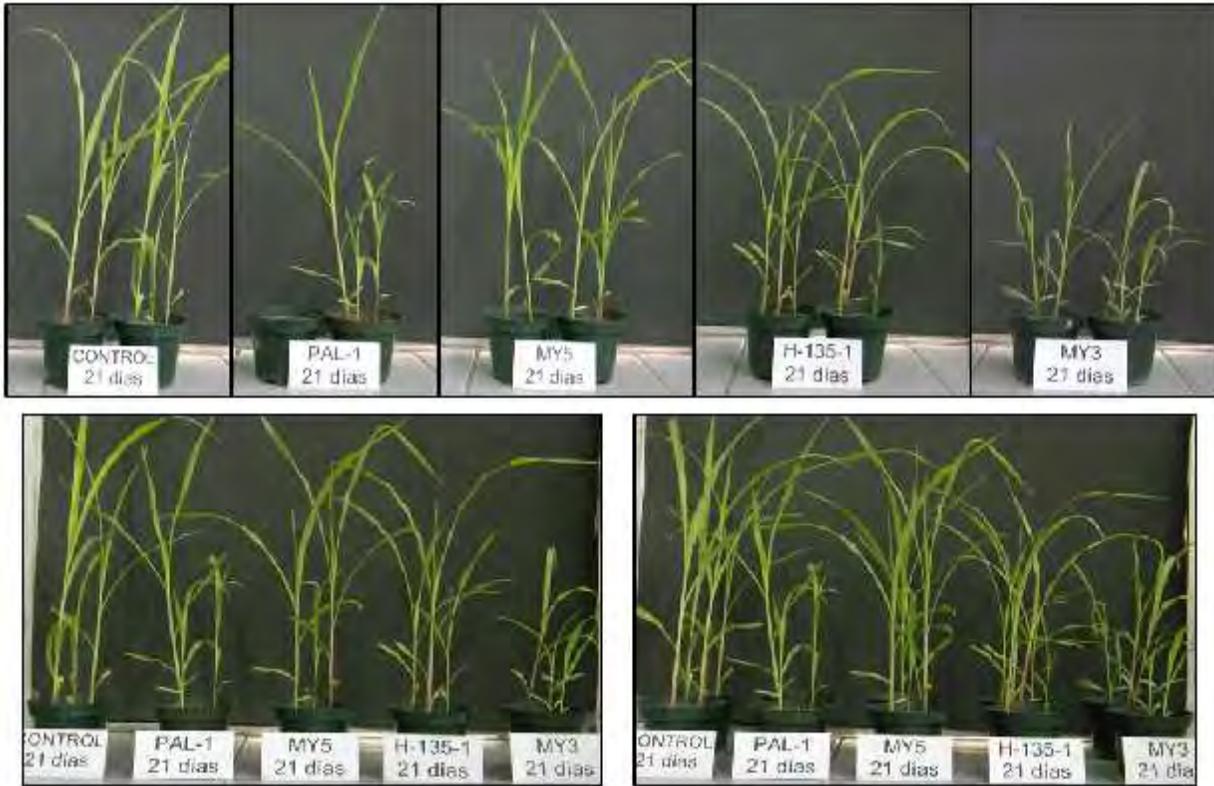
**Figura 26. Efecto de la elongación radicular tras 48 horas de infección por punción con 50,000 conidias de las cepas PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3 en semillas de maíz ZR-76.** Se observa una tendencia en la disminución de la elongación radicular a medida que la cepa produce mayor cantidad de FB1.

La cepa MY3 provocó una reducción del 30% en la longitud de la radícula, seguida de la cepa H-135-1 con una reducción del 20%. Aunque este experimento presenta una tendencia donde las cepas con mayor producción de FB1 tuvieron mayor efecto en este parámetro, no es concluyente por la alta dispersión de los datos. Esto se puede remediar incrementando el número de semillas (n) a probar.

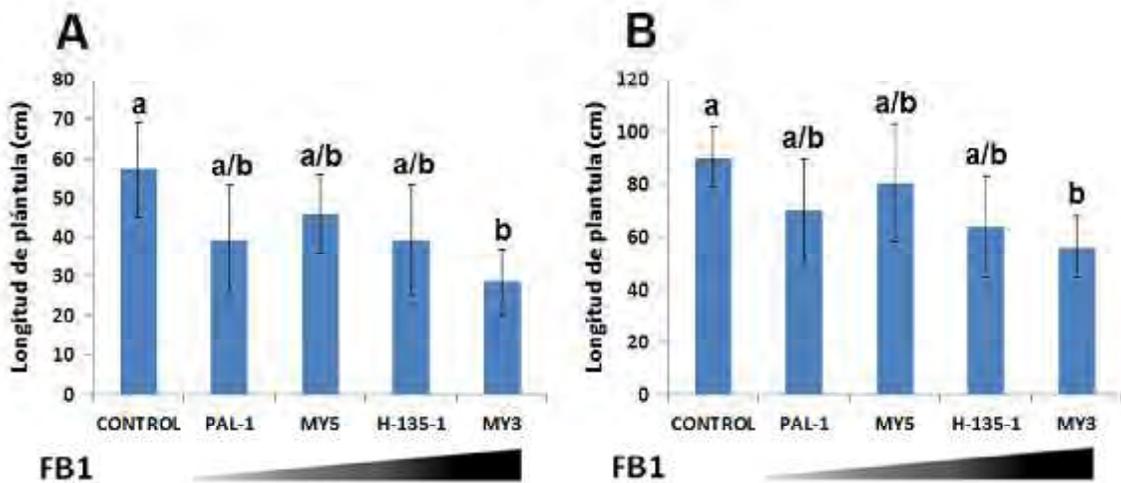
### 5.3 Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz.

También se estudió el efecto de la infección de las 4 cepas sobre el crecimiento de plantas de maíz de 21 días (**Figuras 27 y 28; y Figuras V y VI del APÉNDICE**).

Las plántulas infectadas con la cepa H-135 y MY3 muestran una reducción en la longitud de la parte aérea, sobre todo en plántulas infectadas por esta última cepa. La cepa MY5 no muestra diferencias importantes con el control mientras que algunas plántulas de la cepa PAL-1 mostraron una reducción importante respecto al control y otras no, además que la mitad de éstas no germinaron.



**Figura 27. Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz tras 21 días post-plantadas.** Las semillas fueron embebidas en suspensión de 50,000 conidias/mL durante la germinación con cada una de las cuatro cepas de *F. verticillioides*.



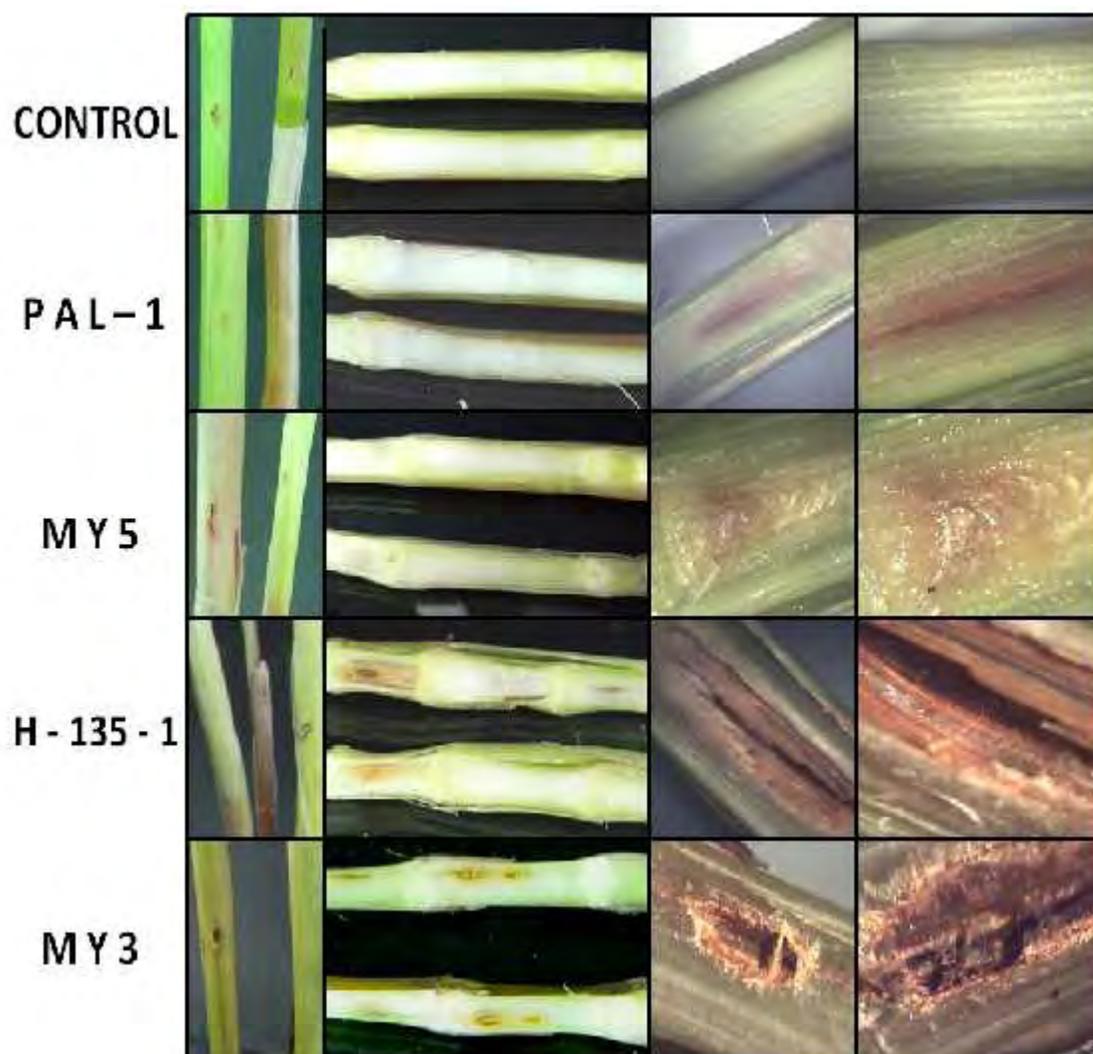
**Figura 28. Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz.** **A.** Longitud del tallo en plantas de 21 días. Esta última muestra el mayor efecto en el decremento el cual es significativo respecto al control (n = 6; P < 0.05) **B.** Longitud del tallo en plantas de 32 días post-infección.

