



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de fumonisina
B1 y la expresión de los genes del locus *FUM* de *Fusarium
verticillioides***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ FRACA



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: Ruth Edith Martín Fuentes
- VOCAL:** Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra
- SECRETARIO:** Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
- 1ER SUPLENTE:** Profesor: Francisco Antonio Aguilar Alonso
- 2DO SUPLENTE:** Profesora: Sara Margarita Garza Aguilar

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y bajo la supervisión técnica de la M. en C. María Manuela Nájera Martínez.

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
AESOR

M. en C. María Manuela Nájera Martínez
SUPERVISOR TÉCNICO

Francisco Javier Martínez Fraca
SUSTENTANTE

ABREVIATURAS

ACN= Acetonitrilo

AF= Ácido ferúlico

BCL= Bases esfingoideas de cadena larga

cm= Centímetro

DEPC= Dietil pirocarbonato

FB1= Fumonisina B1

F.D.= Factor de dilución

Fr: Oligonucleótido forward

GYAM= Glucosa Extracto de levadura
Asparagina Ácido málico

HPLC= Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

kpb= Kilopares de bases

mg= Miligramo

mm= milímetro

mM= milimolar

OPA= o-phthaldialdehido

PDA= Agar Papa Dextrosa

PKS= Policétido sintasa

pg= Picogramo

RNA= Ácido Ribonucleico

ROS= Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR= Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa.

rpm= Revoluciones por minuto

Rv: Oligonucleótido reverse

SDS= Duodecil sulfato de sodio

TAE= Tris-ácido acético-EDTA

vol= Volumen

µg= Microgramo

µL= Microlitro

µM= Micromolar

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. <i>Fusarium verticillioides</i> como patógeno del maíz	2
1.1 Generalidades	2
1.2 Taxonomía de <i>Fusarium verticillioides</i>	3
1.3 Morfología de <i>Fusarium verticillioides</i>	3
1.4 Producción de micotoxinas	7
2. Fumonisina B1	9
2.1 Generalidades	9
2.2 Estructura	10
2.3 Blancos moleculares de la FB1 en maíz	10
2.3.1 Efecto sobre la N-acetiltransferasa en el metabolismo de esfingolípidos	11
2.3.2 Inhibición de la ATPasa de protones	13
2.3.3 Efecto sobre la actividad de las β -(1-3) glucanasas	13
2.4 Biosíntesis de Fumonisininas	15
2.5 Factores que afectan la biosíntesis de fumonisininas	17
2.5.1 Temperatura y actividad del agua	18
2.5.2 pH y nutrición	18
2.5.3 Regulación de la biosíntesis de fumonisininas	19
2.5.4 Defensas naturales de la planta	22
3. Ácidos fenólicos	24
3.1 Generalidades	24
3.1.1 Biosíntesis en plantas	26
3.1.2 Efecto de los ácidos fenólicos sobre la producción de fumonisininas	27
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS GENERAL Y PARTÍCULAR	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Efecto del ácido ferúlico sobre el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>	30
Preparación del medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa)	30
Inóculo y conteo de conidias	30
Inoculación y suplementación del medio PDA	31
2. Efecto del ácido ferúlico en la producción de FB1	32
Preparación de medio de cultivo GYAM	32
Inoculación de <i>F. verticillioides</i> en medio GYAM	33
Cosecha de FB1 a partir de medio GYAM	33
Cuantificación de FB1 en medio GYAM mediante HPLC	34
Preparación de curva patrón y muestras para el análisis por HPLC	35
Condiciones de análisis	35
3. Efecto del ácido ferúlico en los niveles de los transcritos de <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	36
Preparación del micelio	36
Extracción de RNA total	36
Análisis electroforético del RNA total	38
Calibración por densitometría	38

4.	Reacción RT-PCR	38
	Síntesis de cDNA	38
	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
	Análisis indirecto de los amplicones de cDNA de RT-PCR	41
	Análisis estadístico	42
VI.	RESULTADOS	43
1.	Efecto del ácido ferúlico sobre el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>	43
2.	Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 de <i>F. verticillioides</i>	46
3.	Efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> de la biosíntesis de FB1.	49
	Extracción de RNA total de micelio de <i>F. verticillioides</i> .	49
	Evaluación de los transcritos de <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	50
VII.	DISCUSIÓN	53
VIII.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	57
X.	REFERENCIAS	59
X.	APÉNDICE	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Características de la forma teleomorfa de <i>Gibberella fujikuroi</i> .	4
Figura 2. Características macroscópicas de <i>F. verticillioides</i>	5
Figura 3. Características microscópicas de <i>F. verticillioides</i>	6
Figura 4. Morfología de esporodoquios y clamidosporas de <i>Fusarium sp.</i>	6
Figura 5. Estructura de micotoxinas producidas por <i>Fusarium spp</i>	9
Figura 6. Estructura química de las fumonisinas del grupo B	10
Figura 7. Biosíntesis de esfingolípidos	12
Figura 8. Blancos moleculares de la FB1: la ATPasa de H ⁺ , la esfinganina N-aciltransferasa y las β -(1,3)-glucanasas básicas	14
Figura 9. Estructura del locus <i>FUM</i>	15
Figura 10. Esquema de la ruta sintética de fumonisina B1 en <i>F. verticillioides</i>	17
Figura 11. Estructura del grano de maíz	22
Figura 12. Estructura de los compuestos fenólicos presentes en plantas representativas de cada grupo de acuerdo a su clasificación	25
Figura 13. Esquema de los derivados fenólicos de la fenilalanina	27
Figura 14. Cámara de Neubauer	31
Figura 15. Mecanismo de reacción para la formación del complejo Fumonisina-OPA	34
Figura 16. Altas concentraciones de ácido ferúlico inhiben el crecimiento radial significativamente	43
Figura 17. Placas de medio PDA inoculadas con <i>F. verticillioides</i>	44
Figura 18. El efecto inhibitorio fue menor al disminuir las concentraciones de ácido ferúlico	45
Figura 19. No hay diferencia significativa en el diámetro de cada tratamiento al final del periodo de incubación	46
Figura 20. <i>F. verticillioides</i> en medio GYAM incubado por 7 días	47
Figura 21. El ácido ferúlico no afecta el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en el medio GYAM	47
Figura 22. Análisis de la Integridad del RNA total aislado de micelio de <i>F. verticillioides</i> incubado con los distintos tratamientos	50
Figura 23. Niveles de transcrito de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	51
Figura 24. Análisis indirecto densitométrico de los niveles de transcritos <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> en <i>F. verticillioides</i> y el efecto del AF	52
Figura 25. Análisis de la integridad de RNA total de micelio de <i>F. verticillioides</i> Incubado 14 días	70
Figura 26. Análisis de la integridad del RNA total aislado de micelio de <i>F. verticillioides</i> incubado 7 días con los distintos tratamientos	70
Figura 27. Electroforesis de los productos de RT-PCR a partir de cDNA de <i>F. verticillioides</i> .	71
Figura 28. Productos de amplificación por PCR de genes de β -tubulina y <i>FUM8</i> a partir de DNA genómico.	71
Figura 29. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de β -tubulina. La parte lineal se encuentra entre los 26 y 28 ciclos	72
Figura 30. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de <i>FUM1</i> . La parte lineal se encuentra entre los 34 y 36 ciclos	72
Figura 31. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de <i>FUM8</i> . La parte lineal se encuentra entre los 26 y 28 ciclos	73

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Productos de los genes contenidos en el locus <i>FUM</i>	15
Tabla 2. Genes asociados a la regulación de la biosíntesis de FB1 en <i>F. verticillioides</i> .	21
Tabla 3. Composición química de las fracciones del grano de maíz.	23
Tabla 4. Niveles de ácidos fenólicos y flavonoides en las fracciones del grano de maíz dentado y duro.	24
Tabla 5. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento y la producción de fumonisina B1.	28
Tabla 6. Composición final del medio GYAM.	33
Tabla 7. Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu (RF-10AXL).	36
Tabla 8. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT).	39
Tabla 9. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	40
Tabla 10. Secuencia y tamaño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes del locus <i>FUM</i> y del gen de tubulina.	41
Tabla 11. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados	41
Tabla 12. Efecto del AF sobre la producción de FB1 en <i>F. verticillioides</i> .	49
Tabla 13. Composición de sales en Stock y en medio GYAM.	67
Tabla 14. Preparación de los estándares de FB1 para curva de calibración.	69

I. RESUMEN

Fusarium verticillioides es uno de los patógenos más importantes en semillas de maíz. Es un hongo patógeno necrótrofo y saprófito, por lo que es capaz de causar la muerte del tejido del hospedero y sobrevivir en el rastrojo. La mayoría de las cepas de *F. verticillioides* producen fumonisina B1 (FB1) que es una micotoxina que contribuye a la virulencia, además de afectar la calidad del grano. La capacidad de sintetizar fumonisinas depende de la presencia de una serie de genes, agrupados en una región de 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y que forman el locus *FUM*. La biosíntesis de FB1 depende de la integridad del locus *FUM*, así como de factores ambientales y nutricionales, como es la composición del sustrato del tejido vegetal. Uno de los componentes más abundantes del pericarpio de las semillas de maíz es el ácido ferúlico (AF), proveniente del metabolismo de los fenilpropanoides. Esta molécula tiene actividad antioxidante y antimicótica, sin embargo, se desconoce el mecanismo que opera en la inhibición de la síntesis de micotoxinas. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar el efecto del ácido ferúlico en una cepa de *F. verticillioides* (MY3) sobre la biosíntesis de FB1 y la expresión de genes del locus *FUM*. Se establecieron las concentraciones de AF (0.05 mM y 0.1 mM) que no inhibieran el crecimiento del hongo. La concentración de 0.05 mM inhibió la producción de FB1 en 45% mientras que la concentración de 0.1 mM redujo la producción de FB1 a niveles menores del límite de detección del método. Asimismo, se encontró que los niveles de los transcritos de *FUM1* y *FUM8* disminuyeron en presencia de AF a los cinco días de cultivo. En este trabajo se establecieron las bases para el estudio *in vitro* de los efectos del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM* y la biosíntesis de fumonisina B1, lo que facilitará los estudios *in planta*, así como investigar el mecanismo de acción de este compuesto sobre la biosíntesis de fumonisina.

II. INTRODUCCIÓN

1. *Fusarium verticillioides* como patógeno del maíz

1.1 Generalidades

Varias especies del género *Fusarium* causan enfermedades en maíz, trigo, cebada y otros cereales (Placinta et al. 1999). Estos hongos pueden infectar durante el desarrollo de la planta en el campo y/o durante el almacenamiento. Las condiciones climáticas y el manejo de la cosecha pueden facilitar la infección por *Fusarium* spp y su propagación. En los granos almacenados bajo condiciones inadecuadas de humedad y temperatura, los hongos contaminantes son capaces de crecer y de presentar una respiración aeróbica. Durante su crecimiento sobre grano, degradan el almidón y la glucosa que se produce es oxidada aeróbicamente. Este proceso metabólico provoca el calentamiento del sustrato y pérdida de materia seca. Durante su crecimiento, el hongo utiliza carbohidratos como fuente de energía y degrada lípidos y proteínas. Además, producen micotoxinas como metabolitos secundarios que reducen la calidad de los granos. Esta disminución en la calidad y el valor de los granos ocasionan importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Magan y Aldred 2007; Jouany 2007).

En maíz, el principal patógeno de este género es *F. verticillioides*, y es causante de infecciones en campo durante todas las etapas de desarrollo de la planta. Es capaz de infectar raíces, tallos y semillas (Bacon et al. 1992; Munkvold et al. 1997). Es un hongo necrótrofo pues causa daño en el tejido del hospedero, y también está adaptado como saprófito, capaz de crecer en el tejido marchito (Leslie et al. 1996; Shim et al. 1999). Además, la presencia y consumo de granos infectados con *F. verticillioides* causa leucoencefalomacia en equinos (Franelli et al. 2011), edema pulmonar en cerdos (Harrison et al. 1990), y se ha asociado con cáncer en hígado de rata (Howard et al. 2001) y cáncer en esófago de humanos (Sydenham et al. 1990).

1.2 Taxonomía de *Fusarium verticillioides*

Fusarium es la forma anamórfica de *Gibberella fujikuroi* perteneciente al grupo de los ascomicetos del orden Hypocreales (clase Sordariomycetes) que agrupa a un gran número de especies (Balajee et al. 2009). La taxonomía del género es compleja y sujeta a debate entre distintos autores, sin embargo, todos los sistemas taxonómicos desarrollados hasta el momento se basan en un trabajo de Wollenweber y Reinking publicado en 1935. En este sistema, el género está organizado en 16 secciones, que incluyen 65 especies, 55 variedades y 22 formas.

La identificación se basa en criterios morfológicos como la forma de reproducción sexual (ascosporas) y la forma asexual (microconidias, macroconidias y conidióforos), así como la presencia de clamidoesporas y/o la forma perfecta del hongo. Asimismo, se han empleado las secuencias de varios genes (β -tubulina, histona, EF1- α) para la asignación de las especies (Nelson et al. 1994; O'Donnell et al. 2010).

1.3 Morfología de *Fusarium verticillioides*

La forma teleomorfa, *Gibberella fujikuroi*, se encuentra normalmente sobre el tejido vegetal seco, como son rastrojo de hojas y tallos de maíz. Se caracteriza por la formación de ascas de colores generalmente oscuros cuando alcanzan la madurez. Dentro de las ascas se encuentran los esporangios, estructuras donde en su interior se forman se desarrollan las ascosporas las cuales son hialinas y ligeramente curvas con extremos redondeados (Deacon, 1997) (Fig. 1; Hanlin, 1990).

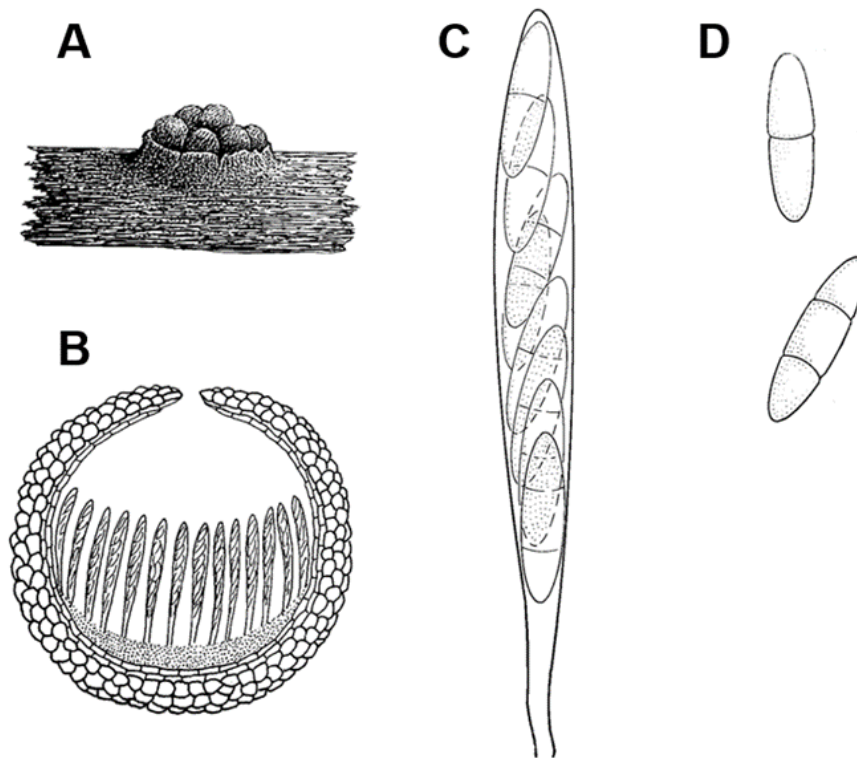


Figura 1. Características de la forma teleomorfa de *Gibberella fujikuroi*. **A.** Cúmulo de peritecios sobre el tejido vegetal. **B.** Corte transversal de un peritecio que muestra en su interior los sacos de esporangios. **C.** Estructura de un esporangio donde se desarrollan las ascosporas. **D.** Estructura de las esporas sexuales, son de forma oval y septadas (Tomado y modificado de Hanlin, 1990).

Los cultivos de *F. verticillioides* generalmente presentan micelio blanco pero su pigmentación varía de acuerdo al medio de cultivo donde se incubó, que van desde la ausencia de la ausencia de pigmento, a naranja grisáceo y gris violeta. Por ejemplo en medio PDA (Agar Papa Dextrosa) presenta un micelio aéreo blanco, mientras que el vegetativo es púrpura (Fig. 2; Nelson et al. 1983). Para la identificación de especies, se emplea el medio CLA (Carnation Leaf Agar o Agar hoja de Clavel), que es un medio diferencial pues promueve la formación de conidióforos y de conidias, lo que permite la identificación de especies por la morfología de estas estructuras, en las que se basa el manual de este género (Nelson et al., 1983). Para la preparación de este medio se emplean las hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) que son cortadas en piezas de aproximadamente 5 mm² de diámetro, se secan por 2 h a 45-55°C y luego son esterilizadas con 2.5 megarads de radiación gamma. Los fragmentos de hoja se

colocan en una placa de agar (1.5%) que se inocula con el cultivo de *Fusarium sp.* a identificar (Nelson et al, 1983). Además de la producción de conidios, este medio también induce la generación de peritecios. Las estructuras se pueden observar directamente bajo el microscopio o mediante una preparación teñida con tinción de azul de lactofenol.

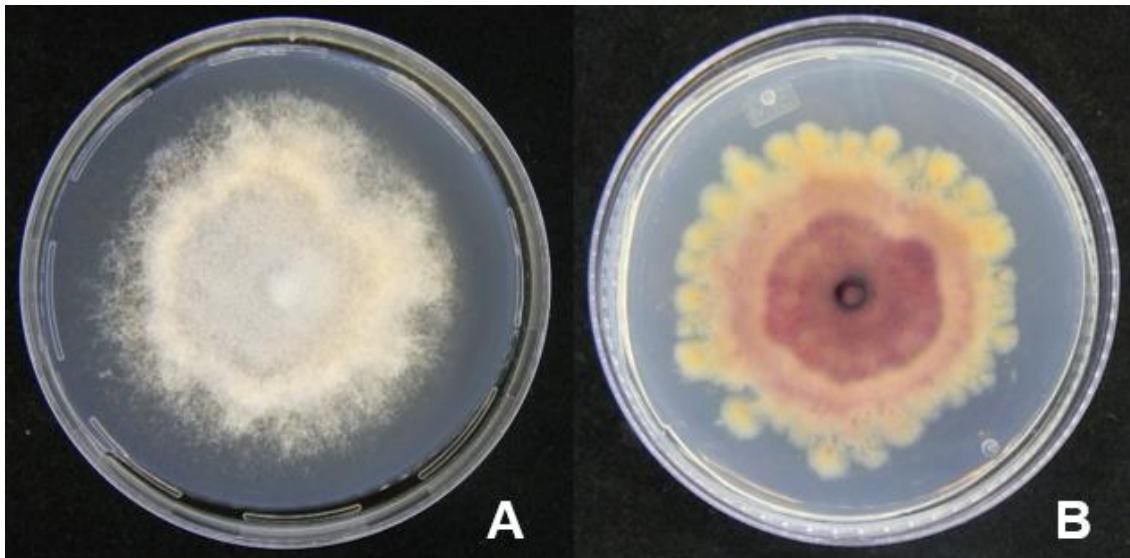


Figura 2. Características macroscópicas de *F. verticillioides*. A. Micelio aéreo (anverso de la caja) *in situ* en medio PDA. B. Micelio vegetativo (reverso de la caja) *in situ* en medio PDA.

Microscópicamente, *F. verticillioides* presenta una forma de reproducción asexual a base de macroconidios y microconidios. Los macroconidios son largos y delgados, ligeramente encorvados o rectos y de paredes delgadas (Figura 3 A-B) (Leslie et al. 2006), mientras que los microconidios son de forma oval con una base aplanada (Figura 3 C-D). Además, presenta un micelio aéreo conformado de cadenas largas con pequeños agregados de unas pocas conidias (Figura 3 E-F). No presenta clamidoconidios, a diferencia de otras especies como *F. oxysporum* o *F. solani*.

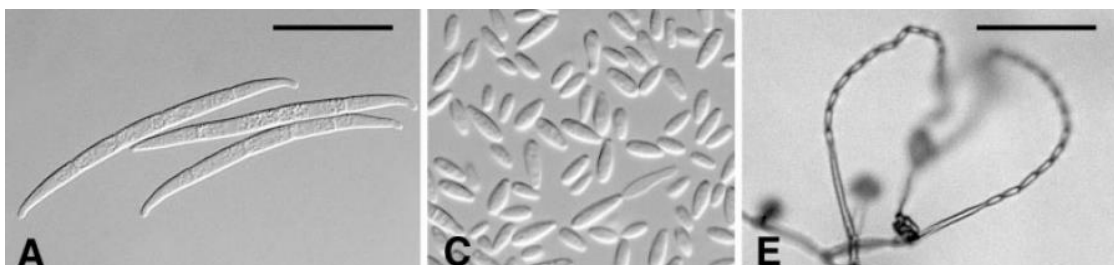


Figura 3. Características microscópicas de *F. verticillioides*. A-B. Morfología de macroconidios, C-D. Morfología de microconidios. Escala de la barra: 25 μ m. E-F. Microconidios agrupados en cadenas in situ en medio CLA. Escala de la barra: 50 μ m (Tomado de Leslie et al. 2006).

