



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: Caracterización de las β -1,3-glucanasas
de maíz sensibles a inhibición por la micotoxina
fumonisina B1.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

Pamela Viridiana Ramos Villegas



CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:	Profesor: Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL:	Profesor: Sobeida Sánchez Nieto
SECRETARIO:	Profesor: Javier Plasencia de la Parra
1er. SUPLENTE:	Profesor: José Pedraza Chaverri
2° SUPLENTE:	Profesor: Sara Margarita Garza Aguilar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

LABORATORIO 101, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**CON EL APOYO DEL PROYECTO DGAPA-PAPIIT IN213517,
COMUNICACIÓN MOLECULAR EN LA INTERACCIÓN *FUSARIUM*
VERTICILLIOIDES – MAÍZ.**

ASESOR DEL TEMA:

Francisco Javier Plasencia de la Parra

SUSTENTANTE:

Pamela Viridiana Ramos Villegas

Agradecimientos

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IN213517 “Comunicación molecular en la interacción *Fusarium verticillioides* – maíz”.

Pamela Viridiana Ramos Villegas recibió una beca (conclusión de estudios) y una beca (tesis) del proyecto DGAPA-PAPIIT IN213517 durante el desarrollo de este trabajo.

Se agradece a la Dra. Carmina Montiel Pacheco y al M.C. Jonathan Trapala Reyna, Depto. de Alimentos y Biotecnología, por su asesoría técnica y en el entrenamiento y uso del equipo de FPLC.

Se agradece a la M.C. Manuela Nájera Martínez, Depto. de Bioquímica, por la asesoría en las técnicas bioquímicas empleadas en este trabajo.

ÍNDICE

i Abreviaturas	0
ii Índice de figuras	2
iii Índice de tablas	7
I. Resumen	8
II. Introducción	9
A. <i>Fusarium verticillioides</i> como patógeno de maíz	9
1. Taxonomía de <i>F. verticillioides</i> y características generales (morfología, producción de micotoxinas)	11
2. Colonización de tejidos de maíz por <i>F. verticillioides</i>	19
3. Enfermedades causadas por <i>F. verticillioides</i> en maíz.....	21
B. Fumonisin s.....	22
1. Diversidad química de las fumonisins	23
2. Biosíntesis de fumonisins	24
3. Actividad biológica de las fumonisins en maíz	27
C. Respuesta de defensa en plantas	32
1. Reconocimiento de PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a la Patogénesis) e inducción de la defensa	32
2. Proteínas relacionadas con la patogénesis	34
3. Hidrolasas de glucanos: quitinasas y glucanasas	35
4. β -1,3-glucanasas y su función en la defensa	40
D. Antecedentes inmediatos	43
III. Hipótesis	44
IV. Objetivos generales y particulares	44
V. Materiales y métodos	45
A. Material biológico: cultivo de <i>Fusarium verticillioides</i>	45
1. Preparación de medio de cultivo para cepas de <i>F. verticillioides</i>	45
2. Crecimiento de cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	45
3. Conteo de conidios y preparación de la suspensión.....	45

B. Material biológico: embriones de maíz embebidos	46
1. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz	46
2. Preparación de medio de cultivo para embriones	46
3. Inoculación de embriones con las cepas de <i>F. verticillioides</i>	46
C. Técnicas bioquímicas: extracción de proteínas y ensayo de actividad para β-1,3-glucanasas	46
1. Extracción de proteínas totales de los embriones de maíz	46
2. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford	47
3. Electroforesis de proteínas	47
4. Electroforesis nativa para observar la actividad de β -1,3-glucanasas en gel	47
5. Ensayo de la actividad de β -1,3-glucanasas en gel nativo	47
6. Determinación de la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas, mediante método espectrofotométrico A.	48
7. Determinación de la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas, mediante método espectrofotométrico B.	48
8. Ensayo para detección de azúcares reductores con DNS en placa	49
9. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 1)	49
10. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 2).....	50
11. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 3).....	50
D. Técnicas bioquímicas: Purificación y caracterización de las β-1,3 glucanasas.....	51
1. Fraccionamiento con sulfato de amonio	51
2. Ultrafiltración	51
3. Cromatografía de Intercambio Iónico	51
4. Cromatografía de exclusión molecular	52
5. Precipitación de proteínas con acetona	52
E. Ensayos de actividad antifúngica de las β-1,3-glucanasas de maíz.....	52
1. Experimento del efecto de extracto de proteína de maíz en discos durante el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en agar PDA.....	52
2. Experimento en placa del efecto de extracto/fracción de proteína de maíz y/o FB1 en el crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en medio Czapeck modificado	53
VI. Resultados	56