La infección por la cepa MY3 causó una clara disminución en la longitud del tallo de las plántulas de maíz ( $P < 0.05$ ), seguido por la cepa H-135-1. Aunque las cepas PAL-1 y MY5 tuvieron un efecto discreto en el crecimiento de las plantas, éste no fue significativo y las plántulas inoculadas con la cepa PAL-1 mostraron resultados muy variables. Esta misma tendencia se mantiene de los 21 a los 32 días. Ninguna de las plántulas infectadas con las distintas cepas presentó otros síntomas como disminución en el número de hojas o presencia de lesiones necróticas en éstas.

#### 5.4 Infección de *F. verticillioides* en tallos de maíz.

Otra enfermedad relevante causada por *F. verticillioides* es la pudrición del tallo. Para evaluar el papel de la FB1 en el desarrollo de esta enfermedad se inocularon 50,000 conidias de cada una de las 4 cepas en la región internodal de tallos de plantas de maíz de 6 semanas de haber sido plantadas. Tres semanas después de la inoculación se realizó un corte longitudinal para observar los daños al tejido ocasionados por el hongo (**Figura 29**).

Se observaron cambios en la coloración de la parte interna del tallo debido a la infección de *F. verticillioides*. La coloración rojiza o marrón se presentó en los tallos inoculados con las cepas PAL-1 y MY5. La cepas H-135-1 y MY3 causaron una zona de necrosis en las que incluso se observó la presencia de micelio. Los tallos control tratados con agua estéril no mostraron daño, ni siquiera por la herida mecánica producida al realizar la punción. Este efecto se mostró también en los embriones de semillas controles inoculados de manera similar.



**Figura 29. Tallos de maíz infectados con *Fusarium verticillioides*.** Los tallos de plántulas de 5 semanas fueron heridos por punción e inoculados 50 000 conidias de la suspensión de conidias de las cepas PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3. Tras 3 semanas se realizó el corte longitudinal para observar lesiones en el área de punción cuya severidad es mayor para las cepas H-135-1 y MY3.

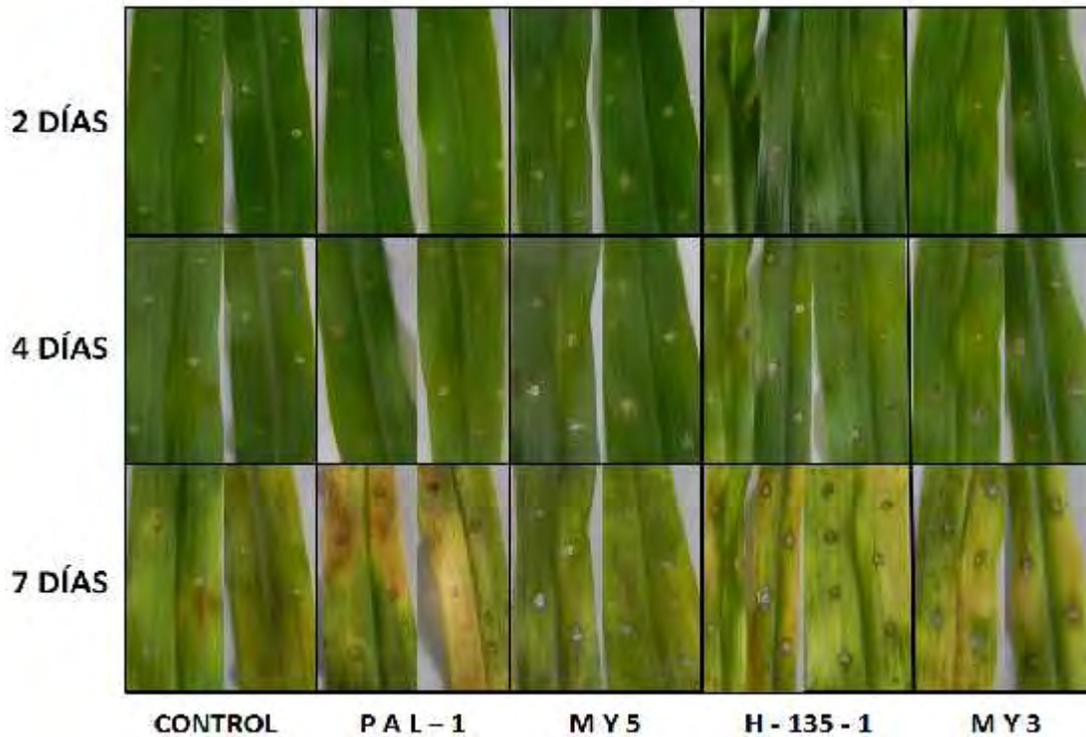
La figura VII (ver APÉNDICE) muestra las lesiones causadas en tallo y semillas germinadas en maíz híbrido ZR-76 con resultados similares a los encontrados con la raza “Chalqueño”.

### 5.5 Infección de *F. verticillioides* en hojas de maíz.

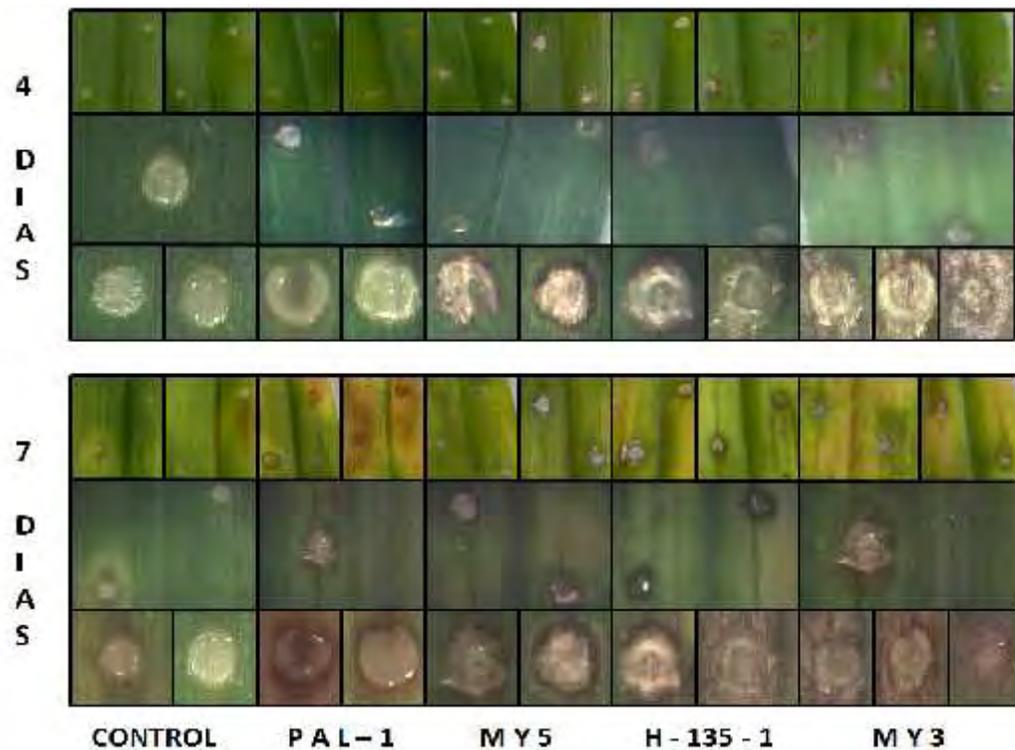
También evaluamos la severidad de la lesión que produjeron las cuatro cepas en hojas de maíz. Para esto se inocularon 50,000 conidias en hojas desprendidas de plantas de maíz de 4 semanas. Tras dos días de infección observamos síntomas de decoloración en el sitio de punción sobre todo en las cepas MY5, H-135-1 y MY3. A los cuatro días el área de lesión avanzó, la coloración se hizo más oscura e incluso se observó la presencia de micelio.

A los 7 días las lesiones necróticas contrastaron con la clorosis observada en hojas infectadas con PAL-1, H-135-1 y MY3. El desarrollo de micelio fue evidente, sobre todo en las cepas MY5 y H-135-1 y la infección avanzó en la misma dirección que las nervaduras de las hojas desde el sitio de punción (cepas H-135-1 y MY3). Los resultados se muestran en la **Figura 30**. En la **Figura VIII** del **APÉNDICE** se muestra una réplica del experimento donde se observa un mayor avance de la infección por la cepa MY3 en este tejido.

En la **Figura 31** se observa un mayor detalle del sitio de infección; las cepas MY5, H-135-1 y MY3 presentaron un desarrollo considerable tras 4 días de infección. La cepa MY3 provocó la mayor área de lesión. La cepa PAL-1 causó un daño mínimo a los 4 días, sin embargo, a los 7 días se observa un aumento considerable en las lesiones. Las tres cepas restantes muestran una abundante formación de micelio en varios de los sitios de punción así como una coloración café pronunciada y el avance de las lesiones necróticas no solo en la periferia del sitio de punción si no que se extiende sobre más allá del tejido (cepas H-135-1 y MY3).