F. verticillioides pueden formar esporodoquios que son estromas pequeños con forma de almohadilla la cual contiene los conidióforos los cuales se pueden observar fácilmente en medio CLA. A menudo presentan un color castaño claro o azul, además puede presentar la formación de esclerocios, agregados abundantes y compactos de hifas ocasionalmente de color oscuro (Leslie et al. 2006).

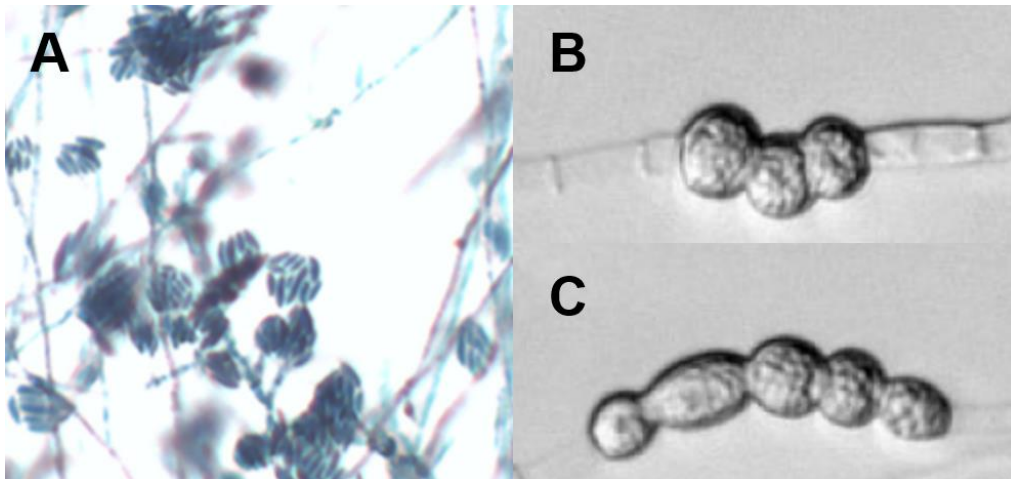


Figura 4. Morfología de esporodoquios y clamidosporas de *Fusarium* sp. A. Conjunto de esporodoquios de *Fusarium verticillioides*, se observan que forman agregados en forma de almohadilla (tomado y modificado de de la Torre-Hernández et al. 2014). B-C. Clamidoconidias formadas en las hifas de *Fusarium solani* (tomado y modificado de Leslie et. al. 2006).

La pigmentación del micelio depende del medio de cultivo donde crece, generalmente es de color púrpura en medio PDA aunque en ocasiones puede carecer de pigmentación (Nelson et al. 1982). En el medio KCl, el cual impone un estrés osmótico, se estimula el alargamiento de las cadenas de microconidios, por lo que se facilita su observación. (Nelson et al. 1994).

El Broad Institute/MIT Center for Genome Research completó la secuencia del genoma de *F. verticillioides* el cual tiene un tamaño aproximado de 42 Mpb contenidas en 12 cromosomas, y en la que se predicen 14,179 genes (Ma et al. 2010).

1.4 Producción de micotoxinas

Las cepas de *F. verticillioides* producen varias micotoxinas que causan brotes de enfermedades en animales y humanos cuando consumen grano contaminado con éstas. Las principales micotoxinas son los tricotecenos, las zearalenonas, la moniliformina, las fusarinas, el ácido fusárico y las fumonisinas (Desjardins et al. 2007; Nelson et al. 1992).

Tricotecenos.

Los tricotecenos (Figura 5-A) son sesquiterpenos tricíclicos con un doble enlace en el carbono 9 y 10 y un anillo epóxido en los carbonos 12 y 13. Los tricotecenos comprenden una familia de compuestos en la que los más representativos son el diacetoxiscirpenol (DAS), la toxina T2, el nivalenol y el deoxinivalenol. El consumo de estas micotoxinas se ha asociado con intoxicaciones crónicas y mortales para los humanos y animales. Su principal mecanismo de toxicidad es la inhibición de la síntesis de proteínas (Desjardins et al. 2007).

Zearalenonas

Se trata de una lactona del ácido resorcílico cuya estructura es (3S,11E)-14,16-dihidroxi-3-metil-3,4,5,6,9,10-hexahidro-1H-2-benzoxacicotetradecien-1,7(8H) diona (Figura 5-B). Estas micotoxinas pueden causar una micotoxicosis aguda no mortal para los animales ni humanos. Tienen efectos estrogénicos pues su estructura química mimetiza a la de las hormonas esteroideas (Desjardins et al. 2007).

Moniliforminas

Esta micotoxina (Figura 5-C) se presenta en una forma de 1-hidroxiciclobut-1-eno-3,4-diona producida por diversas especies de *Fusarium* cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la enzima piruvato deshidrogenasa. Esta actividad se refleja en fallas cardíacas en animales (Edwards et al. 2002).

Fumonisinias

Las fumonisinias (Figura 5-D) son las micotoxinas más abundantes de incidencia natural producidas por *F. verticillioides*, entre ellas las preponderantes son del grupo B. Éstas contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificados en C-14 y C-15 (de la Torre-Hernández et al. 2014). Su modo de acción principal es la inhibición del metabolismo de esfingolípidos, tanto en células animales como de plantas (Desjardins et al. 2007).

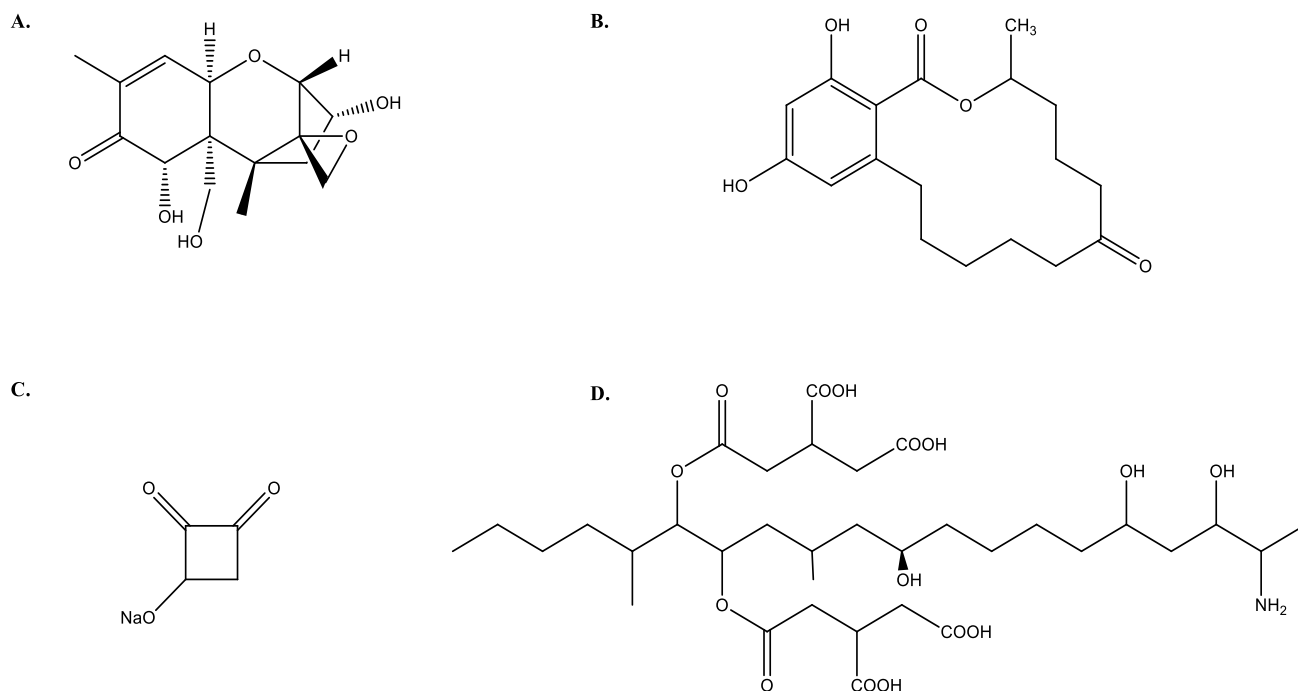


Figura 5. Estructura de micotoxinas producidas por *Fusarium spp.* A. Tricoteceno. B. Zearalenona. C. Moniliformina. D. Fumonisin B1.

2. Fumonisin B1

2.1 Generalidades

Las fumonisinas conforman un grupo amplio de más de 60 moléculas y compuestos análogos de las cuales 28 han sido clasificados en cuatro grupos principales: A, B, C y D, siendo del grupo B son los más abundantes. Dentro de este grupo, la FB1, FB2 y FB3 predominan y la FB1 representa cerca del 70-80% del total de fumonisina producida mientras que la FB2 representa del 15 al 25% y la FB3 del 3 al 8% (Rheeder et al. 2002; Sánchez-Rangel et al. 2005).

2.2 Estructura

Las fumonisinas del grupo B tienen un esqueleto de 20 carbonos con un grupo amino en el C2 y 2 grupos de ácido tricarboxílico esterificados en las posiciones C14 y C15. Las diferentes fumonisinas dentro del grupo B se diferencian por las hidroxilaciones en las posiciones C5 y C10 (Figura 6) (Flaherty et al. 2003). Por su similitud estructural con la esfinganina y su modo de acción sobre el metabolismo de esfingolípidos, la fumonisina B1 se ha caracterizado como una SAMs (Sphinganine-Analog Mycotoxins) (Sánchez-Rangel et al. 2010).

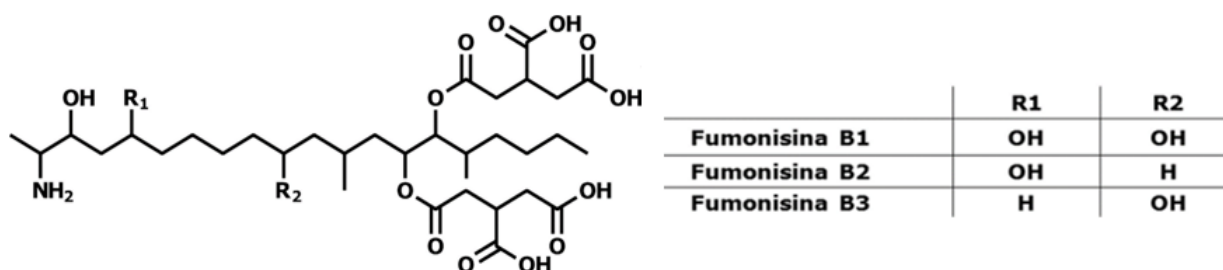


Figura 6. Estructura química de las fumonisinas del grupo B (FB1, FB2 y FB3) (de la Torre-Hernández et al. 2014).

2.3 Blancos moleculares de la FB1 en maíz.

La FB1, además de ser un metabolito secundario, puede ser considerada como un factor de virulencia ya que la producción de esta micotoxina está asociada a la infección de *F. verticillioides* debido a que puede actuar sobre distintos blancos moleculares que pueden promover la colonización en el tejido vegetal. Estos blancos moleculares son: la esfinganina *N*-acetiltransferasa, la ATPasa de protones y las β -(1-3) glucanasas.

2.3.1. Efecto sobre la esfinganina *N*-acetiltransferasa en el metabolismo de esfingolípidos

Los esfingolípidos son compuestos esenciales del sistema estructural de las membranas de células eucariontes, y conforman más del 40% de los lípidos que constituyen la membrana plasmática. La biosíntesis de *novo* de los esfingolípidos comienza con la formación de bases esfingoideas de cadena larga (BCL) a partir de la condensación de la serina con palmitoil-CoA para formar la 3-cetoesfinganina. Ésta es reducida y se forma esfinganina que es acilada por un ácido graso activado por CoA para formar ceramida, en una reacción catalizada por la enzima esfinganina-*N*-aciltransferasa (Fig. 7; Merrill et al. 1997).

La esfinganina-*N*-acetiltransferasa es blanco de la FB1 que inhibe esta actividad enzimática ocasionando una acumulación de BCL, entre ellas esfinganina y fitoesfingosina las cuales son de las más abundantes en plantas (Voss et al. 2007). En estudios de laboratorio se observó que los niveles de BCL como son la esfinganina y la fitoesfingosina en maíz aumentaron donde plántulas de maíz que fueron expuestas a una concentración de 14 μM de FB1 presentaron un aumento de 6 veces más en los niveles de esfinganina y de 2.5 veces más en los niveles de fitoesfingosina; mientras que en embriones de maíz expuestos a una concentración de 10 μM de FB1 tuvieron un aumento en las BCL hasta 6 veces más (de la Torre-Hernández et al. 2010).

Las bases esfingoideas funcionan como mensajeros intracelulares regulando el crecimiento y desarrollo celular, por lo que una alteración en sus niveles tiene múltiples efectos ya que 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 (RH) (Sánchez-Rangel et al. 2012). La RH es un mecanismo de muerte celular programada utilizado por las plantas

como mecanismo de defensa frente a la infección por patógenos. Es una respuesta local ya que la RH se produce en el sitio de infección provocando la muerte celular programada del tejido afectado. Se produce una serie de eventos que incluye la activación de múltiples rutas de transducción de señales hacia el interior de la célula como lo es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o el incremento del transporte de iones como H^+ , K^+ y Ca^{2+} , se incrementa la expresión de los genes de enzimas relacionadas con el metabolismo secundario como la fenilalanina amonio liasa (PAL) a partir de la cual se sintetizan los compuestos fenólicos, o genes relacionados con la producción de proteínas asociadas a la patogénesis como son las β -glucanasas y quitinasas (Lam et al. 2001).

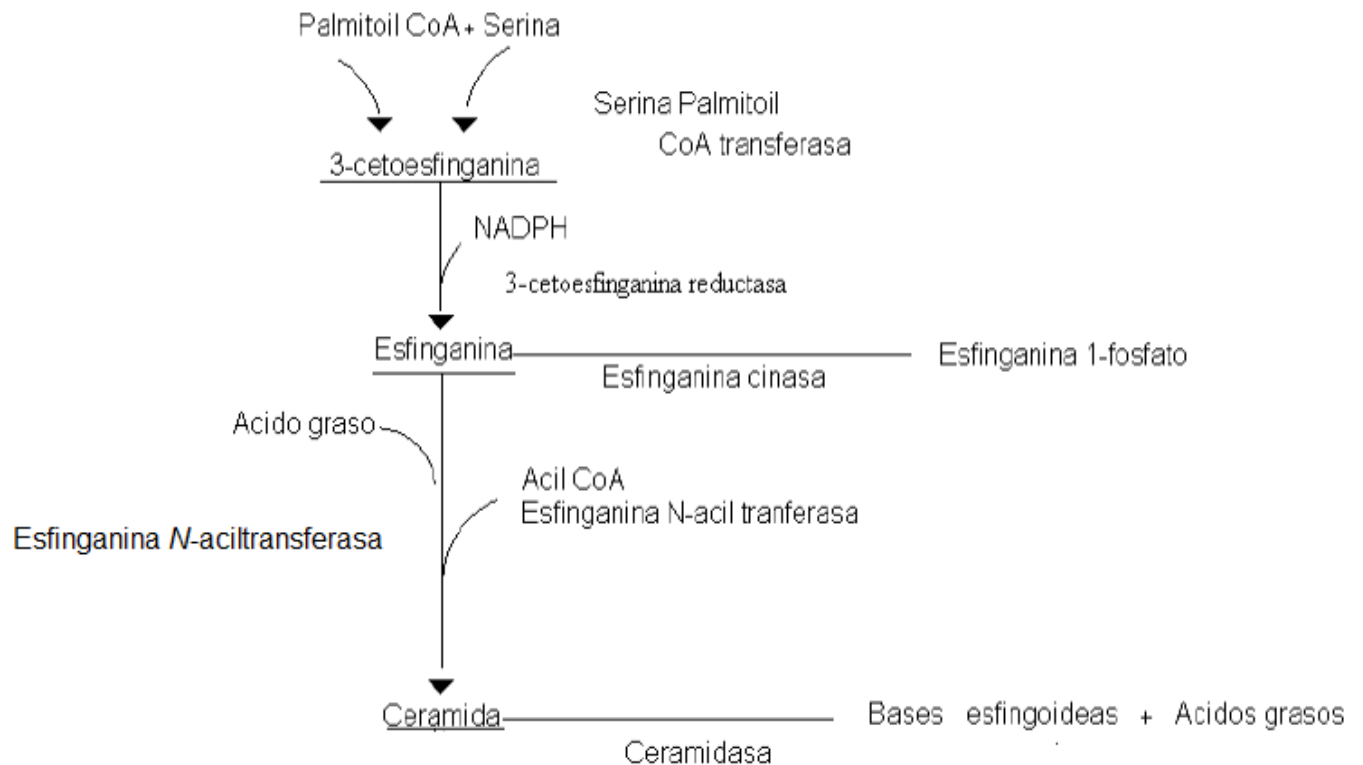


Figura 7. Biosíntesis de esfingolípidos. La inhibición de la esfinganina *N*-aciltransferasa por la fumonisina B1 bloquea la formación de ceramida ocasionando una acumulación de esfinganina.

2.3.2. Inhibición de la ATPasa de protones

La ATPasa de H⁺ es una enzima membranal cuya función es la de transportar H⁺ desde el citoplasma al apoplasto mediante la hidrólisis de ATP. Es fundamental para mantener el potencial membranal negativo y el gradiente transmembranal de pH, eventos esenciales para la elongación del tejido entre otras funciones fisiológicas (Gutiérrez-Najera et al. 2005). Esta enzima también participa en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos ocasionando una reducción en la acidificación del tejido y cambios en la permeabilidad de la membrana, por lo que su inhibición podría favorecer la infección de *F. verticillioides* a la planta. La FB1 inhibe de forma no competitiva y reversible la actividad de la ATPasa de H⁺ aislada de vesículas de membrana plasmática con una Ki de 17.5 µM. La actividad de la ATPasa de embriones de maíz durante la germinación es inhibida un 15% y 30% por concentraciones de FB1 de 10 µM y 40 µM respectivamente (Gutiérrez-Najera et al. 2005).

2.3.3 Efecto sobre la actividad de las β-(1-3) glucanasas

Las β-1,3--glucanasas son enzimas que tienen actividad hidrolítica sobre los enlaces β-(1,3) del glucano. Este polisacárido constituye entre un 50 al 60% de la de la pared celular de los hongos filamentosos, por lo que las glucanasas son eficientes mecanismos de defensa que se expresan de forma constitutiva, y que también se inducen en respuesta a la infección por hongos patógenos (Ferreira et al. 2007). Las distintas isoformas de las β-1,3-glucanasas de maíz muestran una susceptibilidad diferencial a la FB1, pues para las isoformas básicas una concentración aproximada de 53 µM de FB1 inhibe el 50% de la actividad (IC₅₀), y para las isoformas ácidas, este valor es más del doble. La neutralización de este mecanismo de defensa podría favorecer la colonización de *F. verticillioides* en las plántulas de maíz, lo que apoya la función de la FB1 como factor de virulencia, al neutralizar este mecanismo de defensa (Sánchez Rangel et al. 2012).

El mecanismo de acción de la FB1 sobre los distintos blancos en células de maíz se resume en la Figura 8 donde la FB1 producto de *F. verticillioides* inhibe ciertas β -1,3 glucanasas básicas neutralizando este mecanismo de defensa para favorecer la colonización del hongo. La ATPasa de H^+ también es inhibida por la FB1 lo que resulta en una reducción en la acidificación del medio, lo que podría afectar la elongación del tejido vegetal. Y por último la inhibición de la *N*-acil transferasa como blanco molecular de la FB1 provoca una acumulación de BCL lo cual induce la activación de la vía del ácido salicílico que induce a su vez la activación de las isoformas ácidas de las β -1,3 glucanasas así como de la activación de nucleasas que inducen a la muerte celular del tejido afectado.