A. Purificación de las β-1,3-glucanasas	56
1. Actividad en extracto crudo	56
2. Determinación de la concentración de sulfato de amonio para precipitar la actividad de β -1-3-glucanasas a partir de extractos crudos de proteína.....	56
3. Separación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico	57
4. Análisis de las fracciones purificadas provenientes de cromatografía de intercambio iónico; Tabla de Purificación.	59
5. Separación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular.....	60
6. Análisis de las fracciones purificadas provenientes de cromatografía de exclusión molecular; Tablas de Purificación.	61
7. Análisis de las fracciones purificadas por electroforesis en geles SDS.....	63
8. Detección de las β -glucanasas mediante geles nativos de Actividad	66
B. Caracterización bioquímica de las fracciones purificadas	68
1. Efecto de la temperatura	68
2. Efecto del pH.....	69
3. Efecto del tiempo.....	70
4. Efecto de la fumonisina B1	71
C. Actividad antifúngica de las β-1,3-glucanasas	73
1. Ensayos en medio líquido en placa multipozos	73
2. Ensayos en medio sólido en caja de Petri	78
VII. Discusión	82
1. Purificación de β-1,3-glucanasas de embriones de maíz	82
2. Propiedades bioquímicas de las glucanasas de maíz	83
3. Papel de las glucanasas en la defensa de las plantas vs microorganismos patógenos	84
VIII. Conclusiones y perspectivas	86
IX. Referencias	87
X. Apéndice	93
A. Materiales y Métodos	93
1. Amortiguador de extracción de proteínas I	93

2. Gel de electroforesis	93
3. Gel separador (Acrilamida 12%).....	93
4. Gel apilador	94
5. Gel separador (Acrilamida 10%).....	94
6. Componentes cuantificación de proteína por Bradford	94
7. Componentes del amortiguador de carga desnaturizante y nativo.....	94
8. Componentes del amortiguador de electrodos	95
9. Componentes del amortiguador del gel separador y amortiguador del gel separador para gel nativo.....	95
10. Componentes del amortiguador del gel apilador y amortiguador del gel apilador para gel nativo	95
11. Solución fijadora/desteñidora.....	95
12. Solución teñidora.....	95
13. Medio Czapek modificado	96
14. Fundamento de la actividad espectrofotométrica de la actividad de β -glucanasas.	96
15. Reactivo DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico, por sus siglas en inglés).....	96
16. Fundamento de la medición de azúcares reductores con DNS	96
17. Curva patrón de glucosa	97
B. Resultados adicionales	98
1. Curva patrón de proteínas determinadas por la técnica de Bradford. Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.....	98
2. Curva de glucosa determinada con el método enzimático (Glucose assay reagent /SIGMA).....	98
3. Curva de glucosa determinada con ácido dinitro-salicílico (DNS).	99
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	99
5. Ensayos de renaturalización de geles para ensayo de actividad en gel.....	101

i Abreviaturas

FB1: fumonisina B1

mg: miligramos

µg: microgramos

µL: microlitros

act: actividad

min: minutos

h: horas

°C: grados Celsius

mm: milímetros

con: conidios

FD: factor de dilución

g: gramos

BSA: albúmina sérica bovina

EDTA: Na₂-EDTA; sal disódica del ácido etilendinitro tetraacético; edetato disódico

rpm: revoluciones por minuto (velocidad angular)