**Figura 30. Lesiones provocadas por las 4 cepas de *F. verticillioides* en hojas de maíz.** Se tomaron aprox. 10 cm de las hojas secundarias y terciarias de plántulas de 4 semanas y fueron heridas por punción. Se inocularon 50,000 conidias de las 4 cepas y se incubaron en cámara húmeda para registrar los síntomas a los 2, 4 y 7 días post-infección.



**Figura 31. Inoculación de *F. verticillioides* en hojas de maíz.** Imagen tomada en microscopio estereoscópico muestra los daños producidos en el área de punción a los 4 y 7 dpi.

## VII. DISCUSIÓN

### A. Asociación entre la producción de FB1 y la colonización de maíz durante la germinación.

La cuantificación de FB1 de las distintas cepas en medio GYAM reveló que la cepa MY3 tiene la mayor producción de FB1 (26,000  $\mu\text{mol/mL}$ ) seguida por la cepa H-135-1 con una producción aproximada de la micotoxina 10 veces menor (2,400  $\mu\text{mol/mL}$ ). Las cepas PAL-1 y MY5 produjeron niveles más bajos que estas dos primeras cepas: 20  $\mu\text{mol/mL}$  y 16  $\mu\text{mol/mL}$  de FB1 respectivamente. En la caracterización inicial de estas cepas se usó arroz estéril como sustrato para determinar los niveles de FB1 producida (Sánchez-Rangel et al. 2005). Estos niveles dependen del sustrato, condiciones y tiempo de incubación. Sin embargo el orden de producción de las cepas se mantuvo en los sustratos de medio GYAM y arroz estéril.

Para responder la pregunta si los niveles de producción de FB1 en sustratos estériles son comparables a la síntesis *in planta*, se inocularon embriones de maíz con las cepas de *F. verticillioides* y se germinaron. En este tejido vivo la cepa MY3 resultó la de mayor producción (135,000  $\mu\text{mol/ng}$ ) seguida nuevamente de la cepa H-135-1, mientras que las cepas MY5 y PAL-1 sintetizaron bajos niveles de la toxina.

Por los resultados obtenidos en ambos modelos, clasificamos a las cepas MY3 y H-135-1 como cepas con alta producción de FB1, y a PAL-1 y MY5 de baja producción. La capacidad de producción de FB1 es independiente del origen geográfico de los aislados, pues las cepas MY3 y MY5 se aislaron del Valle del Yaquí en Sonora, mientras que las cepas H-135-1 y PAL-1 se aislaron del Edo. de México. La alta diversidad en los niveles de FB1 producida por distintas cepas de *F. verticillioides* es consistente con otros estudios en México y todo el mundo. Algunos de los rangos en producción de FB1 que se han reportado han sido de 10-6421 ppm (Nelson et al. 1991), 10-5810 mg/g (Desjardins et al. 1994), 0.1-4047 mg/g (Sánchez-Rangel et al. 2005), 114-38860 ng/g (van der Walt et al. 2006).

Se utilizó la producción de conidias *in planta* como un primer parámetro para estudiar la asociación entre la virulencia de *F. verticillioides* y los niveles de FB1 sintetizada. Al infectar los embriones de maíz con las cuatro cepas observamos que las cepas MY3 y H-135-1 produjeron más conidias en el tejido vegetal que las cepas MY5 y PAL-1. Además estas cepas de alta producción afectaron de forma acentuada la germinación de los embriones infectados. Este efecto correlaciona con lo que se ha reportado donde se ha visto que la FB1 aplicada exógenamente retarda el crecimiento (Dohelert et al. 1994; Gutiérrez-Nájera 2005).

La cepa MY3 colonizó con mayor eficiencia los embriones y causó una disminución más acentuada en la germinación que las otras cepas. Las cepas MY5 y PAL-1 tuvieron un efecto menor en la inhibición de la germinación, así como una pobre colonización del tejido. La cepa H-135-1 la cual produjo una cantidad importante de FB1 provocó reducción en la germinación y una alta colonización de embriones, solo superada por MY3. A medida que la carga de conidias es mayor, la germinación de las mismas disminuye (Cordero et al., 1993).

Se ha reportado que la FB1 ayuda a facilitar la colonización del tejido, por parte de *F. verticillioides* (Desjardins et al. 1995), además de participar en la inhibición o retardo de la germinación donde la inhibición de la ATPasa de H<sup>+</sup> por acción de la FB1 disminuye la acidez involucrada en procesos de elongación radicular (Gutiérrez-Nájera et al 2005).

Se ha visto asociación entre la conidiación y la producción de metabolitos secundarios, entre ellos la FB1 (Brodhagen & Keller 2006; Gao et al. 2007). Mutantes con delección de genes como el *fcc1* que codifica a una cinasa tipo C que interactúa con la proteína Fcc1, muestran una disminución en la producción de FB1 y la conidiación (Bluhm et al. 2006). La delección en el gen *GBP1* que codifica a una proteína G monomérica muestra el mismo efecto (Sagaram et al. 2006). También hay fenotipos en los que esta asociación no ocurre: mutantes afectadas en el gen *GBB1* que codifica a una subunidad β de una proteína G heterotrimérica muestran reducción en los niveles de FB1 pero no en conidiación (Sagaram 2007).

En embriones infectados mediante punción e inoculación de conidias se observaron lesiones más severas con las cepas de alta producción de FB1 (H-135-1 y MY3), seguida por la cepa MY5, mientras que la cepa PAL-1 con una menor producción de micotoxina muestra lesiones de manera más localizada. Aun cuando estos resultados son cualitativos, reflejan la capacidad de colonización y generación de síntomas del hongo patógeno.

### **B. Ensayo de Actividad de las $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en respuesta a la infección por *F. verticillioides*.**

La actividad total de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz se realizó por el procedimiento descrito por Sánchez-Rangel (2012) donde reporta una disminución en la actividad total a las 18 horas respecto al control y un aumento a las 24 horas de embriones en presencia de FB1 20  $\mu$ M. En nuestro experimento se observó la misma tendencia pero en embriones infectados con las distintas cepas donde MY3 mostró en mayor medida este efecto pero a las 24 y 30 horas respectivamente. Cabe destacar la importante disminución de la actividad total a las 24 horas en embriones tratados con las cepas H-135-1 y MY3 (50%-60%) de mayor producción de FB1, mientras a las 30 horas se observa un claro aumento en la actividad con las cepas PAL-1 y MY3 en un 20% y de hasta un 40% por parte de la cepa H-135-1.

En los geles de control de cargado carecen de proteínas de alto peso molecular con la infección de las cuatro cepas de *F. verticillioides*. Lo que se muestra de manera más evidente y uniforme a las 30 hpi. Este hecho no parece estar relacionado a la presencia de FB1 pero sí a la infección ya que ilustra que existen cambios bioquímicos en respuesta a la infección del hongo, muy posiblemente por la activación de proteínas relacionadas a patogénesis con actividad de proteasa (Ferreira et al. 2007).

Los geles corridos en condiciones nativas con el que se reveló la actividad de las  $\beta$ -1,3-glucanasas permitieron observar 3 isoformas que corresponden a las encontradas por Sánchez-Rangel (2012) aunque no se descarta la presencia de algunas otras. Dos isoformas de lento corrimiento que se observan como dos

bandas delgadas y paralelas en la parte superior (II y III) y que fueron identificadas con naturaleza básica (pI= 8.5-9.0) y una isoforma de corrimiento rápido (I) que se observa como una banda ancha y caracterizada como ácida (pI= 5.3) mediante isoelectroenfoque (IEF) en condiciones nativas.

Aun cuando el análisis cuantitativo de este efecto es difícil de determinar, las 4 réplicas provenientes de dos experimentos independientes mostraron la tendencia de los resultados. Se observó inhibición de las isoformas básicas de las glucanasas, respecto al control, efecto que se vio en mayor medida a las 30 hpi. Las cepas con una producción mayor de FB1: MY3 y H-135-1 mostraron un mayor grado de inhibición de la isoforma básica II, misma tendencia que la encontrada por densitometría óptica para la isoforma básica III a las 24 horas, lo que concuerda con el trabajo previo *in vitro* donde a mayor cantidad de FB1 añadida a embriones de maíz se observaba una mayor inhibición de estas isoformas.

En contraste, se observó una mayor actividad de la isoforma ácida I en las cuatro cepas, sobre todo en las de mayor producción (H-135-1 y MY3) a las 30 hpi. Mientras que la cepa MY3 mostró por densitometría óptica la mayor inducción de esta isoforma. Esto concuerda también con lo encontrado por Sánchez-Rangel (2012) y que esta inducción podría estar mediada por la vía del ácido salicílico activadas por las bases esfingoideas cuyos niveles aumentan por acción de la FB1.

La disminución de la actividad total a las 24 horas visto en mayor medida por cepas con mayor producción de FB1 y la activación mayor a las 30 hpi puede explicarse en cierto modo al observar la tendencia de cada una de las isoformas, ya que la producción de FB1 puede inhibir la actividad de las enzimas de defensa constitutivas a las 24 hpi, mientras que a 30 hpi la actividad total se ve aumentada en medida que aumenta la actividad de la isoforma ácida.