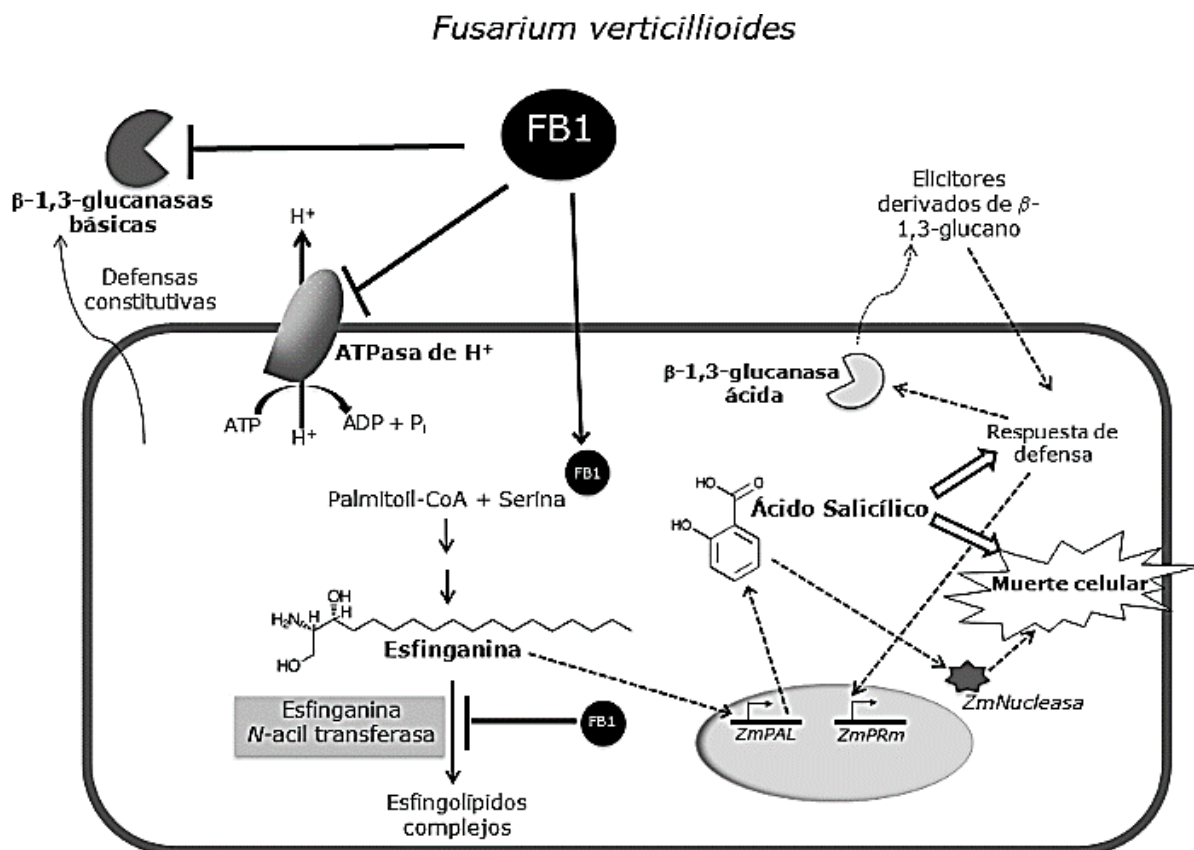


Figura 8. Blancos moleculares de la FB1: la ATPasa de H^+ , la esfinganina *N*-acil transferasa y las β -1,3-glucanasas básicas (de la Torre-Hernández et al. 2014).

2.4. Biosíntesis de Fumonisin

La biosíntesis de fumonisinas depende de la presencia del locus *FUM* localizado en el cromosoma 1 de *Fusarium verticillioides*. Comprende una región de 46 Kpb conformada por 17 genes (Figura 9), algunos de ellos codifican enzimas que participan en la síntesis y otros con una función de regulación de la secreción de la toxina y resistencia a ésta (Tabla1; Proctor et al. 1999 y 2002).

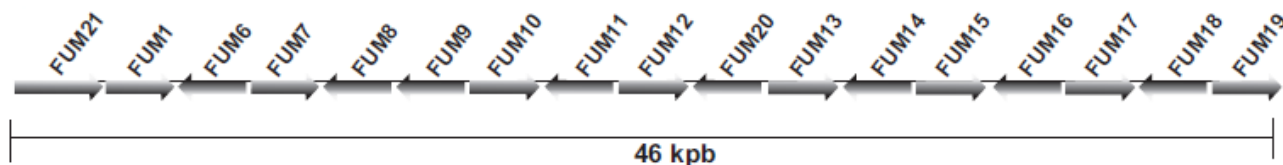


Figura 9. Estructura del locus *FUM*. El locus *FUM* se encuentra en el cromosoma 1 de *Fusarium verticillioides* el cual contiene los genes que participan en la síntesis de fumonisinas (de la Torre-Hernández et al. 2014).

Tabla 1. Productos de los genes contenidos en el locus *FUM* (Tomado y modificado de Montis et al. 2013).

Gen	Producto	Gen	Producto
<i>FUM21</i>	Factor transcripcional Zn ₂ Cys ₆	<i>FUM20</i>	ND
<i>FUM1</i>	Policétido sintasa	<i>FUM13</i>	Deshidrogenasa / reductasa
<i>FUM6</i>	P450 monooxigenasa / reductasa	<i>FUM14</i>	Péptido sintasa
<i>FUM7</i>	Alcohol deshidrogenasa	<i>FUM15</i>	P450 monooxigenasa
<i>FUM8</i>	Aminotransferasa	<i>FUM16</i>	Ácido graso sintasa
<i>FUM9</i>	Dioxigenasa	<i>FUM17</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM10</i>	Ácido graso sintasa	<i>FUM18</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM11</i>	Transportador de tricarboxilatos	<i>FUM19</i>	Transportador ABC
<i>FUM12</i>	P450 monooxigenasa		

*ND. No identificado.

La síntesis inicia con la actividad de la policétido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1*, que condensa 9 acetatos formando una cadena de 18 carbonos con un ácido carboxílico terminal y dos grupos metilo. La enzima PKS es multifuncional ya que presenta siete dominios catalíticos distintos que son de cetosintasa, acetiltransferasa, acarreador de acilos, cetoreductasa, deshidratasa, enoilreductasa y metiltransferasa (Huffman et al. 2010).

El producto del gen *FUM8* es una aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato la cual acarrea un grupo amino de una *L*-alanina al policétido de 18 carbonos mediante una condensación descarboxilativa (de la Torre-Hernández et al. 2014).

Posteriormente ocurren las hidroxilaciones, catalizadas por una dioxigenasa, codificada por el gen *FUM6* (Uhlig et al. 2012). En los C14 y C15 ocurre la esterificación de los ácidos tricarbónicos (*FUM7*, *FUM10*, *FUM11* y *FUM14*) característicos de las fumonisinas posiblemente provenientes del ácido cítrico introducidas al citosol por transportadores de ácidos tricarbónicos codificados por *FUM11* (Bojja et al. 2004).

El producto del gen *FUM13* es una reductasa, responsable de la hidroxilación del oxígeno del carbonilo en el C3. Las hidroxilaciones de los carbonos 5 y 10 son realizadas por monooxigenasas dependientes de citocromo P450 codificadas por *FUM9* y *FUM12* (Proctor et al. 2003). (Figura 10).

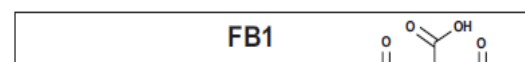
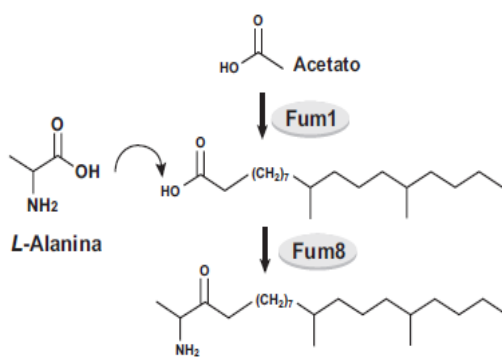


Figura 10. Esquema de la ruta sintética de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*. Se muestran los genes estructurales participantes en cada reacción (de la Torre-Hernández et al. 2014).

La fumonisina sintetizada es secretada por un transportador ABC, codificado por *FUM19*. El gen *FUM21* codifica un factor transcripcional de tipo Zn(II)₂Cys₆ que regula la expresión de los genes del locus *FUM* (Brown et al. 2007). Sin embargo, la expresión de éstos es influenciada por múltiples factores ambientales en cuya regulación participan genes fuera del locus *FUM*.

2.5 Factores que afectan la biosíntesis de fumonisinas

La capacidad de *F. verticillioides* para sintetizar fumonisina no solo depende de la regulación de los genes que se encuentran dentro y fuera del locus *FUM*, se sabe que la producción de FB1 se ve influenciada por varios factores ambientales como son la temperatura, la actividad del agua, el pH, las fuentes de carbono y nitrógeno así como de las defensas naturales de las plantas.

2.5.1 Temperatura y actividad del agua

Entre los factores que influyen en la producción de FB1 se encuentran la temperatura y la actividad del agua. La temperatura óptima de crecimiento de estos hongos filamentosos comprende un rango entre 20 a 30°C, con un límite máximo de 40 a 45°C y como temperatura mínima de 4°C (Miller et al. 1995). La cantidad de agua existente en el ambiente y la cantidad disponible para su consumo son importantes para el desarrollo del hongo, la relación entre estos parámetros es representada como la *Humedad Relativa al Equilibrio (HRE)*. La relación entre el agua libre en sustratos y la capacidad del microorganismo de proliferar es expresada mediante la *Actividad de agua (a_w)*. Los hongos pueden desarrollarse a partir de una a_w desde 0.70, siendo las condiciones óptimas de a_w de 0.96 a 0.98 para *F. verticillioides* (Leslie et al. 2006).

Durante el almacenamiento de granos de maíz, las condiciones óptimas de temperatura y a_w para la producción de fumonisinas son de 20-30 °C con una a_w entre 0.97 y 0.98. La producción de fumonisinas incrementa a niveles bajos de a_w de 0.93-0.95 lo cual indica que el estrés ocasionado por la limitación en la disponibilidad de agua induce la síntesis de las toxinas (Marín et al. 1999).

2.5.2 pH y nutrición

Otros factores que afectan la síntesis de FB1 son el pH y la disponibilidad de nutrientes, especialmente carbono y nitrógeno. Los hongos filamentosos se desarrollan en un rango de pH desde 2.5 hasta 7.5, sin embargo, el pH óptimo para la producción de fumonisinas en *F. verticillioides* es entre 3-3.5 donde también se ve favorecido el desarrollo del hongo sobre el tejido o el sustrato donde éste crece (Flaherty et al. 2003; Picot et al. 2010).

Aunque *Fusarium spp* es capaz de desarrollarse en presencia de diversos compuestos, para la producción de FB1 es esencial la presencia de fuentes de

carbono como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa, aunque no se tenga reporte de que exista preferencia por alguno de ellos. Además, es esencial la presencia de una fuente de nitrógeno, así como de algunas sales (Picot et al. 2010). Existe una relación positiva entre la cantidad de carbono disponible y la cantidad de FB1 producida mientras que hay una relación negativa entre la cantidad de nitrógeno disponible y la biomasa del micelio pues a menor concentración de aminoácidos aumenta la producción de FB1 pero hay una disminución en la cantidad de biomasa producida.

2.5.3 Regulación de la biosíntesis de fumonisinas

A través del uso de cepas mutantes en *F. verticillioides*, se han identificado genes que responden a condiciones ambientales en la regulación de la producción de fumonisinas. Estos genes se encuentran fuera del locus *FUM* y sus productos participan como intermediarios en vías de señalización o como factores transcripcionales que conducen a la expresión o represión de los genes del locus *FUM*. A continuación se describe la función de los genes más relevantes y la tabla 2 presenta un resumen y categorización.

PAC1. Este gen codifica un regulador transcripcional que responde a cambios en pH. Reprime la expresión de *FUM1* y la síntesis de fumonisina en respuesta a los cambios de pH, cuando éste aumenta. Mutantes en este gen producen mayores niveles de fumonisina que la cepa silvestre (Flaherty et al. 2003).

FCK1* y *FCC1. El primero codifica una CDK (cinasa dependiente de ciclina) que interactúa físicamente con el producto de *FCC1*, una ciclina tipo C para formar un complejo entre ambos productos. Participan en la regulación del desarrollo y metabolismo secundario por lo que su actividad controla la expresión de varios genes. Son reguladores positivos ya que una mutación en alguno de estos dos genes ocasiona defectos morfológicos, reducción de crecimiento y menor producción de FB1 (Bluhm et al. 2006; Picot et al. 2010). *FCC1* es ortólogo del gen

Ume3p de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica una ciclina tipo C requerida para la inducción y desarrollo del proceso meiótico (Cooper y Strich, 2002).

ZFR1. Codifica un factor transcripcional con motivo de unión al DNA tipo dedo de zinc $Z(II)_2Cys_6$. Regula positivamente la expresión de varios genes del metabolismo primario y secundario en hongos filamentosos. Este factor se requiere para la transcripción de casi todos los genes del locus *FUM* pues mutantes en *ZFR1* muestran bajos o nulos niveles de FB1 (Flaherty et al. 2003).

GBP1. Este gen codifica una proteína G monomérica que actúa como interruptor en varios procesos celulares como transporte de proteínas y transducción de señales. Regula negativamente la síntesis de FB1 pues mutantes en este gen muestran niveles elevados de los transcritos *FUM1* y *FUM8*, así como la cantidad de fumonisina producida (Shankar et al. 2006).

AREA. Se encarga de la regulación del metabolismo del nitrógeno el cual influye en la síntesis de fumonisina, en presencia de sales de amonio, glicina o glutamato es reprimida su expresión y es promovida en presencia de nitratos. Regula positivamente la síntesis de FB1 ya que una mutación en este gen provoca la disminución de la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* (Kim et al. 2008).

FvVE1. Este gen regula positivamente el desarrollo sexual y el metabolismo secundario de *F. verticillioides*. Estudios realizados demuestran que la presencia de *FvVE1* es necesaria para la expresión del gen *FUM21* y algunos genes estructurales del locus *FUM*, por lo tanto un regulador positivo de la producción de fumonisinas. Una mutación en este gen produce un abatimiento en la expresión de *FUM21* afectando la producción de FB1. También participa en la regulación de procesos de desarrollo (Myung et al. 2009).

Tabla 2. Genes asociados a la regulación de la biosíntesis de FB1 en *F. verticillioides*.

Gen / Producto	Función	Regulación	Referencia
PAC1 Regulador transcripcional	Regula la expresión de los genes FUM en respuesta a cambios de pH; en medio ácido aumenta la producción y en medios alcalinos es suprimida.	Negativa	Flaherty et al. 2003
FCK1 Cinasa dependiente de ciclina	Su correcta expresión favorece la producción de FB1	Positiva	Bluhm et al. 2006
FCC1 Proteína tipo ciclina C	La correcta expresión en este gen favorece la producción de FB1	Positiva	Picot et al. 2010
ZFR1 Factor transcripcional de tipo Zn(II) ₂ Cys ₆	El factor es requerido para la transcripción de genes del locus <i>FUM</i>	Positiva	Flaherty et al. 2003
GBP1 Proteína G monomérica	Controla los niveles de FB1 a nivel de expresión de <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	Negativa	Shankar et al. 2006
AREA Regulador del metabolismo del nitrógeno	La expresión es promovida en presencia de nitratos para favorecer la producción de FB1	Positiva	Kim et al. 2008
FUM21 Factor transcripcional de tipo Zn(II) ₂ Cys ₆	Su presencia favorece la producción de FB1 al promover la expresión de <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	Positiva	Picot et al. 2010
FvVE1 Regulador de desarrollo sexual y metabolismo secundario	Su presencia de este gen es necesaria para la expresión de <i>FUM21</i>	Positiva	Myung et al. 2009

2.5.4 Defensas naturales de la planta

En general, los mecanismos de defensa en las plantas contra microorganismos patógenos se dividen en 1) defensas preformadas que incluyen compuestos con función estructural o tóxica que previenen la penetración de la mayoría de los patógenos, y 2) respuestas inducible que se presentan cuando las células del hospedero perciben la presencia de un patógeno y montan una respuesta rápida y eficiente que limita el crecimiento y la colonización. La semilla del maíz (*Zea mays L.*) está compuesta por tres partes: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 11) y cada una de ellas tiene distinta composición. El pericarpio se caracteriza por presentar un alto contenido de polímeros complejos como lo son la hemicelulosa, celulosa y lignina; el endospermo contiene altos niveles de almidón y finalmente el embrión presenta niveles altos en de grasas crudas y proteínas (FAO, 2016). En la tabla 3 se presenta la composición porcentual de cada una de las fracciones del grano de maíz.

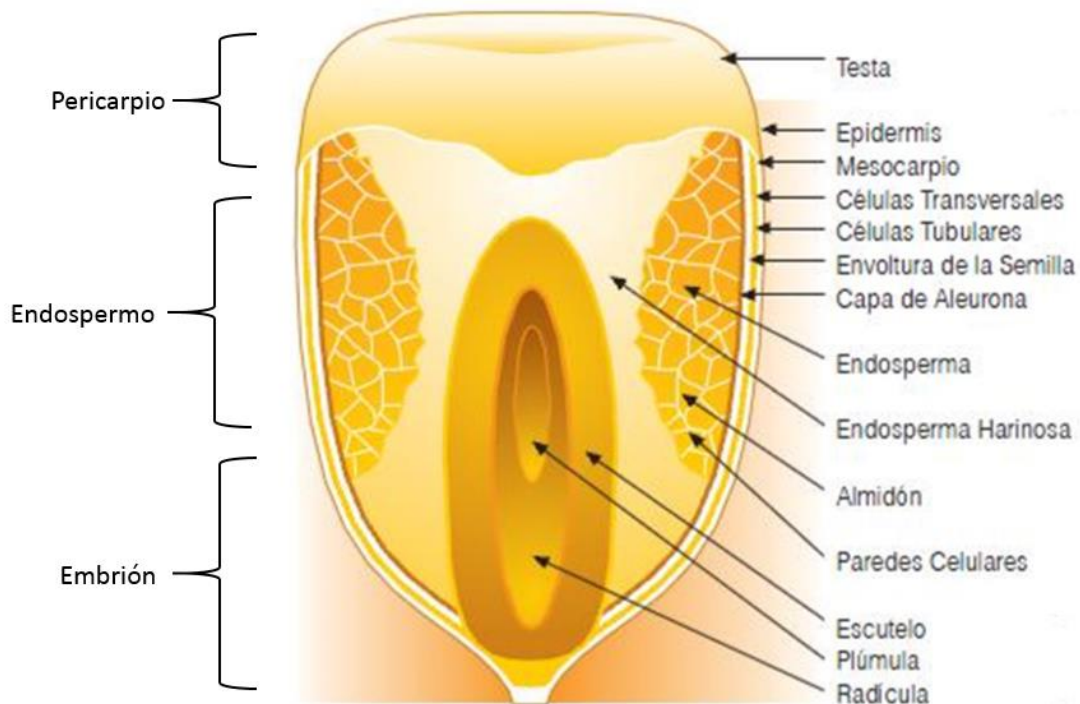


Figura 11. Estructura del grano de maíz. Se muestran cada una de las secciones que lo conforman. Tomado y editado de <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>

Tabla 3. Composición química de las fracciones del grano de maíz. Los porcentajes representan la proporción del compuesto presente en la fracción estructural a partir del contenido total presente en el grano entero (Bressani, 1990).

Fracción	Almidón (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Otros carbohidratos (%)
Pericarpio	7.3	3.7	1.0	0.8	0.34
Endospermo	86.4	8.0	0.8	0.3	0.62
Embrión	8.2	18.4	33.2	10.5	10.8

Además de los compuestos mayoritarios que se indican, otros metabolitos cumplen funciones de protección en la semilla de maíz. Los compuestos fenólicos están implicados en la resistencia a la pudrición de la mazorca y a la infección por insectos (Bily et al. 2003). La mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran en las capas exteriores del grano como lo es en el pericarpio y su distribución varía en cada fracción del grano de maíz (Sampietro et al. 2009).

La tabla 3 presenta la composición y la concentración de ácidos fenólicos realizados en estudios *in vitro* de dos variedades de grano de maíz donde fue estudiado el patrón de distribución de dichos compuestos en cada una de las fracciones del grano (pericarpio, endospermo y embrión) principalmente de ácidos fenólicos y flavonoides.

Tabla 4. Niveles de ácidos fenólicos y flavonoides en las fracciones del grano de maíz dentado y duro (Das et al. 2015).