SDS: dodecil sulfato de sodio

TEMED: trietilenmelanina; 2,4,6-tris (1-azidinil)-5-triazina

V: volt

NBT: azul de tetrazolio

PDA: agar papa dextrosa

PAGE: Gel de electroforesis de poliacrilamida

ERO: especies reactivas de oxígeno

RP: respuesta a patógenos, liberadas por patógenos, relacionadas con la patogenicidad

NAD(P)H: nicotinamida-adenina-dinucleótido-(fosfato)

NCBI: centro nacional de información biotecnológica (por sus siglas en inglés: National Center for Biotechnology Information)

kDa: kilo Dalton

Da: Dalton

FDA: administración de alimentos y medicamentos (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization)

pI: punto isoelectrico

pH= -logaritmo de la concentración de hidrógeno

a_w: actividad de agua (water activity)

hpi: horas post-inoculación

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a la Patogénesis (por sus siglas en inglés: Pathogen-Associated Molecular Patterns)

MAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (por sus siglas en inglés: Microorganism-Associated Molecular Patterns)

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (por sus siglas en inglés: Pattern Recognition Receptors)

PTI: Inmunidad desencadenada por patógenos (por sus siglas en inglés: Pathogen-Triggered Immunity)

ETS: Susceptibilidad desencadenada por efectores (por sus siglas en inglés: Effectors-Triggered Susceptibility)

ETI: Inmunidad desencadenada por efectores (por sus siglas en inglés: Effector-Triggered Immunity)

HR: Respuesta de hipersensibilidad (por sus siglas en inglés: Hypersensitivity Response)

μM : micromolar

cbp: cuanto baste para

IC: intercambio catiónico (iónico)

EM: exclusión molecular

Frac: fracciones

PPT: precipitado

Avr: avirulento (efectores, codificados por los genes Avr)

R: Proteínas R (codificadas por los genes R)

OD: densidad óptica (por sus siglas en inglés: Optical Density)

ii Índice de figuras

Figura 1 Macroconidios de especies de <i>Fusarium</i> . A-D, donde el inciso D corresponde a <i>F. verticillioides</i> . Variación en tamaño y forma. A-H Variación en base de macroconidios. El inciso K es característico de <i>F. verticillioides</i> .-----	11
Figura 2 <i>Fusarium verticillioides</i> .-----	12
Figura 3 <i>Gibberella fujikuroi</i> , las ascosporas se forman en las ascas y éstas se conservan dentro de peritecios para sobrevivir en rastrojo. -----	13
Figura 4 Morfología de especies de <i>Fusarium</i> en PDA. La parte de arriba de cada inciso es el agar al abrir las cajas Petri y la parte de abajo es lo que se ve por debajo de la caja Petri. El inciso A es <i>F. poae</i> , B= <i>F. oxysporum</i> , C= <i>F. acuminatum</i> , D= <i>F. nelsonii</i> , E= <i>F. subglutinans</i> , F= <i>F. nygamal</i> , G= <i>F. pseudonygamal</i> , H= <i>F. lateritium</i> , J= <i>F. decemcellulare</i> , K= <i>F. verticillioides</i> , L= <i>F. culmorum</i> .-----	14
Figura 5 <i>Fusarium verticillioides</i> . (a) Colonias en PDA y agar dicloro-cloramfenicol peptona, (b) fiálides de microconidios, barra=50µm; (c) fiálides, barra =10µ; (d) macro y microconidios, barra=10µ. -----	15
Figura 6 Esquema de los genes RPB1 y RPB2 y posición de los cebadores.-----	16
Figura 7 Clasificación de las especies de <i>Fusarium</i> por su identidad filogenética, basada en secuencias parciales de los genes RPB1 y RPB2.-----	18
Figura 8 <i>F. verticillioides</i> en granos de maíz. A: Crecimiento de hifas alrededor del grano de polen de maíz, se observa mediante Crio-SEM. Barra = 20 µm B: Producción de conidios de <i>F. verticillioides</i> .-----	20
Figura 9 Ruta de entrada de <i>F. verticillioides</i> en maíz. A: Desintegración del pericarpio, patrón que coincide con los sitios de colonización por <i>F. verticillioides</i> . B: Ampliación del recuadro marcado en "A", se observa mejor las marcas por las hifas. C: Se observa cómo la hifa sale del pericarpio para elongarse fuera de él y comenzar la formación de conidios para la colonización. Imágenes por Crio-SEM. -----	21
Figura 10 Estructura de las fumonisinas. Se presentan la estructura general de las fumonisinas de las clases B, A, C y P y los sustituyentes en las posiciones R1 y R2. -----	24
Figura 11 Estructura de la esfinganina. -----	24
Figura 12 A: Estructura genómica del locus <i>FUM</i> en el cromosoma 1 de <i>F. verticillioides</i> . B: Ruta biosintética de FB1.-----	25