Se ha observado que distintos patógenos usan moléculas capaces de inhibir defensas constitutivas por ejemplo el inhibidor GIP1 secretado por *Phytophthora sojae* actúa específicamente sobre una isoforma de  $\beta$ -1,3 glucanasa de soya y tiene actividad inhibitoria en otras hidrolasas (Misas-Villamil et al. 2008). Los resultados

reportados anteriormente y en este trabajo aportan evidencias importantes sobre la función efectora de la FB1 en este tipo de inhibición de proteínas de defensa básicas que favorecería su infección.

Por otro lado se presenta la inducción de una isoforma ácida en respuesta a la infección del hongo y al parecer proporcional a la producción de FB1. La actividad de esta isoforma posiblemente es mediada por la vía del ácido salicílico, ocasionando un aumento en la hidrólisis de componentes estructurales de la pared del hongo y que estas moléculas puedan funcionar como elicitores que desencadenan y amplifican otras respuestas de defensa. Este es un ejemplo de inducción por parte del huésped en respuesta a la infección de un agente patógeno o incluso de un tipo de inmunidad mediada por la misma FB1.

### **C. Asociación entre la producción de FB1 y enfermedades en plantas de maíz.**

Dado que *F. verticillioides* causa enfermedades a lo largo del desarrollo del maíz, también probamos la hipótesis sobre el papel de la FB1 por la infección de plantas en estadíos post-germinación. Al evaluar la pudrición del tallo, las cepas H-135-1 y MY3 causaron daños más severos en la zona de punción ya que observamos áreas de necrosis más extensas severas y un mayor desarrollo de micelio que con las cepas PAL-1 y MY5.

En el genotipo susceptible, el híbrido ZR-76, observamos que las cepas H-135-1 y MY3 también provocaron necrosis más severa en tallo. En contraste, los controles no mostraron daño alguno, ni siquiera por el daño mecánico provocado por la punción ya que estos tejidos presentan una alta proliferación celular que conllevan a la reparación del tejido (Sena & Birnbaum 2010), mecanismos que podrían verse afectados por la infección.

Del mismo modo, en el ensayo de infección de hojas, las cepas MY3 y H-135-1 tuvieron un mayor grado de colonización del tejido y severidad en el sitio de punción, por la decoloración en el tejido, que las otras dos cepas y un desarrollo abundante del micelio. Así mismo el efecto de la FB1 en el crecimiento se observó en la disminución de la elongación radicular en cepas con mayor producción aunque no se

observó de manera tan clara, pero sí se apreció este efecto en la longitud de las plántulas donde MY3 muestra una reducción significativa del tamaño de la parte aérea respecto al control.

El papel de la fumonisina en la virulencia de *F. verticillioides* se ha debatido por mucho tiempo y hay evidencias bioquímicas y genéticas para probar esta hipótesis. Las evidencias bioquímicas consisten en la aplicación exógena de FB1 en distintos tejidos de maíz: Dosis de FB1 13  $\mu$ M han mostrado el decremento en el crecimiento del tallo en un 50 % y en raíces de hasta 75 % (van Asch et al. 1992; Doehlert et al. 1994) mientras que concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100  $\mu$ M es visible la reducción en la longitud de tallo y raíces (Lamprecht et al. 1994). Recientemente, Williams y colaboradores (2007) reportan una correlación inversa entre la longitud y peso de las raíces con los niveles de FB1, además que plántulas de maíz no infectadas regadas con FB1, causan una significativa respuesta dependiente a la dosis en la reducción del desarrollo de raíz y tallo, así como la presencia de lesiones en hojas.

Las evidencias genéticas se basan en el uso de cepas con distinta capacidad de producción de FB1 o que no la produzcan. Para esto suelen utilizarse cepas mutantes con el gen *FUM1* interrumpido. Se ha visto que las cepas productoras de fumonisina son virulentas y aquellas que no la sintetizan no son capaces de infectar a plantas (Desjardins et al. 1995). Sin embargo no encontraron relación en cuanto a la pudrición de tallo y mazorca. Por ello refieren que las fumonisinas aumentan la virulencia de *F. verticillioides* pero no son necesarias o suficientes para el desarrollo de la enfermedad. Además, se han reportado otros casos donde no se muestra correlación entre producción de FB1 y virulencia (Desjardins et al. 2000, 2002).

En contraste Glenn y colaboradores (2008) transformaron una cepa de *F. verticillioides* con el locus *FUM*. Esta cepa es incapaz de sintetizar FB1 y de infectar maíz pero la transformación y expresión de los genes le confiere la capacidad de sintetizar la toxina y producir infecciones en plántulas de maíz con síntomas característicos, como la aparición de lesiones necróticas, blanqueamiento del tejido y disminución en el crecimiento. Esta es una importante evidencia del papel fisiológico de la FB1 en la virulencia de *F. verticillioides*.

Estos resultados contrastantes pueden deberse a diversos factores como la variabilidad de métodos entre las distintas investigaciones, la forma en que se inocula *F. verticillioides*, el genotipo del hospedero, el sustrato utilizado o la forma de aplicar las fumonisinas. Además debemos recordar la presencia de otras micotoxinas y la producción de enzimas líticas que influyen en la interacción. Keshri & Magan (2000) encontraron que cepas no micotoxigénicas de *F. verticillioides* producen una actividad total y específica de algunas enzimas hidrolíticas mayor que en cepas toxigénicas. Incluso se ha observado también una diferente respuesta fitotóxica de la FB1 dependiendo del genotipo de huésped y la dosis aplicada, ya que se ha observado una inducción del crecimiento a bajas concentraciones de FB1 antes que un efecto nocivo (Yates et al. 1997; Arias et al. 2012).

Recientemente se ha evidenciado el efecto de diversos factores como el genético, con el que se han disminuido variaciones y observado mayor relación entre la cantidad de FB1 y la virulencia en maíz (Desjardins et al. 2005; Dall'Asta et al; 2012) incluso en la pudrición de mazorca (Miedaner et al. 2010; Hung & Holland 2010; Picot et al. 2013). En resumen, las evidencias apoyan que la fumonisina contribuye a la virulencia de *F. verticillioides* en la infección de tejidos de maíz, aunque este efecto no es tan claro en la pudrición del tallo.

El estudio presentado aquí contribuye con evidencias genéticas aprovechando la variabilidad natural en la capacidad de producir fumonisina por las distintas cepas de *F. verticillioides*. Se emplearon dos cepas aisladas del noroeste y dos cepas del centro de México y que contrastaban en la producción de FB1. Aunque no se usó una cepa nula en la producción de fumonisina, consideramos que los resultados son válidos e interesantes pues las plantas de maíz están expuestas a una población diversa de cepas del patógeno.

Los resultados son consistentes con lo publicado en la literatura pues muestran que la FB1 contribuye a la virulencia de las cepas, provocando síntomas más severos y un mayor grado de necrosis en la infección de las cepas H-135-1 y MY3. Se establecieron las bases y protocolos para la inoculación de plantas de maíz en distintos estadios de desarrollo y se deberán implementar técnicas cuantitativas para

evaluar la severidad de los síntomas. Una limitante en este estudio fue el material biológico y el espacio en el invernadero ya que un número mayor de plantas nos hubiera permitido hacer análisis estadísticos más robustos.

Se corroboró que las 4 cepas de *F. verticillioides* tienen efectos diferenciales en la actividad de las  $\beta$ -1,3 glucanasas, aun cuando este efecto es difícil de determinar ya que las isoformas ácidas son activadas mientras que las isoformas básicas son suprimidas.

Este proyecto busca aportar evidencias y generar conocimiento que ayuden a entender mejor el papel de la FB1 en la interacción *F. verticillioides*-maíz para desarrollar aplicaciones en el campo que ayuden a reducir el índice de enfermedades atribuidas a este hongo y la contaminación ocasionada por las mismas. Si bien el uso de mutantes en la producción de FB1 es una herramienta ampliamente utilizada y con resultados muy convincentes, el uso de las cepas aisladas de campo a pesar de no ser isogénicas y presentar variabilidades, muestran una mayor aproximación a lo que ocurre naturalmente en el campo y ayuda a entender mejor las causas y efectos en que se produce esta compleja interacción.

## VIII. CONCLUSIONES.

- ✓ Las cepas utilizadas muestran un amplio rango de producción de FB1 que varía en un rango entre 1 y 10,000 veces entre la cepa de menor y mayor producción.
- ✓ Las distintas capacidades de producir FB1 por las 4 cepas en medio definido se reflejó en la producción en el tejido vegetal.
- ✓ Las cepas MY3 y H135 que producen niveles elevados de FB1, tuvieron una mayor capacidad de colonizar embriones de maíz, inhibir germinación de las semillas, inhibir la elongación radicular y el crecimiento del tallo y de causar áreas de necrosis más severas en tallos y hojas de maíz.
- ✓ Las cepas MY3 y H135 que producen niveles elevados de FB1, inhibieron significativamente la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas a las 24 horas, posiblemente por su acción sobre las isoformas básicas de estas enzimas.

## IX. PERSPECTIVAS.

- Incrementar la muestra en los ensayos de semillas y de plantas para poder realizar un análisis estadístico más robusto.
- Realizar experimentos bajo ciertos factores como temperatura y humedad que causen estrés en la planta y observar el efecto del desarrollo del hongo asemejando condiciones ambientales.
- Seguir la investigación utilizando otras cepas con distinta producción de FB1, así como cepas mutantes incapaces de producir la toxina. También utilizar distintos genotipos de maíz que puedan presentar susceptibilidad o tolerancia a estas cepas incluso también probar con otras micotoxinas.
- Desarrollar mediante técnicas de biología molecular metodología aplicada a la detección, control y prevención de *F. verticillioides* en maíz con el fin de reducir los riesgos de contaminación y mejorar la producción de maíz.
- Purificar y caracterizar las distintas isoformas de las  $\beta$ -1,3 glucanasas que participan en la infección por parte de *F. verticillioides* e investigar el mecanismo por el cual la FB1 modula su actividad, así como evaluar su participación en eventos de respuesta de defensa posteriores.