Concentración ($\mu\text{g} / \text{g}$ de muestra seca)						
Compuesto fenólico	Maíz dentado			Maíz duro		
	Pericarpio	Endospermo	Embrión	Pericarpio	Endospermo	Embrión
Ác. Ferúlico	1823.1 \pm 70.8	2324.9 \pm 54.5	5.1 \pm 0.6	2730.4 \pm 66.2	332.2 \pm 9.7	22.9 \pm 3.0
Ác. Cumárico	123.3 \pm 9.2	68.2 \pm 1.0	ND	136.5 \pm 12.4	250.8 \pm 28.5	0.45 \pm 0.03
Ác. Cafeico	31 \pm 1.0	27.8 \pm 0.9	ND	ND	59.8 \pm 0.6	ND
Cyanidin 3-glucósido	12.6 \pm 2.1	ND	ND	36.8 \pm 2.5	ND	ND
Quercetina	35.9 \pm 3.1	ND	ND	ND	12.0 \pm 0.4	ND

*ND= No detectado

Como se aprecia en la tabla 4, los niveles de ácido ferúlico son más altos en el pericarpio en maíz duro y estos pueden variar en un rango de 4.5 mg/g a 26.3 mg/g en distintos genotipos de maíz (Informe técnico proyecto IMIC-CIMMYT, no publicados).

3 Ácidos fenólicos

3.1 Generalidades

Los compuestos fenólicos son un grupo amplio de sustancias en su mayoría de origen natural cuyas estructuras varían a partir de uno o más anillos fenólicos.

Dentro de estos compuestos se encuentran los flavonoides, las isoflavinas, los taninos, los lignanos, las cumarinas y los ácidos fenólicos (Figura 12).

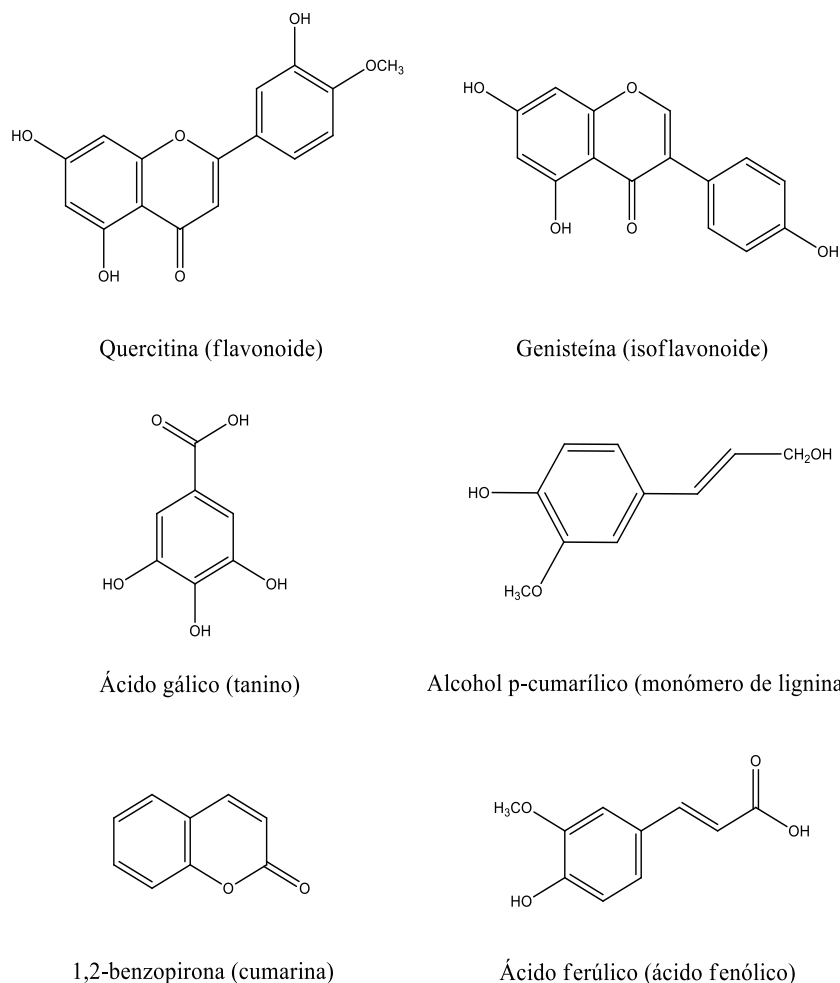


Figura 12. Estructura de los compuestos fenólicos presentes en plantas representativas de cada grupo de acuerdo a su clasificación.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por las plantas esenciales para su crecimiento y reproducción. Son derivados del ácido cinámico que se sintetizan de manera ubicua en las plantas desde las raíces y semillas hasta el tallo y las hojas (Robbins, 2003). Participan como agentes estructurales de la pared celular pues su incorporación aporta rigidez a esta estructura. Además, actúan como mecanismo de defensa frente a patógenos al ser secretados bajo un estímulo que ocasiona estrés a la planta como puede ser las infecciones por los

hongos (Dixon et al. 1995). Estos compuestos fenólicos se encuentran en niveles variables en distintas especies de angiospermas y otra de sus funciones es su actividad antioxidante capaces de neutralizar los radicales libres presentes que causan daño oxidativo en el organismo a distintas moléculas (Kâhkônén et al. 1999). Otra función de los compuestos fenólicos es la actuar como filtros de radiación UV-B solar pues tienen capacidad de absorber radiación entre los 280-360 nm, lo que resulta en la protección de los ácidos nucleicos y otras macromoléculas (Li et al. 1993; Landry et al. 1995).

3.1.1 Biosíntesis en plantas

Muchos compuestos aromáticos presentes en plantas derivan del metabolismo del ácido shikímico que se produce por la condensación de la eritrosa 4-fosfato con el fosfofenolpiruvato, y luego es convertido a corismato (Herrman, 1995). Este sirve como precursor para la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. A partir de la fenilalanina se forman fenilpropanoides.

La primera enzima en el metabolismo de fenilpropanoides es la fenilalanina amonio liasa (PAL), que cataliza la eliminación del grupo amino del aminoácido para generar ácido cinámico (Figura 13). De igual manera la ruta puede usar la tirosina como sustrato y la enzima que cataliza la reacción es la tirosina amonio liasa (TAL), para generar ácido cumárico. El grupo amino eliminado en forma amonio es recapturado dentro de la planta. Posiblemente mediante la acción de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintetasa (GOGAT) el grupo amino puede ser donado al pterinato dando origen al arogenato, un precursor de la fenilalanina y tirosina (Seigler 1997).

La acción de una hidroxilasa (Ca4H) en el C-4 del ácido cinámico da lugar a ácido *p*-cumárico, que es hidroxilado en C-3 por la enzima Ca3H (cumarato 3-hidroxilasa) para generar ácido cafeico. La metilación del grupo hidroxilo en la posición C-3 catalizada la enzima COMT (ácido cafeico metiltransferasa) da lugar al ácido ferúlico. Esta molécula puede sufrir una descarboxilación y una deshidratación para

formar vainillina pero no se tiene bien caracterizada la enzima que participa en este paso, se ha propuesto que se trata de la feruloil CoA (Dixon et al. 1995).

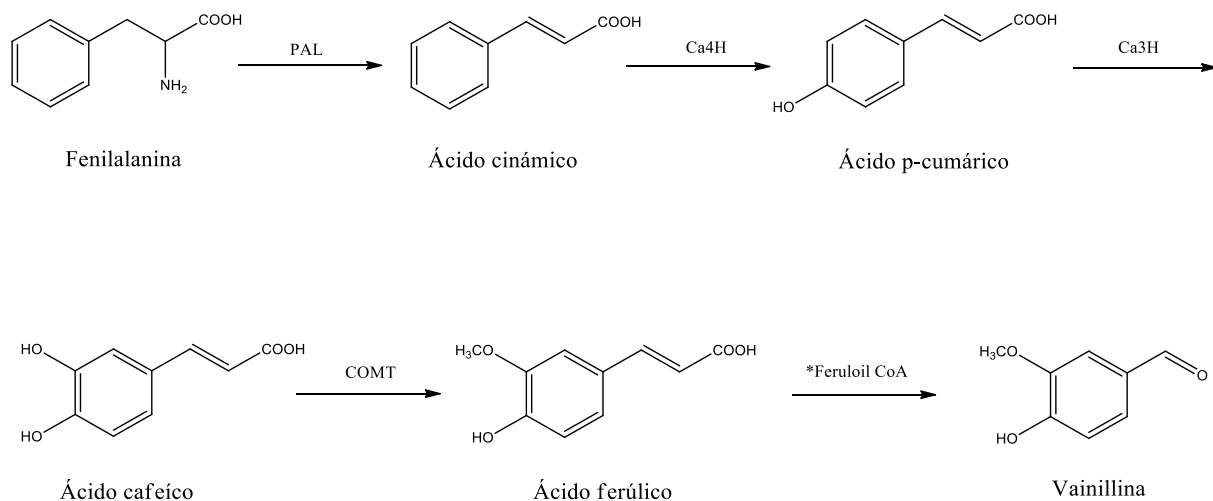


Figura 13. Esquema de los derivados fenólicos de la fenilalanina. Estructura de los productos obtenidos a partir de la fenilalanina producto de la ruta del Shikimato para dar lugar a los ácidos fenólicos más comunes encontrados en plantas. **PAL:** Fenilalanina amonio liasa; **Ca4H:** ácido cinámico 4-hidroxilasa; **Ca3H:** cumarato 3 hidroxilasa; **COMT:** ácido cafeico O-metiltransferasa. ***Feruloil CoA:** Posible enzima que participa en la transformación de ácido ferúlico a vainillina (Ochoa-Alejo et al. 1993)

3.1.2 Efecto de los ácidos fenólicos sobre la producción de fumonisinas

El ácido ferúlico tiene la capacidad de inhibir el desarrollo y crecimiento de *F. verticillioides*, y a concentraciones de 20 mM suprime significativamente el crecimiento del hongo y sin embargo ha sido reportado que a una concentración de 1 µg/mL causa una reducción hasta del 90% en la producción de FB1 (Tabla 5). Estos efectos son dependientes de la concentración pues el ácido ferúlico a concentraciones menores a 0.008 mM (1.56 µg/mL) no muestra inhibición en el crecimiento del hongo (Beekrum et al. 2003; Ferrochio et al. 2013).

Tabla 5. Efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento y la producción de fumonisina B1 (Tomado y modificado de Beekrum et al. 2003). .- Concentración utilizada para experimento de cuantificación de FB1: 1 µg/mL (≈ 0.005 mM).

Experimento	Estudio del crecimiento radial en presencia de compuestos fenólicos		Análisis de FB1 producida en presencia de compuestos fenólicos	
	Radio de inhibición mm ± SD	*MCI (µg/mL)	Producción de FB1 (ng/mL)	Reducción de FB1 (%)
Control	-	-	4290 ± 35	
Ácido ferúlico	No presentó inhibición	**NI	408 ± 6	90
Ácido benzoico	No presentó inhibición	**NI	4260 ± 27	1
Ácido cafeico	0.5 ± 0.2	50	426 ± 11	90
Ácido vainílico	0.2 ± 0.1	50	293 ± 11	90

*. MCI. Mínima concentración inhibitoria en el experimento del crecimiento radial

** . NI. No se encontró inhibición a las concentraciones probadas (1.56-100 µg/mL).

Sin embargo, se desconoce el mecanismo preciso de esta inhibición sobre la producción de fumonisinas por efecto de los ácidos fenólicos. Dada la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos se ha propuesto que estos afectan el estado redox de las células fúngicas, lo que altera la producción de fumonisinas (Xi et al. 2014; Ponts et al. 2006). Asimismo podrían afectar los reguladores de la producción de fumonisinas que responden a factores ambientales (Holmes et al. 2008). Una primera aproximación para probar esto es el estudio de la expresión de los genes del locus *FUM* involucrados en la biosíntesis de la micotoxina.

III. HIPÓTESIS

Si la fumonisina B1 producida por *Fusarium verticillioides* es considerada como un factor de virulencia cuya producción depende de factores ambientales como las defensas naturales de las plantas, el ácido ferúlico suprimirá la biosíntesis de fumonisina B1, a través de la represión de la expresión de genes del locus *FUM*.

IV. OBJETIVOS GENERAL Y PARTICULAR

Evaluar el efecto del ácido ferúlico presente en plantas sobre la biosíntesis de Fumonisina B1 en un modelo *in vitro* en la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* y si dicho efecto está asociado a la inhibición de la expresión de los genes del locus *FUM*.

- Determinar las concentraciones de ácido ferúlico que tengan un efecto mínimo en el crecimiento radial de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*.
- Evaluar el efecto del ácido ferúlico en la producción de fumonisina B1 *in vitro* en la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*.
- Evaluar la expresión y los niveles de los transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8* en presencia de ácido ferúlico.
- Establecer si existe una correlación entre el efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes del locus *FUM* (*FUM1* y *FUM8*) y la producción de FB1 de *Fusarium verticillioides*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Efecto del ácido ferúlico sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides*

Para los experimentos realizados se utilizó la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* el cual previamente se determinó como una cepa altamente productora de FB1 (Sánchez-Rangel et al. 2005) obtenida a partir de un inóculo de sustrato estéril conservado a -20 °C.

Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)

Para preparar 250 mL de medio de cultivo PDA al 0.5X / agar al 1.5%, se pesaron 4.9 g de PDA y 3.8 g de agar, se suspendieron en 250 mL de agua desionizada y se mezclaron en un frasco con tapón de rosca de 500 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 1.2 kg/cm² y 120°C y se dejó enfriar aproximadamente a 40-45°C. En la campana se vaciaron 25 mL de medio PDA en cajas Petri estériles, se enfriaron y se solidificaron a temperatura ambiente por 24 hrs, fueron guardados para su uso a 4°C.

Inóculo y conteo de conidias

La cepa MY3 de *F. verticillioides* contenida en el sustrato estéril se inoculó en medio PDA y se incubó de 7 a 10 días a 29°C bajo luz fluorescente. Transcurrido ese tiempo, se añadieron de 5 a 10 mL de agua estéril al micelio de aproximadamente 5 cm de diámetro, se agitó la caja Petri por 90 min a 150 rpm a temperatura ambiente. La superficie del medio fue raspada con una punta estéril para desprender las conidias del micelio. La suspensión de conidias fue recolectada en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm con tapón de rosca. Cuando se observó material particulado, el tubo se centrifugó a 13,400 rpm en la centrifuga Beckman (GS-6R).

En tubos Eppendorf se hicieron diluciones para probar la más adecuada para el conteo de conidias, se tomó una alícuota y se colocó en la cámara de Neubauer. (Fig. 14). La cámara se colocó sobre el microscopio enfocando con el objetivo de 40X. Se contaron las conidias de los cuadrantes I, II, III y IV.

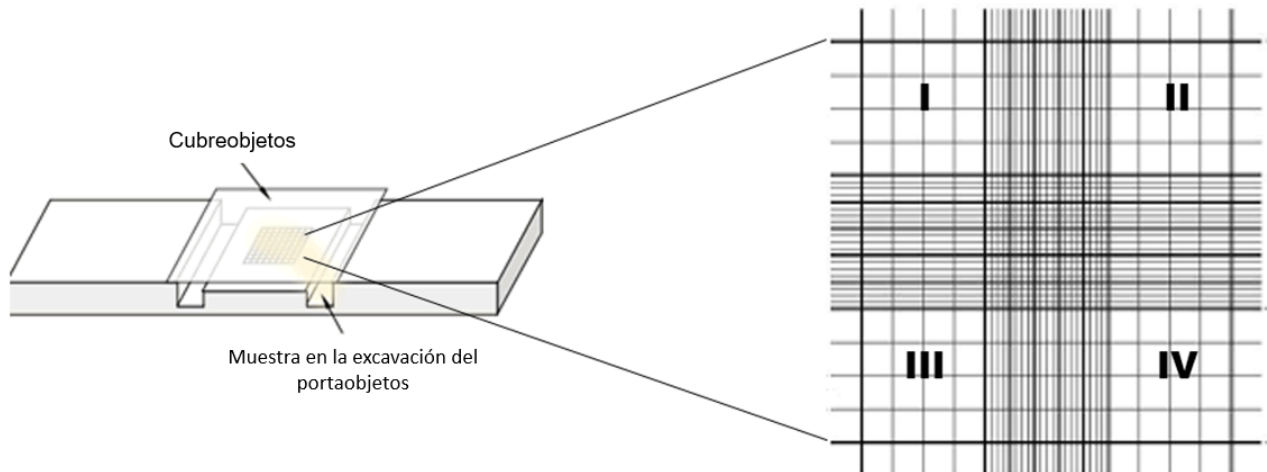


Figura 14. Cámara de Neubauer. El conteo fue realizado en cada cuadrante obteniendo el promedio del conidias en el conteo.

Para obtener el número de conidias se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{Conidias} / \mu\text{L}] = (X) (FD) (10 \text{ conidias} / \mu\text{L})$$

Donde:

$X = \text{Promedio de conidias en los cuatro cuadrantes}$

$FD = \text{Factor de dilución}$

Se calculó el volumen necesario para preparar una suspensión de conidias cuya concentración fue la adecuada para inocular 50,000 conidias.

Inoculación y suplementación del medio PDA

Para los experimentos del efecto del ácido ferúlico (AF) sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* fue necesario suplementar el medio PDA con AF. Para esto se hicieron los cálculos para obtener el volumen necesario que se añadió al medio de cultivo para llegar a una concentración final deseada a partir de una solución Stock

de AF 100 mM, disuelto en etanol y mantenida en congelación (- 20°C). Las alícuotas se añadieron a la caja Petri con medio PDA mientras se mantuvo a 40°C aproximadamente, se agitó para homogenizar el AF en el medio. Se dejó enfriar y solidificar el medio.

Con ayuda de una punta estéril se hizo un pozo en el centro del medio de cultivo. A partir de la suspensión de conidias se tomó el volumen necesario para inocular 50,000 conidias en el pozo. Las cajas se incubaron de 12 a 14 días a 29°C bajo luz fluorescente y se determinó el crecimiento radial cada 2 días.

2. Efecto del ácido ferúlico en la producción de FB1.

Preparación de medio de cultivo GYAM

El medio GYAM es un medio de cultivo que estimula la producción de fumonisina. Para la preparación del medio previamente se preparó un Stock de sales 10X y una solución de asparagina 40 mM (**APÉNDICE**). Por cada 100 mL de medio GYAM que se preparó, se pesaron 2.16 g de glucosa, 0.05 g de extracto de levadura y 0.67 g de ácido málico, se disolvieron en 20 mL de agua desionizada, se agregaron 10 mL del Stock de sales 10X y 70 mL de agua desionizada.

Se esterilizó en autoclave por 20 min a 1.2 Kg/cm² y 120°C. Una vez estéril se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregaron 20 mL de solución de asparagina 40 mM previamente esterilizada por filtración a través de una membrana Millipore 0.22µm. Las concentraciones finales de cada componente del medio GYAM se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Composición final del medio GYAM.

Compuesto	Concentración en medio
Glucosa	0.12 M
Extracto de levadura	0.05%
Ácido málico	50 mM
L-asparagina	8 mM
*Cloruro de sodio	1.7 mM
*Fosfato dibásico de potasio	4.4 mM
*Sulfato de magnesio	2.0 mM
*Cloruro de calcio	8.8 mM

*Componentes del Stock de sales 10X

Inoculación de *F. verticillioides* en medio GYAM

En matraces Erlenmeyer de 50 mL se agregaron 15 mL de medio GYAM en cada uno. A partir de la suspensión de conidias se inocularon 50,000 conidias a cada matraz de cada réplica por tratamiento. Los matraces fueron incubados por 7 días a 27°C en oscuridad.

Cosecha de FB1 a partir de medio GYAM

Una vez terminado el periodo de incubación se tomó una alícuota de 2 mL del medio de cultivo de cada replica y se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL. Estos se centrifugaron a 13,400 rpm en una centrífuga Minispin® Eppendorf. El sobrenadante se decantó en otro tubo Eppendorf que se etiquetó y almacenó a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación de FB1 en medio GYAM mediante HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación de compuestos presentes en una mezcla líquida con base en la partición que tengan entre la fase estacionaria y la fase móvil. Para la detección la FB1 se aprovecha la presencia del grupo amino, que reacciona con *o*-ftaldialdehído (OPA) en presencia de β -mercaptoetanol para formar un complejo que emite fluorescencia. El mecanismo de reacción se presenta en la figura 15.