## X. REFERENCIAS.

- Abbas HK, Tanata T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH, Riley RT 1994. Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol*, 196:1085-1093.
- Afolabi CG, Ojiambo PS, Ekpo EJA, Menkir A, Badyopadhyay R. 2008. Novel sources of resistance to *Fusarium* stalk rot of maize in Tropical Africa. *Plant Disease* 92:772-779.
- Alexander NJ, Proctor RH, McCormick SP. 2009. Genes, gene cluster, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* 28:198-215.
- Arias SL, Theumer MG, Mary VS, Rubinstein HR. 2012. Fumonisin: Probable Role as effectors in the complex interaction of Susceptible and resistant Maize Hybrids and *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* 60:5667-5675.
- Bacon CR, Bennet R, Hinton D Voss K. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Disease*. 76:144-18.
- Betanzos-Mendoza E. 2001. Variedades de maíz resistentes, una opción para reducir la pudrición de mazorca en Chiapas, México. *Agricultura Técnica en México*. 27:57-67.
- Bluhm BH, Kim H, Butchko RA, Woloshuk CP. 2008. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mol Plant Pathol*. 9:203-211.
- Bojja RS, Cerby RL, Proctor RH, Du L. 2004. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52:2855-2860.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brodhagen M & Keller NP. 2006. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol*. 7:285-301.
- Brown DW, Butckho RAE, Busman M, Proctor RH 2007. The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryot Cell*. 6:1210-1218.
- Campo S, Carrascal M, Coca M, Abian J, San Segundo B. 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics* 4:383-396.

- Casacuberta JM, Raventós D, Puigdoménech P, San Segundo B 1992. Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol Gen Genet*. 234:97-104.
- Cordero MJ, Raventós D, San Segundo B 1994. Differential Expression and Induction of Chitinases and  $\beta$ -1,3-Glucanases in Response to Fungal Infection During Germination of Maize Seeds. *Mol Plant-Microbe Interact* 7:23-31.
- Covarelli L, Stifano S, Beccari G, Raggi L, Lattanzio VMT, Albertini E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiology*. 31:17-24.
- Cultivo de Maíz Guía técnica No 33. CEDAF, Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC. República Dominicana 1998.
- Dall'Asta C, Falavigna C, Galaverna G, Battilani P. 2012. Role of maize hybrids and their Chemical Composition in *Fusarium* infection and Fumonisin production. *J Agric Food Chem*. 60:3800-3808.
- de la Torre-Hernandez ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernandez N, Cruz-Ortega R, Plasencia J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and SA accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiological and Mol. Plant Pathol*. 74:337-345.
- Desjardins AE & Munkvold GP. 1997. Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease*. 81:556-563.
- Desjardins AE & Plattner RD. 2000. Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J. Agric Food Chem*. 48:5773-5780.
- Desjardins AE 2006 *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics and biology, American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Desjardins AE, Plattner RD, Stessman RJ, McCormick SP, Millard MJ. 2005. Identification and heritability of fumonisin insensitivity in *Zea mays*. *Phytochemistry* 66:2474-2480.
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelson PE. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. 1994. *Appl. Environ. Microbiol*. 60:1695-1697.
- Desjardins AE, Proctor RH 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International J. Food Microbiol*. 119: 47-50.

- DGSV-CNRF. *Fusarium moniliforme*. Marchitez. Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas, SENASICA, SAGARPA 2011. Ficha Técnica: *Fusarium moniliforme* ARP-027.
- Doehlemann G & Hemetsberger C. 2013. Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 198:1001-1016.
- Dohelert DC, Knutson CA, Vesonder RF. 1994. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127:117-121.
- Edwards J. Maize growth & development. NSW Department of Primary Industries, Australia 2009.
- Fanelli F, Schmidt-Heydt M, Haidukowski M, Susca A, Geisen R, Logrieco A, Mule G. 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biol.* 116: 241-248.
- FAO: FOOD AND NUTRITION PAPER No 73. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Rome 2001.
- Gao X, Shim WB, Göbel C, Kunze S, Feussner I, Meeleer R, Balint-Kurti P, Kolomiets M. 2007. Disruption of a maize 9-lipoxygenase result in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. *Mol Plant Microbe Interact.* 20:922-933.
- Glazebrook J. 2005. Contrasting mechanism of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-227.
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AC, Williams LD, Riley RT, Proctor RH. 2008. Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:87-97.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez Nieto S, Plasencia J y Gavilanes-Ruíz M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 221:589-596.
- Huffman J, Gerber R y Du L. 2010. Recent Advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-Derived Mycotoxins. *Biopolymers* 93:764-776.
- Hung H & Holland JB. 2012. Diallel Analysis of resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *Crop Science.* 52:2173-2181.
- Internacional Agency for Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *IARC Monogr.* 82:301-366.

- Jackson L, DeVries JW y Bullerman LB. Fumonisin in Food. Advances in Experimental Medicine and Biology. Volume 392, USA 1996.
- Jiménez M, Mateo JJ, Hinojo MJ, Mateo R. 2003. Sugars and aminoacids as factors affecting the synthesis of fumonisin in liquid cultures isolates of the *Gibberella Fujikuroi* complex. Int. J. Food Microbiol. 89:185-193.
- Kasprzewska A. 2003. Plant Chitinases: regulation and function. Cell Mol Biol 8:809-824.
- Keller SE, Sullivan TM, Chirtel S 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of FB1: oxygen and pH. J Ind. Microbiol. Biotechnol. 19:305-309.
- Kim H & Woloshuk CP. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet. Biol. 45:947-953.
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ. 1994. Phytotoxicity of fumonisins and T-2 Toxin to corn and tomato. Phytopathology. 84:383-391.
- LedenčanT, Šimič D. Brkič I, Jambrovič A. Zdunič Z. 2003. Resistance of Maize Inbreds and their Hybrids to Fusarium Stalk Rot. Czech J. Genet. Plant. Breed. 39(1):15–20.
- Leslie JF (1996). Introductory biology of *Fusarium moliniforme*. Fumonisin in food. Plenum Press New York. pp 153-164.
- Leslie JF, Summerell BA 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First Edition. Blackwell Publishing. USA. 388 pp.
- Li M, Lu S, Ji C, Wang M, Wang Y, Cheg S, Tian G 1980. Experimental studies on the carcinogenicity of fungus-contaminated food from Linxian country. Tokyo, Japan: Japan Science Society Press.
- Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. Nature 464:367-373.
- Makaula NA, Marasas WFO, Venter Fs, Badenhorst CJ, Bradshaw D, Swanevelder S 1996. Esophageal and other cancer patterns in four selected districts of Transkei, southern Africa: 1985-1990. Afr. J. Health Sci. 3:11-15.
- Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA 1984. Toxigenic Fusarium species: Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State. University Press: University Park. PA.

- Marín S, Sanchis V, Ramos A 1999. Environmental factors, in vitro interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize. Mycol. Res. 102:831-837.
- Miedaner T, Bolduan C, Melchinger AE. 2010. Aggressiveness and mycotoxin production of eight isolates each of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* for ear rot on susceptible and resistant early maize inbred lines. Eur. J. Plant Pathol. 127:113-23.
- Misas-Villamil J, van der Hoorn R 2008. Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. Curr. Opin. Plant Biol. 11:380-388.
- Munkvold GP 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. European Journal of Plant Pathology 109:705-713.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, Biology and Clinical aspects of *Fusarium* species. Plant Pathology 7:479-501.
- Nelson PE, Plattner RD, Shackelford DD, Desjardins AE. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. Appl Environ. Microbiol. 57:2410-2412.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WOF 1983. *Fusarium* species, An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press: University Park. PA.
- Nonogaki Hiro 2008. Seed germination and reserve mobilization. In Encyclopedia of life sciences (ELS). John Wiley & Sons, Chichester.
- Oren L, Ezrati S, Cohen D, Sharon A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-Maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. Appl. Environ. Microbiol. 69:1695-1701.
- Pata MO, Hannun YA, Hg CK-Y. 2010. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. New Phytol. 185:611-630.
- Picot A, Atanasova-Pénichon V, Pons S, Marchegay G, Barreau C, Pinson-Gadais L, Roucolle J, Daveau F, Caron D, Richard-Forget F. 2013. J. Agric. Food Chem. 61:3389-3395.
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. Critical Rev. Microbiol. 36:221-231.
- Pieterse CMJ, León-Reyes A, van der Ent S & Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biol. 5:308-316.

- Ponts N, Pinson-Gadais L, Barreau C, Richard-Forget F, Ouellet T. 2007. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures from *Fusarium graminearum*. FEBS Lett, 581:443-447.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD. 1999. Biosynthetic and genetic relationships of B-series fumonisins produced by *Giberella fujikuroi*. Nat Toxins 7:251-258.
- Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busaman M, Butchko R 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. J Agric Food Chem. 54: 2424-2430.
- Reyes Castañeda Pedro. El maíz y su cultivo. AGT Editor, México, 1990.
- Ritchie W Steven, Benson Garren O & Lupkes Steven J. 1992. How a corn plant develops. Special report No. 48. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service.
- Sagaram US, Shaw BD, Shim WB. 2007. *Fusarium verticillioides* GAP1, a gene encoding a putative glycolipid-anchored surface protein, participates in conidiation and cell wall structure but not virulence. Microbiology. 153:2850-2861.
- Samapundo S, De Meulenaer B, De Muer N, Debere J, Devlieghere. 2006. Influence of experimental parameters of the fluorescence response and recovery of the high-performance liquid chromatography analysis of fumonisin B1. J. Crom. A. 1109:312-316.
- Samprieto DA, Vattuone MA, Presello DA, Fauguel CM, Catalán CAN. 2009. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. Crop Protection. 28:196-200.
- Sánchez Rangel D, Sánchez-Nieto S y Plasencia J. 2012. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize  $\beta$ -1,3-glucanase activities involved in defense response. Planta 235:965-978.
- Sánchez Rangel, Plasencia J. 2010. The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. Toxins Reviews 29(3-4):73:86.
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A & Plasencia J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and Development of a Polymerase Chain Reaction to detect potential toxigenic strains in grains. J. Agric. Food Chem. 53:8565-8571.
- Shim WB & Woloshuk CP. 2001. Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, FCC1. Appl. Environ. Microbiol. 67:1607-1612.

- Small IM, Flett BC, Marasas WFO, McLeod A, Stander MA, Viljoen A. 2012. Resistance in maize inbred lines to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in South Africa. *Plant Dis.* 96:881-888.
- Steve Butzen & Bill Dolezal. 2010. Managing Stalk Rots in Corn. *Crop Insights* 10 (19).Pioneer Hi-Bred Int'l.Inc., Johnston, IA.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev Phytopathol.* 44:135-162.
- Voss KA, Smith GW, Haschek WM. 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Sci. Technol.* 137:299-325.
- Williams LD, Glenn AE, Zimeri AM, Bacon CW, Smith MA, Riley RT. 2007. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. 55:2937-2946.
- Windels CE. 2000 Economic and Social impacts of Fusarium Head Blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90: 17-21.
- Wollenweber, HW y Reinking OA. "Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung". Paul Parey, Berlin. 1935.
- Xu JR, Yan K, Dickman B, Leslie JF. 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Giberrella fujikuroi* (*Fusarium* Section Liseola). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:74-84.

### Referencias electrónicas:

- <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm> agosto 2013.
- [http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/en/?dyna\\_fef\[uid\]=143943](http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/en/?dyna_fef[uid]=143943) agosto 2013.
- <http://www.fao.org/worldfoodsituation/nota-informativa-de-la-fao-sobre-la-oferta-y-la-demanda-de-cereales/es/> agosto 2013.

## XI.APÉNDICE.

### A. Preparación de soluciones y medios de cultivo.

Tabla I. Composición Final de medio GYAM.

| Compuesto                           | Concentración final del medio |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| I. Ácido málico                     | 50 mM                         |
| II. NaCl                            | 1.7 mM                        |
| III. MgSO <sub>4</sub>              | 2.0 mM                        |
| IV. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4.4 mM                        |
| V. CaCl <sub>2</sub>                | 8.8 mM                        |
| VI. Glucosa                         | 0.12 M                        |
| Extracto de Levadura                | 0.05 %                        |
| L-Asparagina                        | 8.0 mM                        |

#### A.1 Preparación de soluciones para la cuantificación de fumonisinas por HPLC.

##### Fase Móvil metanol-buffer de fosfatos 50mM (80:20).

Para preparar 500 mL se disuelven 6.9g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O en 1 litro de agua ajustando el pH a 3 con ácido fosfórico. Tomar 100 mL de esta solución y mezclarlos con 400 mL de Metanol grado HPLC.

##### Buffer de boratos 50 mM, pH 9.7.

Pesar 1.9g de tetraborato de sodio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-10H<sub>2</sub>O; P.M. 281.4 g/mol) y disolver en 89 mL de agua. Ajustar pH a 9.7 con NaOH 1M y aforar a 100 mL.

##### Solución Stock de OPA 7.45 mM (o-phtaldialdehido; SIGMA P-0657) P.M. 134.1 g/mol.

Se pesaron 2 mg de OPA y fueron disueltos en 400 µL de metanol grado HPLC. Se diluyeron con 2 mL de amortiguador de boratos 50 mM, pH 9.7, se añadieron 3 µL de β-mercaptoetanol y se mezclaron bien. Se almacena a 4°C y solamente se utiliza fresca el día de la cuantificación.

**Tabla II. Preparación de la reacción de FB1 con OPA y concentración final de las mismas.**

| Muestra                   | Muestra ( $\mu\text{L}$ )     | OPA ( $\mu\text{L}$ ) | ACN-H <sub>2</sub> O (1:1) (mL) | fmoles en 20 $\mu\text{L}$ |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Blanco                    | 10 ACN-H <sub>2</sub> O (1:1) | 25                    | 465                             | 0                          |
| FB1 (6.25 $\mu\text{M}$ ) | 10                            | 25                    | 465                             | 12.5                       |
| FB1 (12.5 $\mu\text{M}$ ) | 10                            | 25                    | 465                             | 25                         |
| FB1 (25 $\mu\text{M}$ )   | 10                            | 25                    | 465                             | 50                         |
| FB1 (50 $\mu\text{M}$ )   | 10                            | 25                    | 465                             | 100                        |
| FB1 (75 $\mu\text{M}$ )   | 10                            | 25                    | 465                             | 150                        |
| FB1 (100 $\mu\text{M}$ )  | 10                            | 25                    | 465                             | 200                        |
| FB1 (150 $\mu\text{M}$ )  | 10                            | 25                    | 465                             | 300                        |

**Tabla III. Componentes del buffer de extracción de proteínas.**

| Reactivo                   | Concentración final |
|----------------------------|---------------------|
| Acetato de Sodio           | 0.05 M              |
| Sacarosa                   | 250 mM              |
| $\beta$ -mercaptoetanol    | 5 mM                |
| EDTA                       | 10 mM               |
| Polivinilpirrolidona (PVP) | 1%                  |
| Glicerol                   | 10%                 |

**Tabla IV. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.**

| Muestra  | BSA Proteína (µg) | <sup>1</sup> Vol.BSA (3 µg/µL) | H <sub>2</sub> O (µL) | Reactivo de Bradford (µL) | Amortiguador de extracción              |
|----------|-------------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|---|
| Blanco 1 | -                 | -                              | 1000                  | -                         |   |
| Blanco 2 | -                 | -                              | 800                   | 200                       | -                                       |
| Blanco 3 | -                 | -                              | Ajustar               | 200                       | Depende (casi siempre son Entre 1-2 µL) |
| 1        | 3                 | 1                              | 799                   | 200                       | -                                       |
| 2        | 6                 | 2                              | 798                   | 200                       | -                                       |
| 3        | 9                 | 3                              | 797                   | 200                       | -                                       |
| 4        | 12                | 4                              | 796                   | 200                       | -                                       |
| 5        | 15                | 5                              | 795                   | 200                       | -                                       |
| 6        | 18                | 6                              | 794                   | 200                       | -                                       |
| 7        | 21                | 7                              | 793                   | 200                       | -                                       |
| 8        | 24                | 8                              | 792                   | 200                       | -                                       |
| Muestra  | 1-2 µL            | -                              | Ajustar               | 200                       | -                                       |

<sup>1</sup>Solución de BSA (3 µg/mL)

La absorbancia de las muestras se lee a  $\lambda=595$  nm en celdas de plástico

**A.2 Preparación de soluciones para la determinación de la actividad de las  $\beta$ -1,3 glucanasas de maíz en gel.**

**Solución de Acrilamida (30%acrilamida,0.8%bis-acrilamida).**

Para preparar 100 mL, pesar 30 g de acrilamida y 0.8 g de bis-acrilamida. Mezclar y almacenar se almacenó en refrigeración a 4°C. **Nota:** siempre usar guantes y cubrebocas para preparar la solución pues la acrilamida es irritante y neurotóxica.

**Buffer para el gel separador y gel concentrador.**

Pesar 48.5 g Tris y disolverlo en 200 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl.

**Persulfato de amonio 10%.** Pesar 100 mg y disolver en 1 mL de agua desionizada.

**Buffer de corrida Tris (25 mM)- glicina (192 mM).**

Para preparar un litro, pesar 3 g Tris y 14.4 g de glicina. Almacenar a 4°C.

### Solución de acetato de potasio 0.05M pH=5.

Pesaron 0.41 g de acetato de potasio y disolver en 100 mL de agua desionizada. Ajustar el pH en el potenciómetro.

### Solución de fosfato de potasio dibásico 50 mM pH=7.0

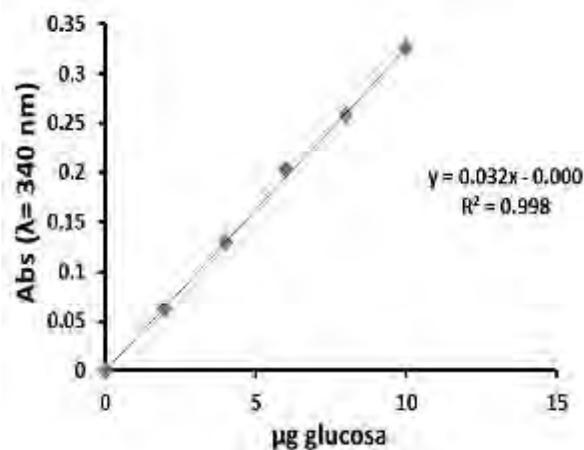
Pesar 1.74 g de la sal de potasio y disolver en 200 mL de agua desionizada. Ajustar el pH.