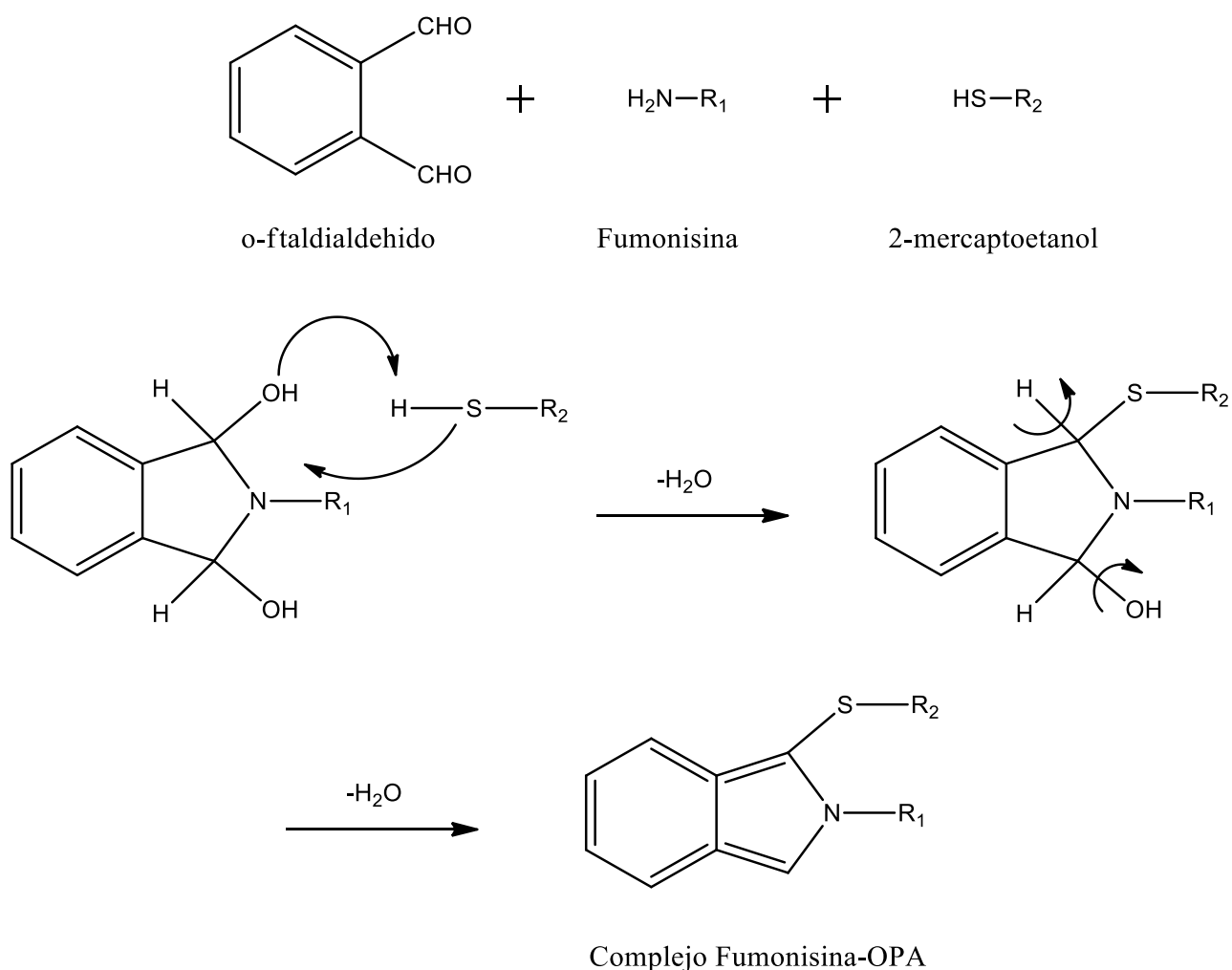


Figura 15. Mecanismo de reacción para la formación del complejo Fumonisina-OPA.

Preparación de la curva patrón y en muestras para el análisis por HPLC

A partir de un estándar de FB1 se prepararon las diluciones de cada punto de la curva utilizando concentraciones de 72, 54, 36, 18 y 9 µg/mL. Los derivados fluorescentes de los estándares y las muestras se prepararon mezclando 10µL de estándar o de muestra con 25 µL de OPA en un tubo Eppendorf de 2 mL y se incubó a temperatura ambiente por 3 min.

Se agregaron 465 µL de ACN:H₂O (1:1 v/v). Se almacenaron en hielo. Para el análisis se inyecta en el HPLC 20 µL de una dilución 1:200 de cada estándar y 20 µL de una dilución adecuada para el análisis. La preparación de cada estándar se muestra en el apéndice (tabla 13).

Condiciones de análisis

Se utilizó como fase móvil etanol absoluto-buffer de fosfatos (70:30) a pH = 3 y como fase estacionaria una columna Pursospher® RP-18 de 15cm por 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm. Se usó una bomba con un flujo de 1.2 – 1.5 mL/min y una presión de 102 Kg/cm².

Se empleó un detector de fluorescencia Shimadzu (RF-10AXL) programado a una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm. Los parámetros del detector de fluorescencia se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu (RF-10AXL)

Función	Valor
λ_{exc}	335
λ_{em}	440
GAIN	2
SCAN	2
RANGE	1
SENSITIVITY	1
RESPONSE	4

Las condiciones del integrador Shimadzu C-R5A fueron las siguientes: Atenuación 4; Pendiente 35 000-40 000; Método 2021; Formato 40.

3. Efecto del ácido ferúlico en los niveles de los transcritos de *FUM1* y *FUM8*

Preparación del micelio

En matraces Erlenmeyer de 50 mL se agregaron 15 mL de medio. Se inocularon 50,000 conidias en cada matraz de los controles y tratamientos de AF utilizados. Los matraces fueron incubados por 5 días a 27°C en oscuridad, es importante que la edad del micelio no pase de los 7 días. El micelio se filtró con papel Miracloth estéril a través de un embudo Büchner conectado a un matraz kitasato y a una bomba de vacío. El micelio se lavó con agua estéril y se retiró el exceso de agua con el filtro.

Extracción de RNA total

Una vez filtrado el micelio, se colocó en un mortero estéril y se congeló con N₂ líquido. Se añadió Trizol™ (Invitrogen) en proporción 4:1 con relación a la masa del

tejido y se pulverizó con el pistilo hasta obtener una mezcla suficientemente homogénea y con adición constante de N₂ líquido para evitar la degradación del RNA. La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 13,400 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se le agregaron 200 µL de una mezcla de FCI (Fenol-Cloroformo-Isoamílico 25:24:1) y se agitó por 15 segundos y cada tubo se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se le agregaron 400 µL de cloroformo, se centrifugó a 13,400 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se separó y se le adicionaron 400 µL de cloroformo y se centrifugó de nuevo a 13,400 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se separó en un tubo Eppendorf estéril y se le agregó un volumen de isopropanol, se mezcló muy bien y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez incubado se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante se decantó y el pellet se lavó con 1 mL de EtOH al 70%, se centrifugó otra vez por 5 min, se decantó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente por 5 min. El pellet se disolvió en 500 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 167 µL de LiCl 8M y se incubó a 4°C durante toda la noche.

La muestra se centrifugó por 15 min a 4°C. El pellet se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 500 µL de EtOH al 95% y 25 µL de acetato de sodio 3M. Se incubó toda la noche a -70°C. Una vez incubado, se centrifugó a 13,400 rpm por 20 min a 4°C, se lavó con 1 mL de EtOH al 70% dos veces. Se eliminó el EtOH residual y el pellet se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en 40 µL de H₂O-DEPC; el RNA total se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000 y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Análisis electroforético del RNA total

La integridad del RNA total se evaluó mediante un análisis electroforético en un gel de agarosa al 2.5%. Para su preparación, se suspendió la agarosa en 25 mL de H₂O-DEPC, se le agregó 0.5 mL de solución TAE-DEPC 50X (**APÉNDICE**) y 10 µL de bromuro de etidio (0.5 µg/µL), como intercalador de ácidos nucleicos el cual permite la visualización del RNA al ser expuesto a luz ultravioleta. Se utilizó como amortiguador de corrida 500 mL de solución TAE-DEPC 1X. Se prepararon las muestras adicionando 1 µg de RNA y 2 µL de amortiguador de carga. Se corrió por 45 minutos a 85 V. El gel se colocó en un transiluminador UV y fue digitalizado en un sistema ChemiDoc™ MP para su análisis por densitometría.

Calibración por densitometría

El ajuste o calibración por densitometría se realiza con el objetivo de partir de la misma cantidad de RNA total en una reacción de RT. Mediante el software ImageJ se realiza el análisis densitométrico de las dos bandas de RNA ribosomal (18S y 28S) resuelto en un gel de agarosa donde fue cargado 1 µg de cada muestra. Se toma como criterio que la diferencia entre los valores de densitometría de las bandas de RNAr no sean mayores a un 15%. En caso de haber diferencias mayores entre muestras, se ajusta el volumen a cargar y se repite el análisis densitométrico hasta minimizar dicha diferencia. Se añadió a cada muestra inhibidor de nucleasas

4. Reacción RT-PCR

Síntesis de cDNA

A partir de 1µg de RNA se sintetizó cDNA mediante la transcriptasa reversa (kit ImProm-II Promega). El RNA se mezcló con 1 µL de Oligo dT (500 µg/µL oligo dT 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3') y H₂O-DEPC hasta un volumen final de 10 µL, la mezcla se mantuvo a 70°C por 5 minutos para alinear y se mantuvo en

4°C por 5 minutos. La mezcla de reacción se preparó como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT)

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer ImProm II™ 5x	1x	4 µL
MgCl ₂ 25 mM	3 mM	2.4 µL
dNTPs 10 mM	0.5 mM	1 µL
H ₂ O-DEPC c.b.p.15µL		6.6 µL
Transcriptasa reversa ImProm II™		1 µL
	Volumen final	15 µL

Una vez preparada la mezcla de reacción se mezclaron los 15 µL de ésta con los 10µL del RNA molde, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA se incubó a 42°C durante 1 hora y finalmente se colocó a 70°C por 15 minutos para inactivar la transcriptasa reversa a. El cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite amplificar *in vitro* secuencias de DNA de forma exponencial a partir del molde de DNA o cDNA, oligonucleótidos específicos que acotan la región a amplificar por una DNA polimerasa termoestable. Las etapas que se llevan a cabo durante la reacción son: desnaturalización (94°C), alineamiento (55-65°C) y elongación (72°C) del DNA molde.

Se tomaron 3 μL de cDNA y se mezclaron con 2 μL de H_2O estéril, se mantuvo la mezcla en hielo (4°C) mientras se preparó la mezcla de reacción. Se utilizó el kit GoTaq® DNA Polimerasa Promega. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivo	Concentración final	Volumen para 1 reacción
Buffer 5x Green Promega	1x	4 μL
dNTPs 10 mM	0.2 mM	0.4 μL
Oligo Fr	0.6 μM	0.6 μL
Oligo Rv	0.6 μM	0.6 μL
Taq Polimerasa	0.02 U	0.25 μL
H_2O estéril	c.b.p. 15 μL	9.15 μL
	Volumen final	15 μL

Una vez preparada la mezcla de reacción se combinaron los 15 μL de ésta con los 5 μL de cDNA- H_2O , se agitó en el vórtex, se centrifugó brevemente en una microfuga y se colocó en el termociclador. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700 y se establecieron las condiciones de amplificación para cada gen de estudio. Se amplificaron los transcritos para *FUM1* (policétido sintasa), *FUM8* (amino transferasa) y β -tubulina, las condiciones de amplificación se presentan en la tabla 10. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se usó TAE 1X como amortiguador de corrida. Se utilizó el sistema ChemiDoc™ MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 10. Secuencia y tamaño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *FUM1* y *FUM8* y del gen de tubulina

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del producto de PCR (pb)	Referencia
<i>β-tubulina</i>	Fw: 5'-TGCTCATTTCCTCAAGATCCGCG-3'	233	Hu. Et al. 2008
	Rv: 5'-GTAGTTGAGGTCACCGTAGGAGG-3'		
<i>FUM1</i>	Fw: 5'-CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3'	354	Hu. Et al. 2008
	Rv: 5'-ATCCGTGTATGCATATGTCGAG-3'		
<i>FUM8</i>	Fw: 5'-TGAGAAGGATGTTCATGACGCC-3'	287	Hu. Et al. 2008
	Rv: 5'-TTGGACCCAGCTCTGCCA-3'		

Análisis de los amplicones de cDNA por densitometría

El tamaño de los amplicones se obtuvo a partir de la búsqueda de las secuencias de cada gen en la base de datos NCBI a partir de las cuales fueron diseñados los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes (Aguilar-Estevez 2011) (Tabla 11). Los productos de amplificación fueron mediante el software ImageJ.

Tabla 11. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados

Gen	Temperatura de desnaturalización	Temperatura de alineamiento	Temperatura de síntesis	Concentración de Oligonucleótidos	Ciclos
<i>Tubulina</i>	94°C	54°C	72°C	0.6 μM	26
<i>FUM8</i>	94°C	54°C	72°C	0.6 μM	26
<i>FUM1</i>	94°C	54°C	72°C	1.2 μM	36

Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron usando el programa Statistix V.4.0, mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y comparación de medias por la prueba de Tukey; $p \leq 0.05$).

Se trabajaron entre tres a seis replicas biológicas para cada ensayo, para el estudio del efecto de AF sobre el crecimiento radial se formaron grupos por cada tratamiento con 3 réplicas cada uno, para los ensayos de cuantificación de FB1 y de análisis de amplicones se utilizaron 6 réplicas por cada tratamiento.

VI. RESULTADOS

1. Efecto del ácido ferúlico sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides*

Para determinar la dosis de ácido ferúlico que no afecta el crecimiento de *F. verticillioides*, se inocularon 5×10^4 conidias en placas con medio PDA suplementadas con distintas concentraciones de ácido ferúlico, y se incubaron por 14 días a 30°C. Se midió el crecimiento radial a distintos tiempos (Fig. 16) y se observó que a partir del día 5, el crecimiento radial se inhibió de manera significativa en todas las concentraciones de AF empleadas; a los 15 días alcanzaron apenas un 50% del crecimiento lo controles.

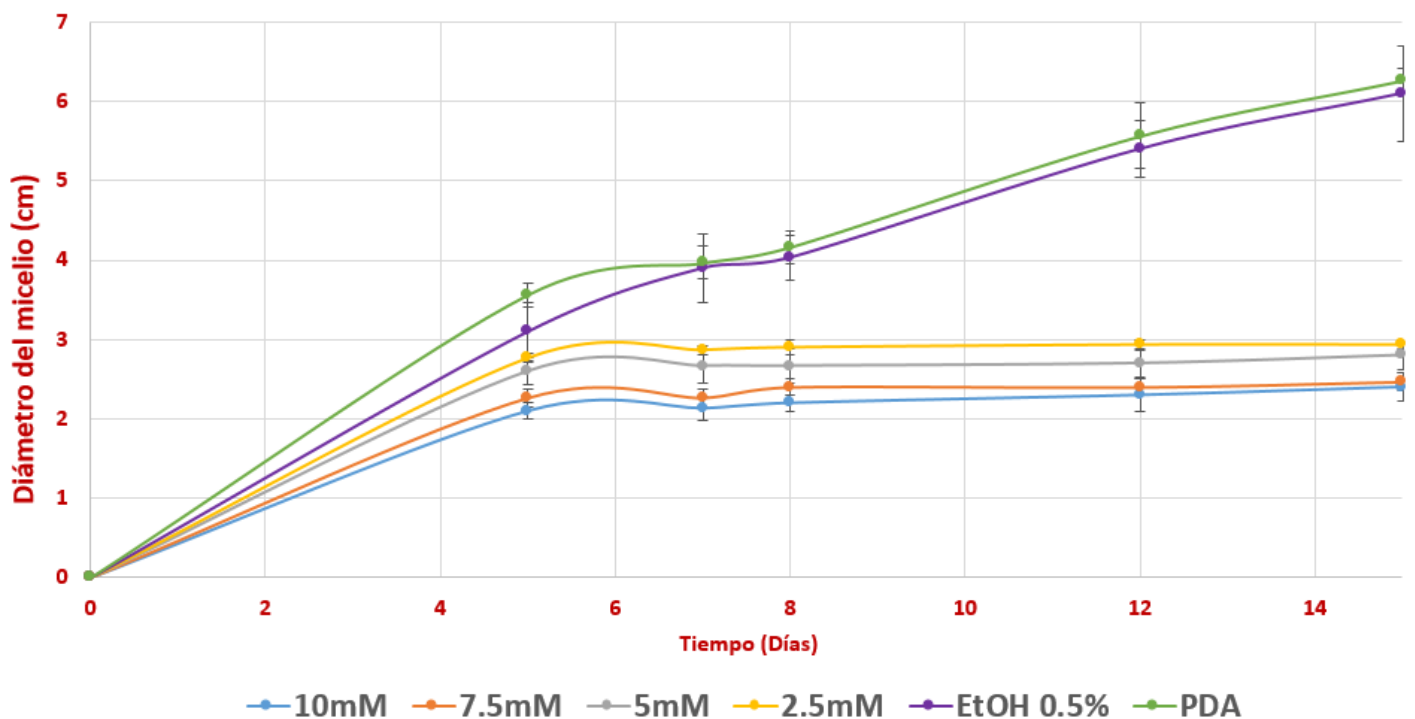


Figura 16. Concentraciones altas de ácido ferúlico inhiben el crecimiento radial significativamente. La cepa MY3 de *F. verticillioides* se creció en placas de PDA suplementadas con concentraciones crecientes de AF (2.5, 5.0, 7.5 y 10 mM) por triplicado. Se midió el crecimiento radial desde los 5 días.

Estas diferencias entre los grupos control y los tratamientos fueron significativas ($p < 0.05$) por lo que decidimos disminuir las concentraciones de AF a 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM. La figura 17 muestra fotos representativas del reverso de las cajas con

medio PDA suplementadas con AF donde se aprecia el crecimiento radial de *F. verticillioides* a los 14 días.

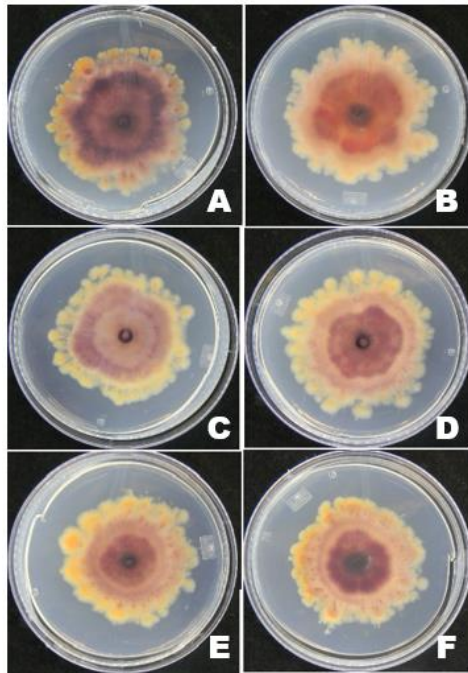


Figura 17. Placas de medio PDA inoculadas con *F. verticillioides*. Se observa en el reverso de la caja el crecimiento radial después de 14 días. **A**, PDA; **B**, EtOH 0.5%; **C**, AF 0.25 mM; **D**, AF 0.5 mM; **E**, AF 0.75 mM y **F**, AF 1mM.

Los datos de la medición del diámetro de las colonias se resumen en la figura 18; a estas concentraciones se observó que el AF tuvo un menor efecto sobre el crecimiento radial. A los 7 días las concentraciones de 0.75 y 1 mM presentaron una inhibición del crecimiento radial del 24% mientras que la concentración de 0.5 mM mostró una inhibición del 20% y a 0.25 mM una inhibición del 12% respecto al control con EtOH 0.1%; a los 15 días el efecto del AF a concentraciones de 0.75 y 1 mM presentó una inhibición del 8 y 12% respectivamente mientras que a una concentración de 0.5 mM fue del 3.5% y a 0.25 mM del 5%.

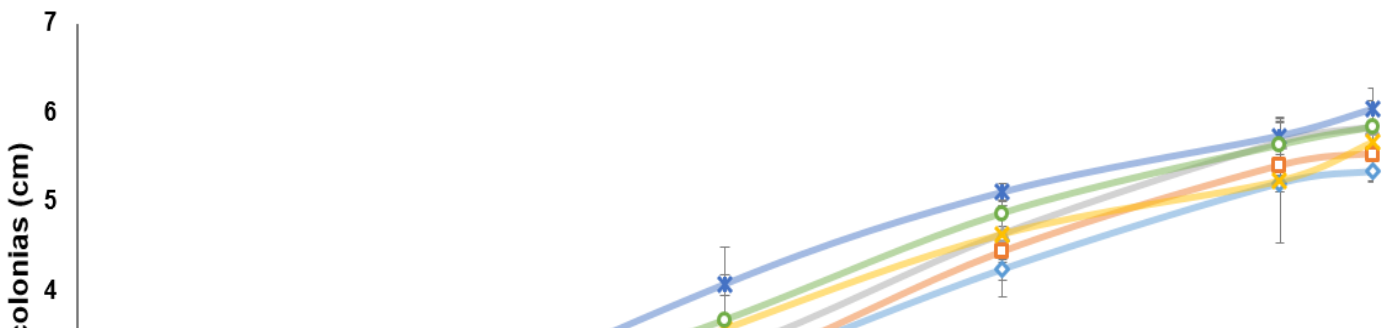


Figura 18. El efecto inhibitorio en el crecimiento radial fue menor al disminuir las concentraciones de ácido ferúlico. La cepa MY3 de *F. verticillioides* se creció en placas de PDA suplementadas con concentraciones crecientes de AF (0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM) por triplicado. Se midió el crecimiento radial desde los 3 días.