**Buffer de muestra. SDS-PAGE:** Tomar 0.5 mL de Tris-HCl 0.5M pH=6, adicionar 0.8 mL de SDS 10 %, 1 mL de glicerol, 0.4 mL de azul de bromofenol, 0.2 mL de 2-mercaptoetanol y 5.1 mL de agua desionizada. **Native-PAGE:** Tomar 0.5 mL de Tris-HCl 0.5M pH=6. agregar 1.1 mL de glicerol, 0.4 mL de azul de bromofenol y 6 mL de agua desionizada.

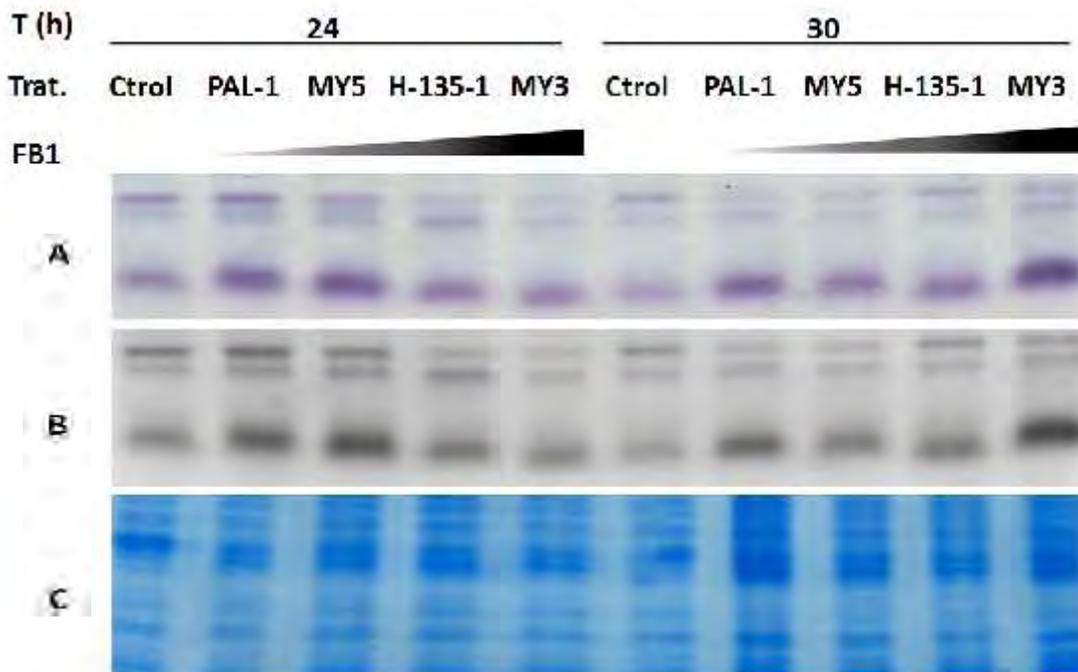
**Tabla V. Preparación de los geles separador y concentrador para los geles nativos de actividad.**

| Reactivo Stock                    | Gel Separador volumen | Gel Concentrador volumen |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8 % | 2 mL                  | 0.265 mL                 |
| Trizma base 2 M pH= 8.8           | 1.25 mL               | 0.5 mL                   |
| Glicerol                          | 1 mL                  | 0.2 mL                   |
| H <sub>2</sub> O                  | 750 µL                | 1.035 mL                 |
| TEMED                             | 5 µL                  | 2 µL                     |
| Persulfato de amonio 10%          | 50 µL                 | 20 µL                    |

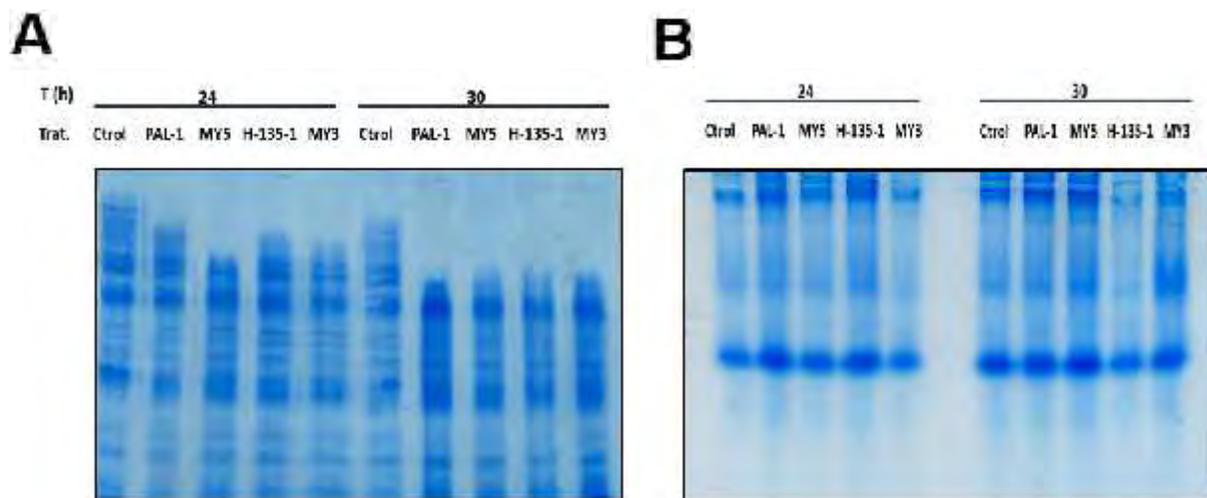
### **B. Réplicas y complementos de experimentos realizados.**



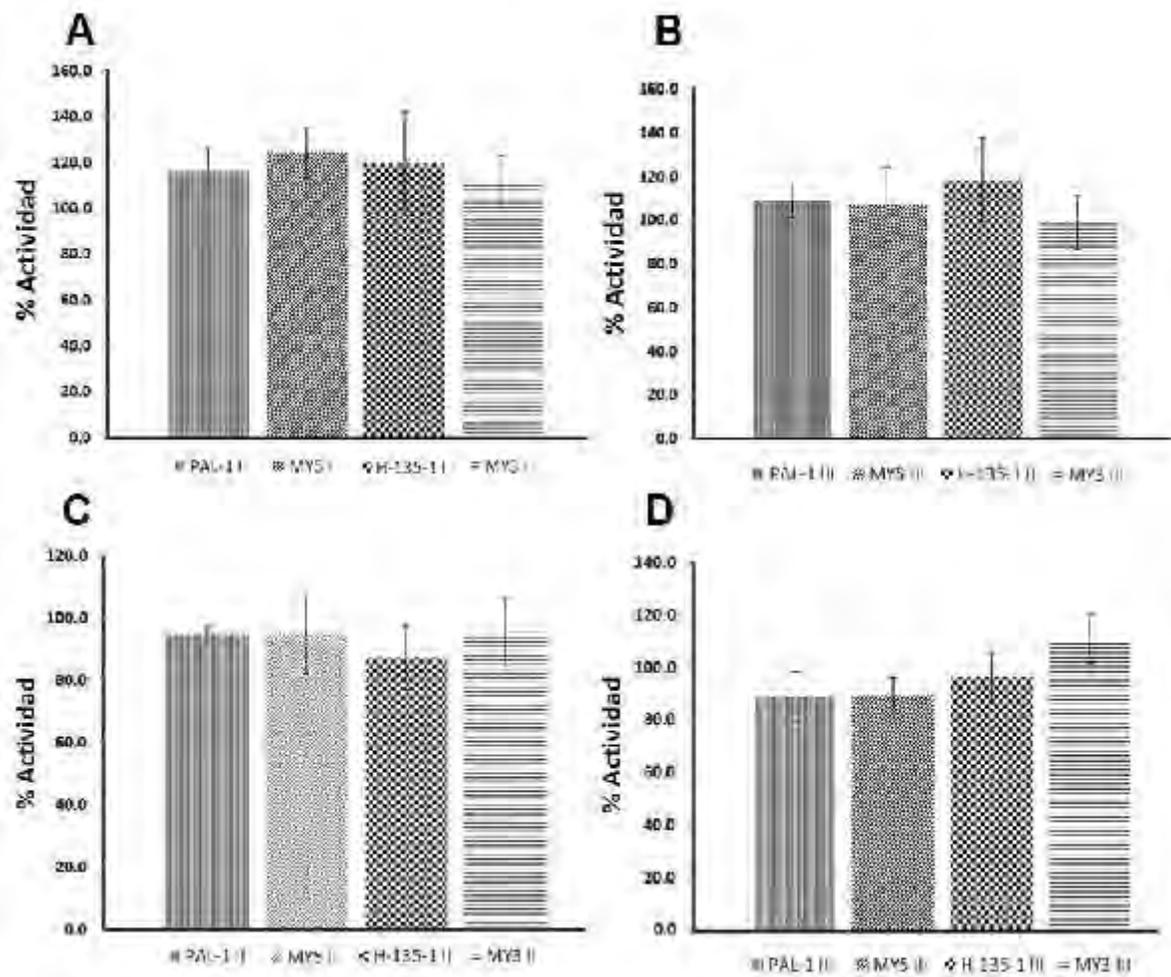
**Figura I. Curva Patrón de glucosa utilizada para la cuantificación de la actividad total de las β-1,3-glucanasas de maíz tras la infección de *F. verticillioides*.**



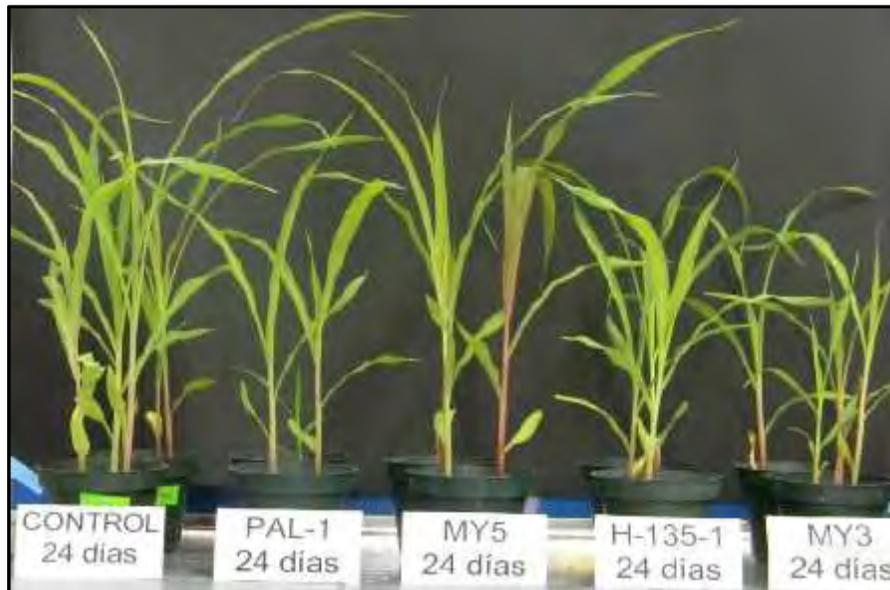
**Figura II. Actividad de las diferentes isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas de maíz en gel resuelto en condiciones nativas.** Cada carril corresponde a cada una de las cepas utilizadas a las 24 horas y 30 horas. **A.** Gel escaneado a color. **B.** Gel escaneado en Chemidoc. **C.** Control de carga SDS-PAGE. Se cargaron 170  $\mu$ g de proteína.



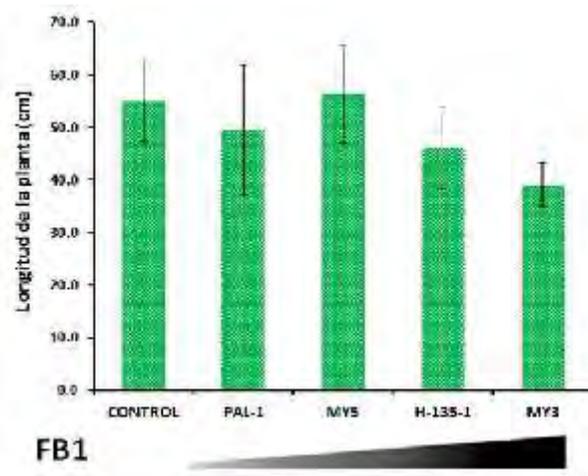
**Figura III. Patrón de proteínas de embriones de maíz teñidos con azul de Coomassie SDS-PAGE y B. Gel corrido en condiciones nativas.** Se cargaron 15  $\mu$ g de proteína.



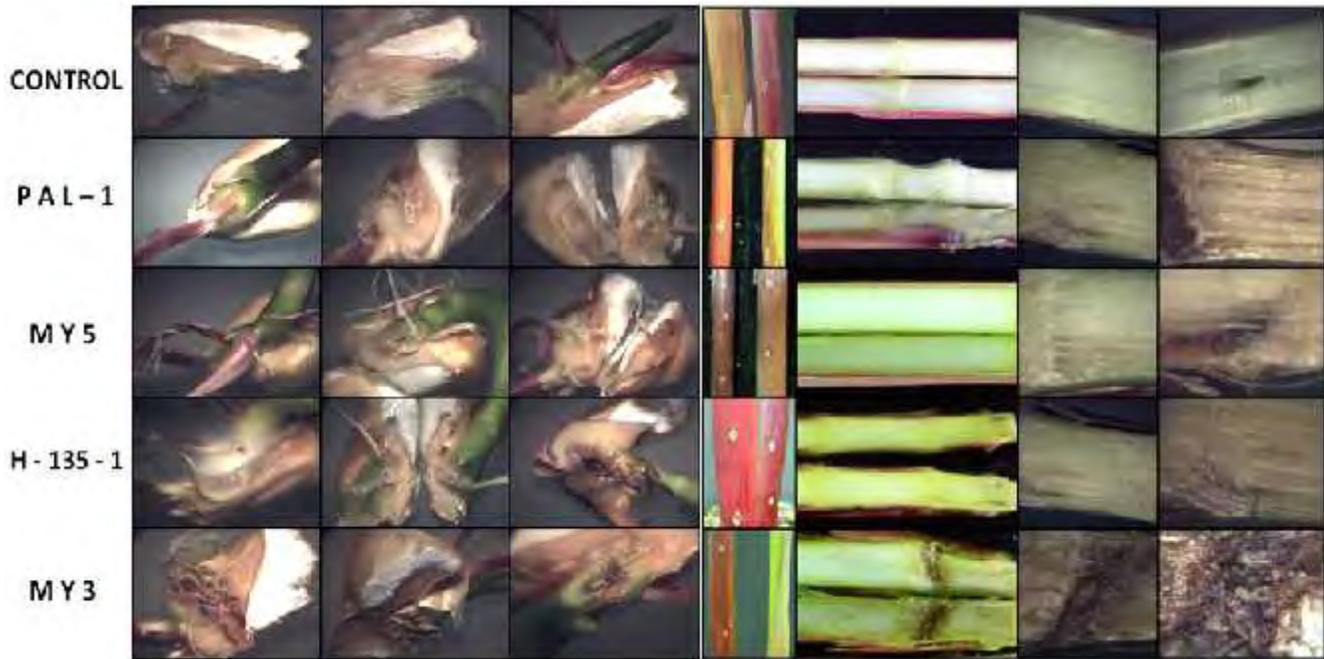
**Figura IV. Actividad de las distintas isoformas de las  $\beta$ -1,3 glucanasas de maíz en gel por las distintas cepas de *F. verticillioides*. Actividad de: A. Isoforma básica II tras 24 hpi. B. Isoforma ácida I tras 24 hpi. C. Isoforma básica III tras 30 hpi. D. Isoforma básica II tras 30 hpi. Los resultados de estas isoformas son discretos o no significativos.**



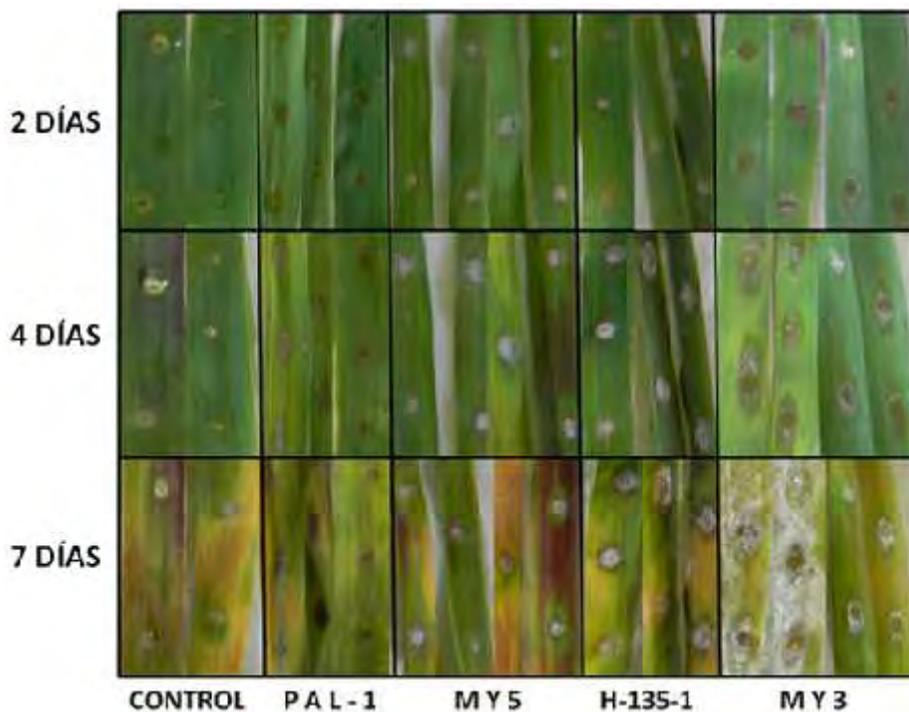
**Figura V.** Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz “Chalqueño” tras 24 días post-plantadas. Las semillas fueron embebidas en suspensión de 50,000 conidias/mL durante la germinación con cada una de las cuatro cepas de *F. verticillioides*. Se observa un decremento en el crecimiento de plántulas infectadas con las cepas PAL-1, H-135-1 y en mayor medida MY3.



**Figura VI.** Efecto en el crecimiento de plántulas de maíz tras 24 días post-plantadas. Se observa una clara disminución de la elongación de las plántulas infectadas con las cepas PAL-1, H-135-1 y MY3. Esta última cepa muestra el mayor efecto en el decremento.



**Figura VII. Lesiones causadas en maíz con la inoculación de 50 000 conidias en el sitio de punción en A. Semillas germinadas.** Se observa un mayor daño producido por la cepa H-135-1 y MY3. **B. Tallos de 6 semanas.** Se observan lesiones en los tallos, el de mayor severidad se observa en el tallo infectado con la cepa MY3. Se utilizó el híbrido ZR-76.



**Figura VIII. Lesiones provocadas por las 4 cepas de *F. verticillioides* en hojas de maíz.** Las hojas de 4 semanas fueron heridas por punción e inoculadas con 50,000 conidias. Se muestran los síntomas a los 2, 4 y 7 días post-infección. La cepa MY3 muestra el mayor avance de lesión respecto a las demás cepas y un mayor desarrollo de micelio a los 7 días.