A pesar de que a estas concentraciones el efecto sobre el crecimiento radial fue marginal, todavía se observó inhibición con las dos concentraciones más bajas (0.25 y 0.5 mM) encontrando que aún hay diferencia significativa en el crecimiento radial respecto al control con disolvente (EtOH al 0.5%) a los 7 días de incubación ($p < 0.05$; prueba de Tukey). A los 14 días, hay recuperación en el crecimiento radial de *F. verticillioides* incubado con AF, y no encontramos diferencias significativas (Fig. 19; $p < 0.05$, prueba de Tukey) respecto al control de EtOH al 0.5%.

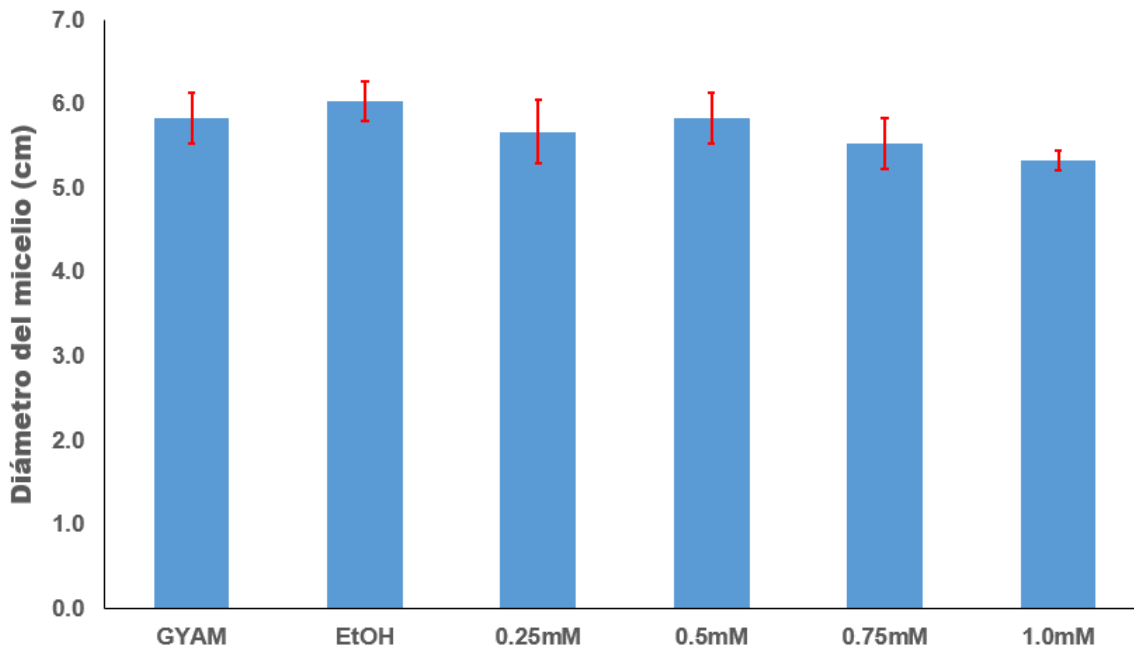


Figura 19. No hay diferencia significativa en el diámetro de cada tratamiento al final del periodo de incubación. Efecto del ácido ferúlico (día 14 de incubación) sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* en medio PDA suplementado a distintas concentraciones. Los datos se analizaron por ANOVA de una vía y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$; $n = 3$).

Para evitar que los efectos del AF sobre el crecimiento radial a los 7 días de incubación interfirieran con su actividad sobre la expresión de los genes *FUM* y la producción de FB1, decidimos disminuir las concentraciones a utilizar de AF a 0.05 mM y 0.1 mM. Para estas concentraciones solamente se determinó el peso fresco del micelio como parámetro de crecimiento.

Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 de *F. verticillioides*

Para estudiar el efecto del AF sobre la producción de FB1 y expresión de los genes *FUM*, se empleó el medio GYAM que fue inoculado con 5×10^4 conidias de *F. verticillioides* e incubado por 7 días. A estas concentraciones de AF (0.05 y 0.1mM) el crecimiento del hongo no fue inhibido (Figura 18), según se determinó por el peso fresco del micelio (Figura 20) En ensayos previos se observó que el crecimiento del hongo en el medio ya no variaba a mayor tiempo de incubación (12-14 días) pero la edad del tejido fue determinante para la cuantificación de FB1.

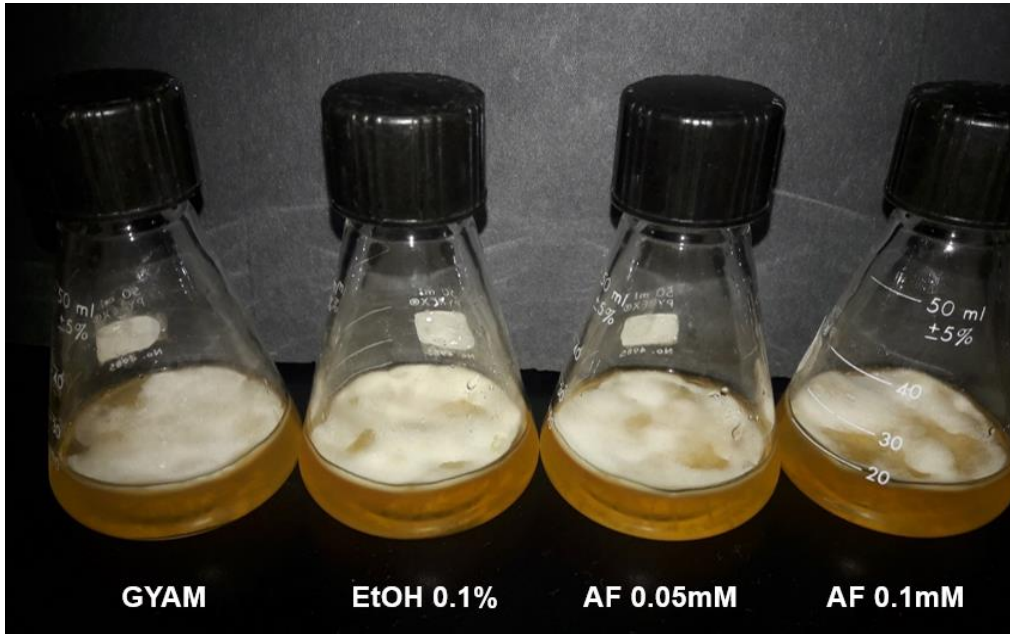


Figura 20. *Fusarium verticillioides* en medio GYAM incubado por 7 días. Cada tratamiento y control con disolvente fue suplementado con un pulso extra de ácido ferúlico y EtOH respectivamente a la misma concentración utilizada para cada tratamiento a mitad del tiempo de incubación correspondiente.

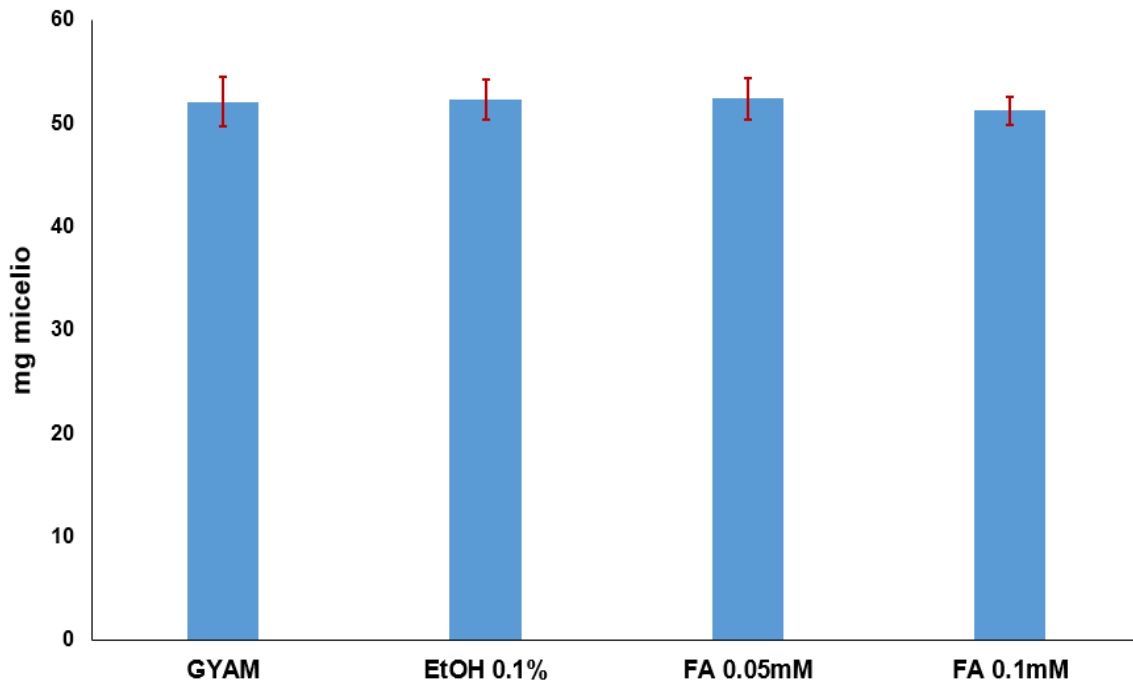


Figura 21. El ácido ferúlico no afecta el crecimiento de *F. verticillioides* en el medio GYAM. Peso seco promedio del micelio de *F. verticillioides*. El micelio fue incubado por 7 días, filtrado y secado para obtener el peso seco de cada replica (n=6) y cada tratamiento. Los resultados se analizaron por ANOVA de un vía y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La figura 21 presenta el promedio de mg de peso seco de micelio a los 7 días de incubación en respuesta a los distintos tratamientos. Se observa que no existe variación significativa entre el peso promedio de cada grupo (ANOVA una vía, prueba de Tukey $p < 0.05$). Este experimento fue utilizado para la cuantificación de FB1 al no encontrar efecto sobre el desarrollo del micelio a las concentraciones de 0.05 y 0.1 mM.

La cuantificación de FB1 en medio GYAM se realizó mediante una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) fase reversa a partir de un derivado fluorescente entre FB1-OPA (*o*-ftaldialdehído). Se construyó una curva de calibración con distintas diluciones a partir de una solución estándar de FB1 1mM como se muestra en el apéndice.

La tabla 12 muestra los resultados del experimento en el que se evaluaron los efectos del AF sobre la producción de FB1. Se observa que el disolvente (EtOH al 0.1%) indujo la producción de FB1 (incremento de 64.5%) con respecto al medio GYAM solo. Asimismo, el AF reprimió la síntesis de FB1 pues a una concentración de 0.05 mM los niveles de FB1 resultaron de 55% respecto a los niveles del control de etanol. Con el tratamiento de AF (0.1 mM) se pudo detectar FB1 pero los niveles fueron inferiores a los límites de cuantificación del método que es de 241.4 pg/mg de micelio.

Tabla 12. Efecto del AF sobre la producción de FB1 en *F. verticillioides*. Promedio (n=6) de pg de FB1 producida por mg de micelio de *F. verticillioides*; la FB1 fue cuantificada a partir de medio GYAM, se muestra el efecto que tiene el AF sobre su producción.

pg FB1/mg micelio			
GYAM	EtOH (0.1%)	FA (0.05 mM)	FA (0.1 mM)
1002.5 ± 109.8	1648.8 ± 81.4	890.4 ± 62.3	< 200

Efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* de la biosíntesis de FB1.

Extracción de RNA total de micelio de *F. verticillioides*.

Se buscó asociar el efecto del ácido ferúlico en la producción de FB1 con la expresión del gen *FUM1*, que codifica la policétido sintasa encargada de la elongación de la cadena de carbonos de la molécula de FB1 y *FUM8*, que codifica para una aminotransferasa que acarrea el grupo amino de la alanina a la posición C-2 de la molécula; ambos genes son esenciales para la biosíntesis de fumonisinas ya que participan en las primeras etapas de la formación de la micotoxina.

Los niveles de los transcritos de *FUM1* y *FUM8* se evaluaron mediante la técnica de RT-PCR, para lo cual fue necesario realizar la extracción de RNA total de *F. verticillioides* a partir de micelio incubado por 5 o 7 días en medio GYAM. En ensayos previos se realizó la extracción de RNA total de hongo incubado por 10 y 14 días, sin embargo, se obtuvo RNA total con un alto grado de degradación, posiblemente debido a la edad del micelio (Figura 25 anexo de resultados).

Para prevenir la degradación del RNA, se hicieron ajustes al protocolo de extracción y se cosechó el micelio a los 5 días post inoculación. En la figura 22 se muestra un

gel de agarosa al 2.5% que muestra la integridad del RNA total aislado. Se observan las bandas que corresponden a los RNAr 28S y 18S, además de otras bandas con menor migración. Estas últimas no corresponden a DNA genómico pues éste tiene una migración más lenta (Fig. 22, carril 1).

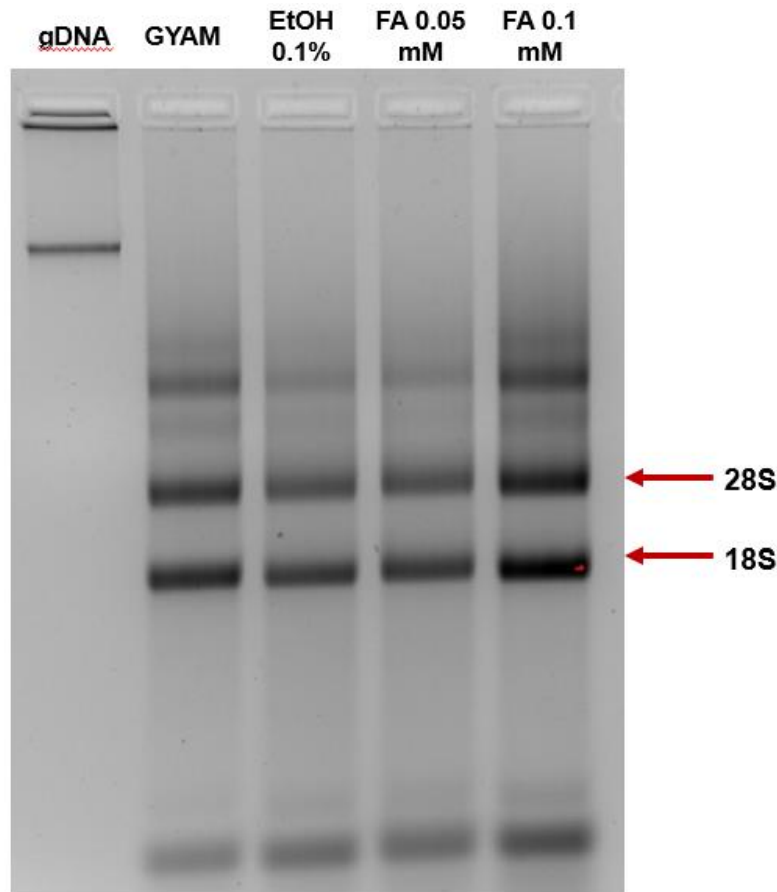


Figura 22. Análisis de la Integridad del RNA total aislado de micelio de *F. verticillioides* incubado con los distintos tratamientos. El RNA total se extrajo del micelio de *F. verticillioides* incubado por 5 días con los tratamientos indicados y se resolvió en un gel de agarosa (2.5%). En el primer carril se corrió DNA genómico extraído del micelio de un cultivo axénico de *F. verticillioides* crecido en medio GYAM.

Evaluación de los transcritos de *FUM1* y *FUM8*

Para evaluar los niveles de transcrito de cada gen se realizó una RT-PCR semicuantitativo, y se empleó el transcrito de β -tubulina como un control de referencia ya que este gen se expresa de forma constitutiva. Las condiciones de amplificación se establecieron mediante un barrido de ciclos para los tres genes

(Figuras 27, 28 y 29 ANEXO). La figura 23 presenta geles representativos en los que se separaron los amplicones de cDNAs de los genes *FUM1* (354 pb), *FUM8* (287 pb) y *TUB* (233 pb). Se observa que ninguno de los tratamientos afectó los niveles de transcrito del gen *TUB* por lo que resulta un control adecuado de normalización. Se observó que el disolvente (EtOH al 0.1%) reprimió la expresión de los genes *FUM* con respecto al control de GYAM. Sin embargo, el tratamiento con AF causó una reducción clara en los niveles de transcrito de los genes *FUM1* y *FUM8*. Esto es particularmente notable a la concentración de AF 0.1 mM en que hubo reducción en la intensidad de la banda de *FUM8* y la de *FUM1* fue casi imperceptible.

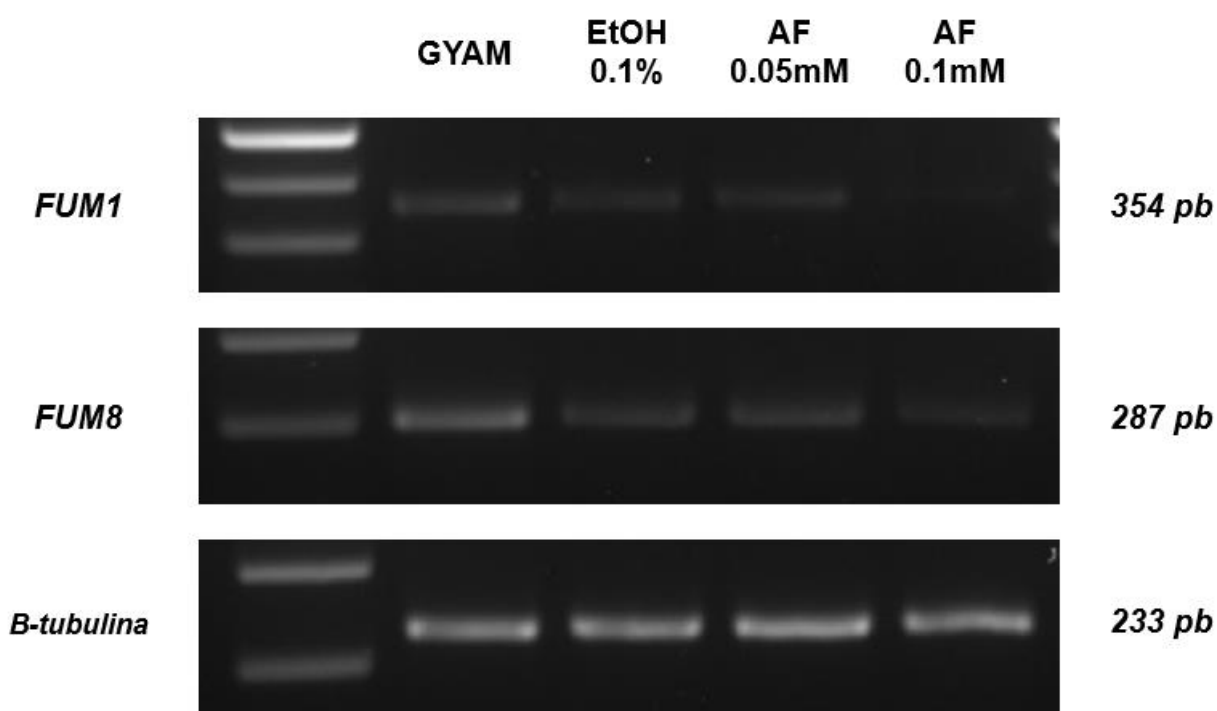


Figura 23. Niveles de transcrito de los genes *FUM1* y *FUM8*. Las muestras fueron incubadas por 5 días con distintos tratamientos. Los cDNAs se obtuvieron por RT-PCR a partir de RNA total de *Fusarium verticillioides* y se separaron en un un gel de agarosa (3.0%).

Para obtener datos cuantitativos de la intensidad de las bandas, se hizo un análisis densitométrico de éstas. En la figura 23 se puede apreciar que los niveles del transcrito de *FUM1* son menores en los tratamientos con AF 0.05 y 0.1 mM; a la

concentración de 0.05 mM hay una disminución del 15.0% en los niveles del transcrito respecto al control con solvente de EtOH al 0.1%, y a la concentración de 0.1mM de AF se observa una disminución de una 25% respecto al solvente.

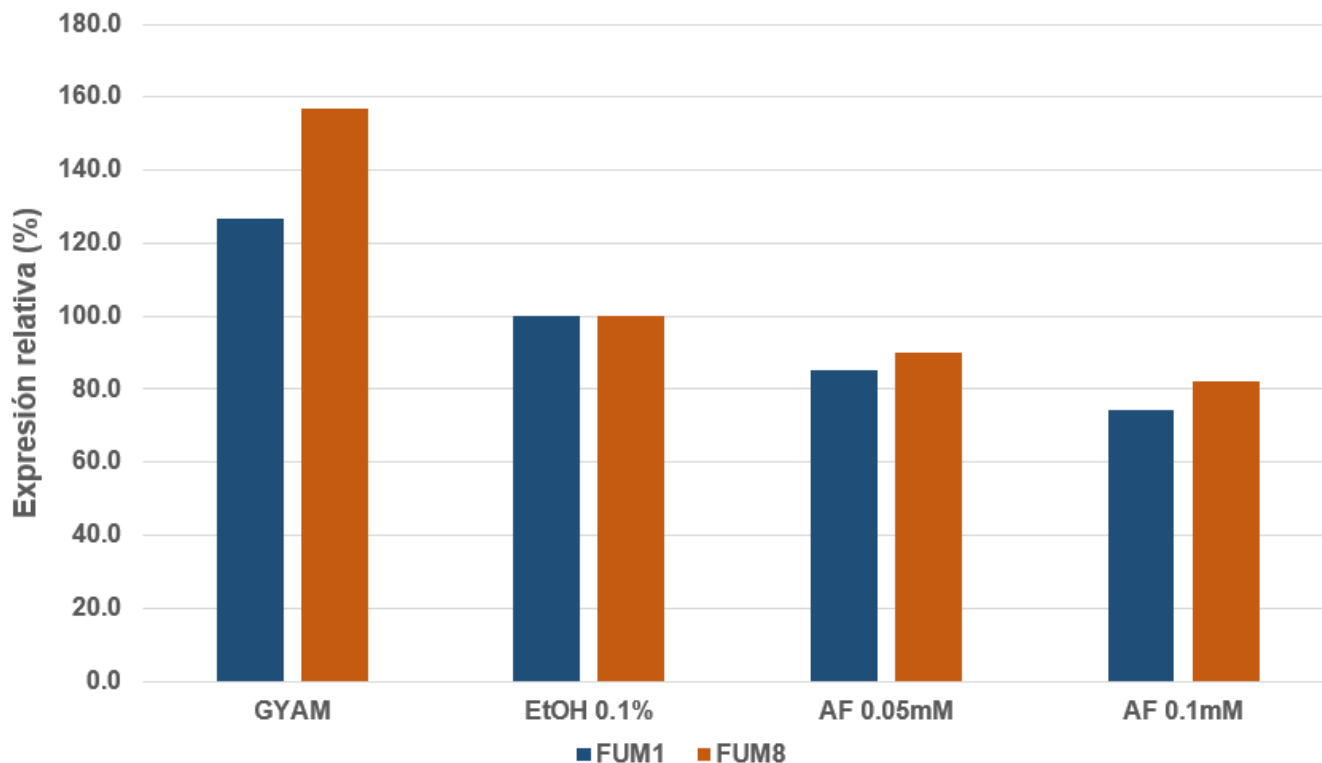


Figura 24. Análisis densitométrico del efecto del AF sobre los niveles de expresión de los transcritos *FUM1* y *FUM8* en *F. verticillioides*. Los niveles del transcrito *TUB* se emplearon para la normalización de los datos.

La figura 24 muestra que el efecto que tiene el ácido ferúlico sobre la expresión del gen *FUM8* es relativamente menor respecto al efecto producido sobre *FUM1* pues a la concentración de 0.05 mM ocurrió una reducción del 10% en los niveles del transcrito con respecto al control (EtOH 0.1%). A la concentración de 0.1mM de AF la disminución en la expresión del transcrito se ve reducida hasta en un 18% respecto al control.

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo se establecieron concentraciones subletales de ácido ferúlico que permitieron estudiar su efecto en un modelo *in vitro* sobre la producción de fumonisina B1 y la expresión de dos genes *FUM* en la cepa MY3 de *F. verticillioides*. Se encontró que el ácido ferúlico reprime de manera moderada (15%-18%) la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8*, lo que repercute en una inhibición (>50%) en la biosíntesis de fumonisina B1.

Los resultados de la producción de FB1 estarían asociados con lo observado al analizar el efecto sobre la expresión de los transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8* participantes de la ruta biosintética de la micotoxina. Se observó que hay una inhibición respecto a los controles de disolvente debido a que presentaron una disminución en su expresión de 10 y 18%, respectivamente a las concentraciones de 0.05 y 0.1 mM de AF.

El efecto de los ácidos fenólicos sobre el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas se ha estudiado en otros géneros y especies. En especies del género *Aspergillus* la exposición a ácido ferúlico a una concentración de 1 mM causa la disminución de hasta un 50% en la producción de aflatoxinas, además de afectar su desarrollo hasta en un 30% (Holmes et al. 2008). Esto muy similar a lo obtenido en nuestros experimentos de crecimiento radial ya que el desarrollo de *F. verticillioides* en un medio con AF a concentraciones de 0.75 y 1mM presentó cerca de un 24% en la disminución de su desarrollo. En otros estudios se evaluó el efecto de distintos compuestos fenólicos a distintas concentraciones sobre el desarrollo de *Aspergillus*; mientras que a concentraciones altas (1 y 5 mM) de ácido salicílico no inhiben el crecimiento fúngico, el timol y ácido cinámico a estas concentraciones provocan una inhibición del 70 y 50% respectivamente (Kim et al. 2006).

La producción de las micotoxinas depende de la expresión de los genes que codifican moléculas que participan en las rutas biosintéticas. En el presente trabajo se evaluó el efecto sobre dos genes determinantes en la producción de FB1 en *F. verticillioides* al considerarse como los pasos esenciales para la formación de la

micotoxina, la policétido sintasa codificada por *FUM1* y la aminotransferasa codificada por *FUM8*, cuyos productos participan en los primeros pasos de la ruta biosintética, y cuya represión ocasionaría una disminución en los niveles de los transcritos respectivos y por lo tanto una disminución en la producción de FB1. Los genes participantes en estas rutas han sido objeto de estudio en distintas líneas de investigación. No hay datos en la literatura sobre el efecto del AF en la expresión de los genes *FUM*. En este aspecto se han estudiado su efecto sobre la expresión los genes del locus *TRI* (*Tri4*, *Tri5*, *Tri11*, *Tri10* y *Tri12*), responsables de la síntesis de tricotecenos, otro tipo de micotoxinas, producidas por *F. culmorum* y *F. graminearum*. La exposición a ácido ferúlico (0.5 mM) ocasiona una represión considerable de estos genes pues los niveles de transcrito disminuyen entre 50 y 250 veces respecto a los controles (Boutigny et al. 2010).

Asimismo, en *F. culmorum* los niveles de tricotecenos B producidos se ven disminuidos considerablemente en un 68% en presencia de AF (0.1 mM) y un 84% en 0.5 mM (Boutigny et al. 2009 y 2010). La producción de FB1 en *F. verticillioides* en presencia de timol, carvacrol e isoeugenol (compuestos fenólicos) a una concentración de 1 mM de cada compuesto se reduce entre un 88 al 90% (Dambolena et al. 2011). Esta concentración es más elevada que las que empleamos en el presente trabajo y no reportan el efecto sobre la biomasa del hongo. Aquí empleamos una concentración de 0.1 mM que no afectó el crecimiento, determinado por el diámetro de la colonia y el peso del micelio fresco. Sin embargo, encontramos inhibición de aproximadamente 87% en la producción de FB1, pues los niveles fueron menores a 200 pg de FB1/ mg de micelio.

El mecanismo por el cual los compuestos fenólicos reprimen la biosíntesis de las micotoxinas se desconocen. Sin embargo, dada la actividad antioxidante de estas moléculas, es posible que afecten el entorno redox en las células fúngicas y esto conduzca a una reprogramación genética. Dado que hay varios reguladores que regulan la expresión de los genes *FUM* a distintos niveles y que participan en la percepción y señalización de distintas condiciones ambientales, es posible que

alguno(s) de estos sea responsable de mediar los efectos del ácido ferúlico. Por ejemplo, el gen *AREA* (Kim et al. 2008) es responsable de la regulación del metabolismo del nitrógeno y una alteración en su expresión reprime la producción de FB1. Por otro lado, el gen *PAC1* (Flaherty et al. 2003), regulador de los genes *PACC* que afectan la producción de FB1 en respuesta a los cambios de pH.

Se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían participar alterando las vías de transducción de señales de la vía biosintética, por ejemplo sobre la expresión los genes *ZFR1* (Flaherty et al. 2003) y *FUM21* (Picot et al. 2010). Ambos son factores transcripcionales que promueven la expresión de los genes del locus *FUM*, por lo que mutaciones en estos genes afectan la producción de FB1. Otros candidatos son 1) el gen *GBP1* (Shankar et al. 2006) que codifica una proteína G que controla los niveles de expresión de *FUM1* y *FUM8* y 2) CDK's dependientes de ciclinas cuya expresión favorece la producción de la micotoxina (Bluhm et al. 2006; Picot et al. 2010).

Para probar esta hipótesis se puede determinar si el ácido ferúlico induce cambios en los niveles de especies reactivas de oxígeno en el micelio de *F. verticillioides*. Asimismo, una aproximación para definir si alguno de estos genes participa en la modulación de la expresión de los genes *FUM* sería el estudio del efecto del ácido ferúlico sobre los niveles de transcritos de estos reguladores, así como la investigación de la respuesta de cepas mutantes en presencia de ácido ferúlico. Por ejemplo, en *F. graminearum* la expresión de los genes *Tri4*, *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* y *Tri11* aumenta hasta 20 veces en condiciones de estrés oxidativo, y esto se refleja en los niveles de tricotecenos producidos. La adición de antioxidantes como catalasas reprime la activación transcripcional de los genes *TRI* (Ponts et al. 2007)

En este trabajo se establecieron las bases para el estudio *in vitro* de los efectos de ácidos fenólicos sobre la expresión de los genes *FUM* y su efecto en la biosíntesis de fumonisina B1. Este estudio se puede extender a investigación de un modelo *in planta* debido a que el ácido ferúlico es un componente abundante en la pared

celular de células vegetales y en particular en el pericarpio de las semilla de maíz. Cerca del 78% del total de compuestos fenólicos presentes en el pericarpio corresponde a ácido ferúlico, seguido del ácido *p*-cumárico que representa cerca del 4% del total (Sampietro et al. 2013). Esta estructura representa la primera barrera física que debe atravesar el hongo para colonizar la semilla de maíz por lo que el ácido ferúlico podría tener un papel fundamental en la resistencia a la infección y producción de fumonisina. Estas preguntas se podrán abordar ya que contamos en el laboratorio con genotipos de maíz que tienen niveles variables de ácido ferúlico en el intervalo de 4.5 mg/g a 26.3 mg/g.

Los ácidos fenólicos constituyen una defensa estructural preformada, sin embargo, en plantas la composición del tejido y de la pared celular puede ser modificada en respuesta a la infección del patógeno. Uno de los mecanismos de defensa es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por ejemplo la generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como producto de la respuesta de hipersensibilidad (HR) (Ponts et al. 2006), lo cual podría contrarrestar el efecto antioxidante e inhibitorio de los ácidos fenólicos en la biosíntesis de fumonisinas (Picot et al., 2010).

En su conjunto estos resultados indican que la interacción entre la planta y el patógeno se refleja en la activación de mecanismos de defensa de las plantas como respuesta a la infección por *F. verticillioides* y la producción de fumonisina, uno de los factores de virulencia. Este modelo representa un estudio de la comunicación molecular entre el maíz y uno de sus patógenos más relevantes.

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

- Se observó una disminución en los niveles de FB1 producida por la cepa MY3 de *F. verticillioides* en presencia del ácido ferúlico, compuesto fenólico principal

presente en el pericarpio de maíz como mecanismo de defensa sin inhibirse el crecimiento del hongo *in vitro*.

- La expresión de los genes del locus *FUM* (*FUM1* y *FUM8*) fundamentales en la biosíntesis de FB1 es reprimida en presencia de ácido ferúlico aunque a niveles discretos al menos acorde al método utilizado, lo cual se asocia con la disminución de los niveles de FB1 producida por *F. verticillioides*.
- La edad del tejido es determinante para obtener material genético integro que permita el estudio de los transcritos evaluados, esto se ve reflejado en los ensayos de extracción de RNA total de *F. verticillioides*.

Perspectivas

- Evaluar los efectos del ácido ferúlico en los niveles de especies reactivas de oxígeno en el micelio de *F. verticillioides* para determinar si éstos alteran el estado redox celular.
- Realizar experimentos *in planta* para evaluar el efecto del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz con un genotipo ya caracterizado en cuanto a la producción de FB1 y la expresión de los genes *FUM*.
- Evaluar si existe una reprogramación en la expresión de genes reguladores de la biosíntesis de FB1 por el efecto del ácido ferúlico.

Aportaciones técnicas.

La principal limitante que se nos presentó en este trabajo fue mantener la integridad del material genético extraído de *F. verticillioides*. Se realizó la extracción de RNA total del tejido de *F. verticillioides* siguiendo el protocolo ya establecido en el laboratorio para tejidos vegetales, sin embargo el análisis electroforético mostró un

alto grado de degradación del RNA, probablemente por actividades de ribonucleasas.

Para prevenir la degradación se realizaron modificaciones al protocolo de la extracción de RNA total siendo las principales:

- Filtrado y lavado previo del micelio con agua estéril con el fin de limpiar el tejido de agentes superficiales que contribuyeran a la degradación del RNA.
- Durante la pulverización y homogenización es importante mantener el tejido en N₂ líquido constantemente para prevenir la acción de las ribonucleasas presentes que puedan actuar sobre el RNA al lisar las células.
- Trabajar con el micelio de 5 a 7 días de cultivo pues observamos que el RNA del micelio de cultivos mayores a diez días mostró un alto grado de degradación.

IX. 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.
- Adom KK, Liu, RH, 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6182–6187.

- Aguilar Estevez, M. 2011. Efecto de las bases esfingoideas sobre el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y la producción de fumonisinas. Tesis de licenciatura Q.A. Facultad de Química. UNAM.
- Bacon CW, Bennett RM, Hinton DM, Voss KA. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Dis.* 76: 144-148.
- Bacon CW, Marijanovic, DR, Norred, WP & Hinton, DM. 1989. Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2745-2748.
- Bacon CW, Porter, JK, Norred, WP & Leslie, JF. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4039-4043.
- Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E. 2009. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and Mucorales species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* 47: 877-884.
- Beekrum S, Govinden R, Padayachee T & Odhav B. 2003. Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Addit Contam.* 20: 490-493.
- Bily AC, Reid LM, Taylor JH, Johnston D, Malouin C, Burt AJ, Bakan B, Regnault-Roger C, Pauls KP, Arnason JT, Philogène JR, 2003. Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93: 712–719.
- Bluhm BH, Woloshuk CP. 2006. *FcK1*, a C-Type cyclin-dependent kinase, interacts with *Fcc1* to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 43: 146-154.
- 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*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2855-2860.
- Boutigny AL, Atanasova-Penichon VM, Barreau C & Richard-Forget F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing *Tri* gene expression. *Eur J Plant Pathol.* 127: 275-286.

- Boutigny AL, Barreau C, Atanasova-Penichon V, Verdal-Bonnin MN, Pinson-Gadais L & Richard-Forget F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol Res.* 113: 746-753.
- Bressani R. 1990. Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev. Int.* 6: 225-264.
- Brown DW, Butchko, R.A., Busman, M. & Proctor, R.H. 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.
- Cooper KF & Strich R. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* C-Type Cyclin Ume3p/Srb11p Is Required for Efficient Induction and Execution of Meiotic Development. *Eukaryot Cell.* 1 (1): 66-74.
- Dambolena JS, Zygadlo JA and Rubinstein HR. 2011. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds. A structure–property–activity relationship study. *Int. J. Food Microbiol.* 145: 140-146.
- Das AK & Singh V. 2015. Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *J. Func. Foods.* 13: 363-374.
- de la Torre Hernández ME, Vicente MR, Greaves-Fernández N, Cruz-Ortega R & Plasencia J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Phys. Mol. Plant Path.* 74: 337-345.
- de la Torre-Hernández M.E., Sánchez-Rangel D, Galeana-Sánchez E & Plasencia-de la Parra J. 2014. Fumonisin -Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 17: 77-91.
- Desjardins AE, Proctor RH 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 47-50.
- Desjardins AE, Proctor RH. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. en: *Fusarium*. Summerell. Editorial: APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 22-137.
- Desjardins AE. 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics and biology, American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Dixon RA & Paiva NL. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7: 1085-1097.

- Edwards SG, O'Callaghan J and Dobson A. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycol. Res.* 106: 1005-1025.
- 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.
- Ferreira, R, Monteiro S, Freitas R, Santos C, Chen Z, Batista L, Duarte J, Borges A & Teixeira A. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 8: 677-700.
- Ferrochio L, Cendoya E, Farnochi MC, Massad W and Rairez ML. 2013. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *Int. J. Food Microbiol.* 167: 215-220.
- Flaherty JE, Pirtittlâ A, Bluhm H, Woloshuk P. 2003. *PAC1*, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5222-5227.
- Fraga CG. 2010. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. Wiley. New Jersey. 593.
- Frisvard J, Smedgard J, Samson R, Larsen T, Thrane U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9727-9732.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez Nieto S, Plasencia J y Gavilanes-Ruiz M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant.* 221:589-596.
- Hanlin, RT. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. APS Press. 202-203.
- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE and Cole JR Jr. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet Diagn Invest* 2:217-221.
- Herrmann KM. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Hoenisch RW, and Davis RM. 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot. *Plant Dis.* 78:517-519.
- Holmes RA, Boston RS, Payne GA, 2008. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 559–572.
- Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ, 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study

- using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Persp.* 109 (Suppl. 2): 277-282.
- Huffman J, Gerber R & Du L. 2010. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 93: 764-776.
- Jouany JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Sci. Technol.* 137: 342-362.
- Kâhkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS & Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- 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.
- Kim JH, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ & Campbell BC. 2006. Controlling food-contaminating fungi by targeting their antioxidative stress-response system with natural phenolic compounds. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 70: 735-739.
- Lam E, Kato N, Lawton M. 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature.* 411: 848-853.
- Landry LG, Champple CCS & Last RL. 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* 109: 1159-1166.
- Leslie JF. 1996. Introductory biology of *Fusarium moliniforme*. Fumonisin in food. Plenum Press New York. pp 153-164.
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson G & last RL. 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hyper-sensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.
- Magan N, Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 119: 131-139.
- Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology. The Pennsylvania State. University Press: University Park. PA.
- Marasas, WFO. 1996. Fumonisin: History, world-wide occurrence and impact. In *Fumonisin in Food* (L. S. Jackson, J. W. DeVries, and L. B. Bullerman, Eds.), pp. 1–17. Plenum, New York.
- Marín S, Magan N, Bellón, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V. 1999. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium*

- proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol.* 51: 159-67.
- Merrill AH, Schmelz EM, Dillehay DL, Spiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA & Want E. 1997. Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 142: 208-225.
- Merrill Jr AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Persp.* 109 (Suppl. 2), 283–289.
- Miller JD. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. *J Stored Prod. Res.* 31:1-16.
- Montis V, Pasqualo M, Visentin I, Karlovsky P & Cardinale F. 2013. Identification of a cis-acting factor modulating the transcription of FUM1, a key fumonisina-biosynthetic gene in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 51: 42-49.
- Moss MO, Smith JE. *The applied mycology of Fusarium*. New York: Cambridge University Press; 1984.
- Munkvold, GP, and Desjardins, AE. 1997. Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556-565.
- Myung K, Li S, Butchko RAE et al., 2009. *FvVE1* regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* 57: 5089–5094.
- Myung K, Zitomer NC, Duvall M, Glenn AE, Riley RT & Calvo AM. 2012. The conserved global regulator *VeA* is necessary for symptom production and mycotoxin synthesis in maize seedlings by *Fusarium verticillioides*. *Plant Pathol.* 61:152-160.
- Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, Biology and Clinical aspects of *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 7:479-501.
- Nelson PE, 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117:29-36
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WOF. 1983. *Fusarium* species, An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State. University Press: University Park. PA.

- Nelson PE., Plattner RD, Shackelford DD. and Desjardins AE. (1992). Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 984-989.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BA, Balajee SA, Scroers HJ. 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 48: 3708-3718.
- Ochoa-Alejo N, Gómez-Peralta J. 1993. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum L.*). *J. Plant Physiol.* 141:147-152.
- 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.
- Placinta CM, D'Mello JPF, MacDonald AMC. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Sci. Technol.* 78: 21-37.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Barreau C, Richard-Forget F & Ouellet T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters.* 581: 443-447.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Boutigny AL, Barreau C and Richard-Forget F. 2011. Cinnamic acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and in vitro production of type B trichothecenes. *Phytopathology* 101:929-934.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin MN, Barreau C & Richard-Forget F. 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett.* 258: 102-107.
- Proctor RH, Brown DW, Plattner RD & Desjardins AE. 2003. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38: 237-249.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD & Hohn TM. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27: 100-112.
- 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.

- Rabie, CJ, Marasas, WFO, Thiel, PG, Lübben, A. & Vleggaar, R. 1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 517-521.
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.
- Sampietro DA, Fauguel CM, Vattuone MA, Presello DA & Catalán CAN. 2013. Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Eur. J. Pathol.* 135:105-113.
- Sampietro 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 β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta.* 235: 965-978.
- 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.
- Seigler DS. 1997. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts, USA.
- Seo JA, Proctor RH & Plattner RD. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 34: 155-165.
- Shankar S, Butchko R, Won-Bo S. 2006. The putative G-protein *GBP1* is negatively associated with fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant Pathology.* 7: 381-389.
- Shim WB, Woloshuk CP. 1999. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters.* 177: 109-116.
- Shim WB & Woloshuk CP. 2001. Regulation of Fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-Like (C-Type) gene, FCC1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1607-1612.
- Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WF, Shephard GS, Van Shalkwyk DJ and Koch KR. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low

and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J. Agric. Food Chem. 38: 1900-1903.

Uhlig S, Busman M, Shane DS, Ronning H, Rise F and Proctor R. 2012. Identification of early fumonisin biosynthetic intermediates by inactivation of the *FUM6* gene in *Fusarium verticillioides*. J. Agric. Food Chem. 60: 10293-1030.

Voss KA, Smith GW, Haschek WM. 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. Animal Feed Sci. Technol. 137:299-325.

Xing F, Hua H, Selvaraj JN, Zhao Y, Zhou L; Liu X and Liu Y. 2014. Growth inhibition and morphological alterations of *Fusarium verticillioides* by cinnamon oil and cinnamaldehyde. Food Control. 46: 343-350

Xu JR, Yan K, Dickman B, Leslie JF. 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Giberrella fujikuroi* (*Fusarium* Section *Liseola*). Mol. Plant-Microbe Interact 8:74-84.

Referencias electrónicas

<http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm> consultado por última vez 17-oct.-2016 a las 17:23 hrs.

X. APÉNDICE A (MATERIALES Y MÉTODOS)

A. Preparación del Stock de sales 10X para medio GYAM

Para preparar 100 mL del stock de sales 10X se pesan 1.3 g de cloruro de calcio (CaCl_2) y se disuelven en 60 mL de agua. Se pesaron 766 mg de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) y se disuelven en 30 mL de agua. Una vez disueltas ambas soluciones se mezclan bajo agitación constante. Se añaden 493 mg de sulfato de magnesio (MgSO_4), y se agita hasta disolver. Se añaden 99 mg de cloruro de sodio (NaCl) y 10 mL de agua. Se mezcla bien la solución stock cuya concentración de sales se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Composición de sales en Stock y en medio GYAM.

Compuesto	Concentración en Stock	Concentración en medio GYAM
CaCl ₂	88 mM	8.8 mM
K ₂ HPO ₄	44 mM	4.4 mM
MgSO ₄	20 mM	2.0 mM
NaCl	17 mM	1.7 mM

B. Preparación de la solución de L-asparagina 40 mM

Para preparar 100 mL de solución de *L*-asparagina se pesaron 0.6 g de asparagina, se disolvieron en 100 mL de agua desionizada estéril, se mezcló bien. La solución se filtró a través de una membrana Millipore 0.22µm estéril.

C. Preparación del buffer de fosfatos 50 mM

Para preparar 1 litro de buffer se pesan 6.9 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH₂PO₄•H₂O) y se disuelven en 1 litro de agua. Se ajusta el pH a 3 con 1 mL ácido fosfórico.

D. Preparación de la fase móvil metanol – buffer de fosfatos 50mM (70:30)

Se mezclan 300 mL de buffer de fosfatos y 700 mL de metanol grado HPLC, con agitación constante se añaden 3 mL de ácido fosfórico, y se verifica el pH = 3. Una vez que esté bien mezclada la fase móvil se filtra a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm y se sonica por 20 min antes de usar.

E. Preparación de buffer de boratos 50 mM, pH 9.7

Se pesa 1.9 g de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y se disuelven en 89 mL de agua. Se ajustó a pH a 9.7 con NaOH 1M y se afora a 100 mL.

F. Preparación del stock de OPA 7.45 mM (o-ftaldialdehído)

Se pesan 2 mg de OPA y se disuelven en 400 μL de metanol grado HPLC. Se diluye con 2 mL de buffer de boratos 50 mM pH 9.7 y se añaden 3 μL de β -mercaptoetanol. Se mezcla bien la solución en vórtex y se almacena a 4°C. El stock se debe utilizar el mismo día de la preparación.

G. Preparación de los estándares de FB1 con OPA

Tabla 14. Preparación de los estándares de FB1 para la curva de calibración

Estándar	Muestra (μL)	OPA (μL)	ACN:H ₂ O (1:1) μL	Picogramos de FB1 en los 20 μL
Blanco	10 ACN:H ₂ O	25	465	0
9 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10	25	465	18
18 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10	25	465	36
36 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10	25	465	72
54 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10	25	465	108

72 µg/mL	10	25	465	144
----------	----	----	-----	-----

H. Preparación del buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) 50x

Para preparar 100 mL de TAE 50X se pesaron 24.2 g de TRIS SIGMA BASE y 3.7 g de ácido etilendiaminotetraacético dihidratado de sodio ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se disolvieron en 50 mL de agua. Se añadieron 5.7 mL de ácido acético glacial y 5.5 mL de HCl concentrado hasta tener un pH final de 8.0. Se aforó a 100 mL con agua.

APENDICE B. (RESULTADOS)

I. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5%

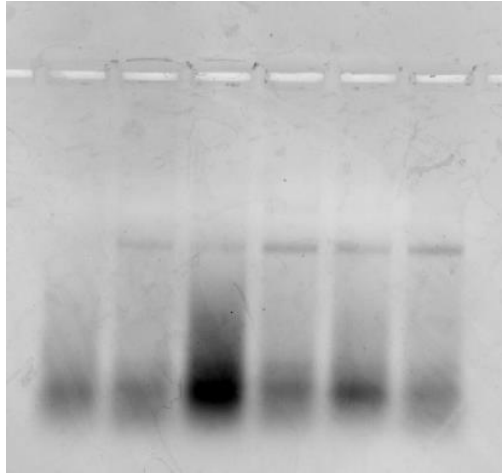


Figura 25. Análisis de la integridad de RNA total de micelio de *F. verticillioides* incubado 14 días. Se observa en el gel de agarosa que el RNA producto de la extracción se encuentra totalmente degradado, se presentó una pérdida en su integridad debido a la edad del tejido.

J. Gel de agarosa al 2.5% de extracción de RNA

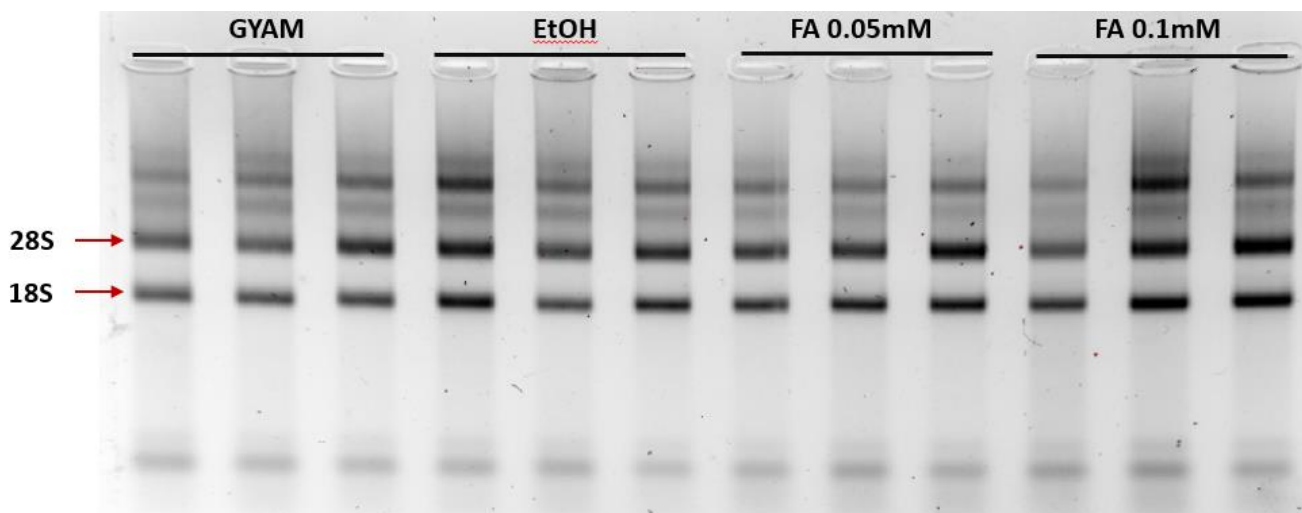


Figura 26. Análisis de la integridad del RNA total aislado de micelio de *F. verticillioides* incubado 7 días con los distintos tratamientos. El RNA total se extrajo del micelio de *F. verticillioides* incubado por 5 días con los tratamientos indicados y se resolvió en un gel de agarosa (2.5%).

K. Gel de agarosa al 3% de RT-PCR con control negativo

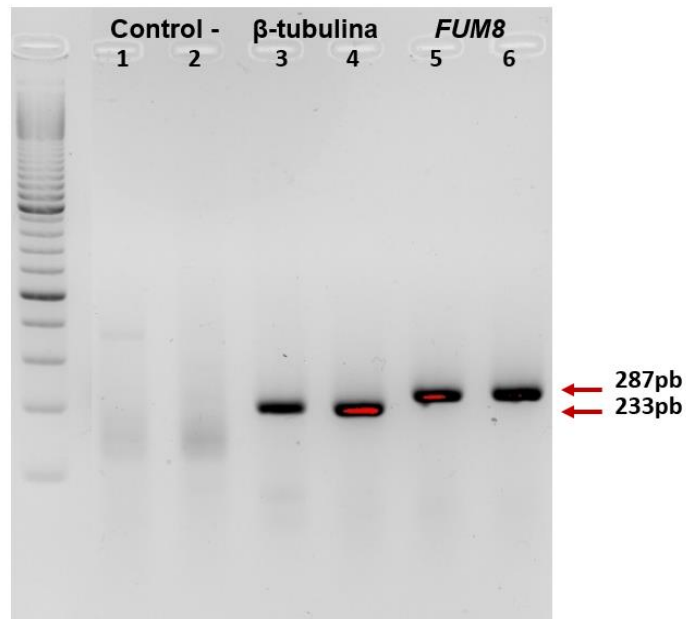


Figura 27. Electroforesis de los productos de RT-PCR a partir de cDNA de *F. verticillioides*. 1-2: Control negativo de la reacción sin la enzima transcriptasa reversa observando que no hay productos de PCR, por lo tanto no hay contaminación de DNA genómico en las muestras de RNA total. 3-4 y 5-6: Productos de PCR de transcritos de tubulina y FUM8.

L. Gel de agarosa al 3% de productos de PCR a partir de DNA genómico

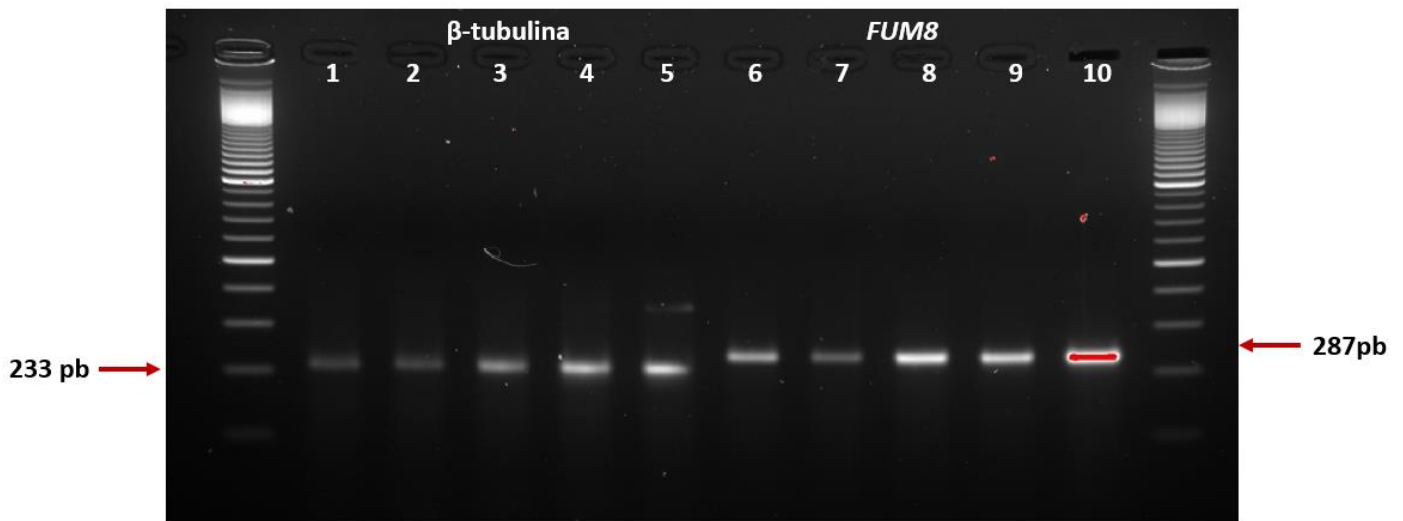


Figura 28. Productos de amplificación por PCR de genes de tubulina y *FUM8* a partir de DNA genómico. 1-5: Amplificaciones del gen de tubulina. 6-10: Amplificaciones del gen *FUM8*.

M. Gráficas de curva de calibración de ciclos para los transcritos de β -tubulina, *FUM1* y *FUM8*.

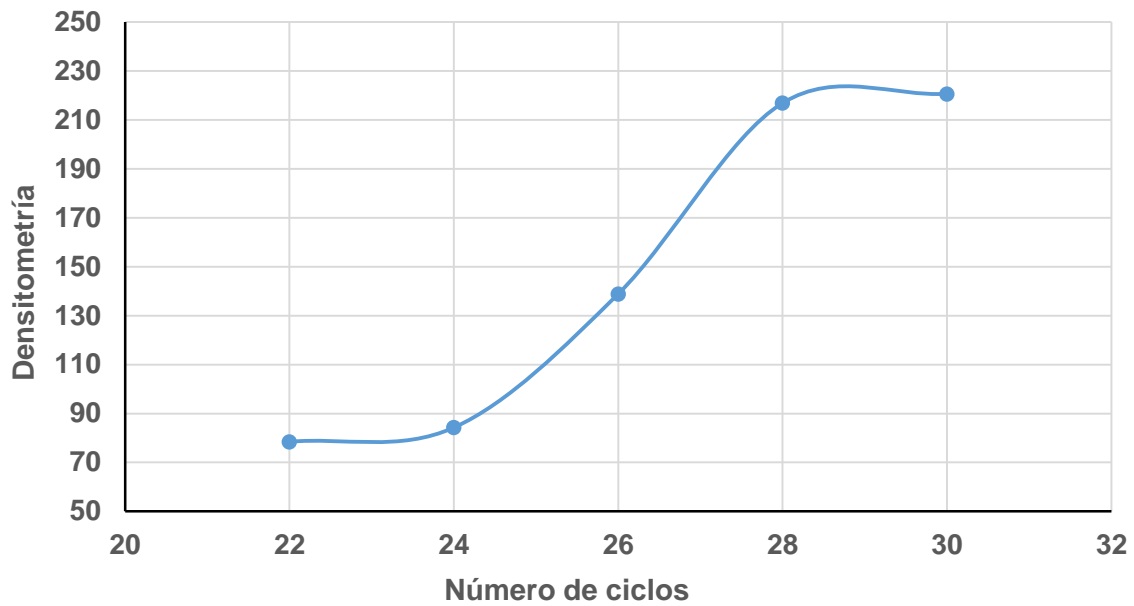


Figura 29. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de β -tubulina. La parte lineal se encuentra entre los 26 y 28 ciclos.

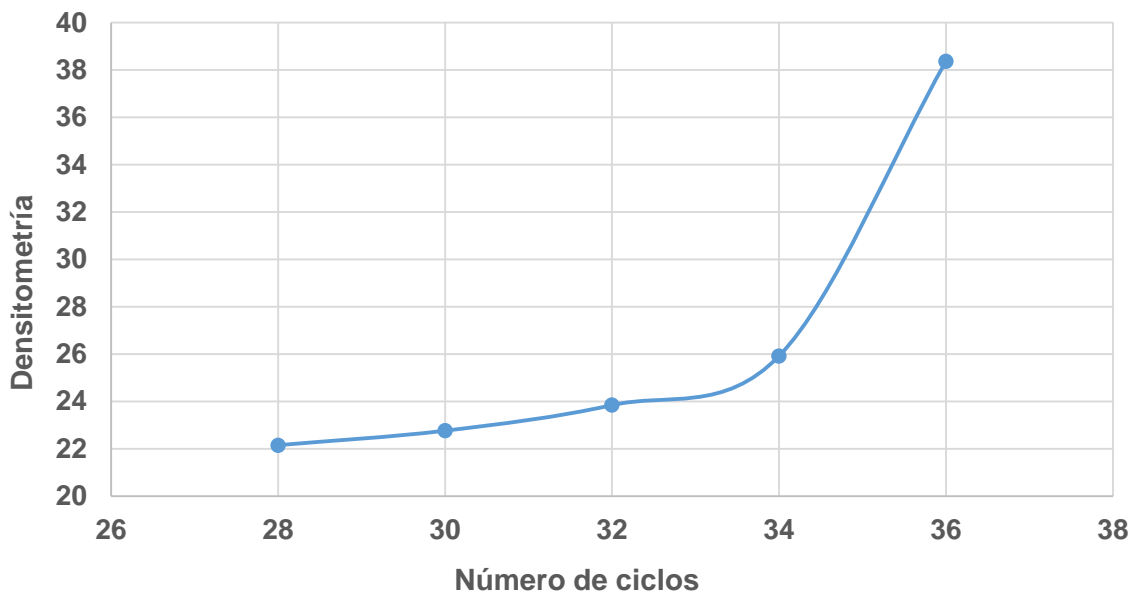


Figura 30. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de *FUM1*. La parte lineal se encuentra entre los 34 y 36 ciclos.

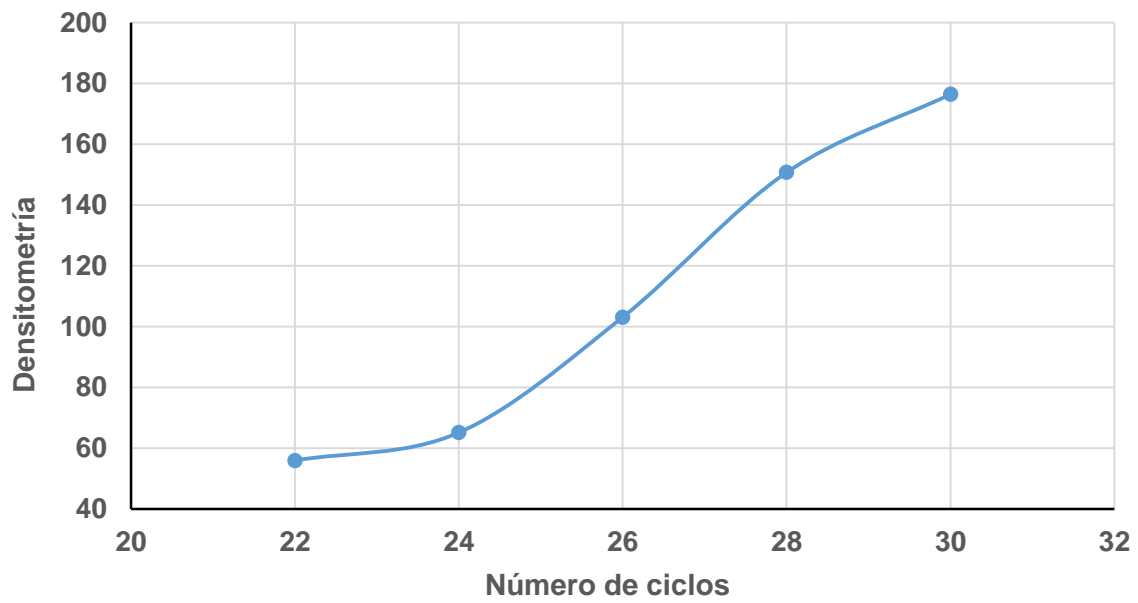


Figura 31. Curva de calibración del número de ciclos para el transcrito de *FUM8*. La parte lineal se encuentra entre los 26 y 28 ciclos.