Figura 13 Orígenes biosintéticos de la FB1..	26
Figura 14 Biosíntesis de ceramida	28
Figura 15 Efecto de la FB1 sobre las glucanasas de maíz . Patrón de isoformas de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados en ausencia o presencia de FB1 20 μ M. Las proteínas (100 μ g/ carril) se separaron en geles nativos y la actividad se reveló usando laminarina como sustrato.	29
Figura 16 Isoelectroenfoque de las isoformas de las glucanasas de maíz. El intervalo de pH fue de 3 a 10, la isoforma I dio como pI estimado de 5.3 lo que la clasifica como ácida; a diferencia de las isoformas II y III que se clasificarían como básicas por tener un pI de 8.5 y 9, respectivamente.	30
Figura 17 Antecedente de la inhibición de las isoformas de β -glucanasas de maíz. Isoforma ácida I, isoformas básicas II y III. La diferencia entre el panel A y B, son las horas post-inoculación (hpi) con 4 cepas de <i>F. verticillioides</i> , las cuales tienen diferente producción de FB1.	31
Figura 18 Modelo del sistema inmunitario en plantas	33
Figura 19 Monómero=NAG, Polímero=Quitina, Número definido de monómeros en la cadena: Quitobiosa (2), Quitotetraosa (3), Quitotetraosa (4).	36
Figura 20 Enlaces glucosídicos. A: Se muestra un polímero de glucano, formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. B: Trímero de enlaces β -1,3-glucosídicos y el último posee ambos enlaces (β -1,3 y β -1,4) para unir otra cadena con enlaces β -1,3-glucosídicos.	37
Figura 21 Configuración de la glucosa.	37
Figura 22 Clasificación de glucanasas por el mecanismo de hidrólisis.	38
Figura 23 Actividad de glucanasa de extractos de cultivos de frijol de soja. Tratamiento 1 solo amortiguador, tratamiento 2 GIP1, tratamiento 3 EGaseA, tratamiento 4 EGaseA-GIP1	42
Figura 24 Cromatograma de intercambio iónico en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. Las proteínas se separaron por FPLC en una columna de intercambio catiónico Hi Trap SP XL usando un gradiente de NaCl (0 – 1 M).	58
Figura 25 Amplificación del pico del cromatograma de la Figura 24.	59
Figura 26 Cromatograma de exclusión molecular en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. Las proteínas se separaron por FPLC en una columna Superdex 200.	61

- Figura 27 Análisis por electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones separadas por cromatografía de intercambio iónico. Se analizaron las proteínas de las fracciones no retenidas en la columna (9-11) y también las retenidas (52-58) se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M. -----64
- Figura 28 Análisis por electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones separadas cromatografía de exclusión molecular. Las proteínas de las fracciones 24, 27 y 29 provienen de la fracción 11 de intercambio iónico y las proteínas de las fracciones 27, 28, 32, 42 y 45 provienen de la fracción 56 de intercambio iónico. Se separaron en un gel de poliacrilamida (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.-----65
- Figura 29 Análisis del extracto crudo, precipitado con sulfato de amonio a 60% de saturación y las fracciones retenidas en la cromatografía de intercambio iónico (pool I y pool II) por electroforesis SDS-PAGE (12%) teñido con azul de Coomassie. ----66
- Figura 30 Gel nativo para revelar la actividad de glucanasas en las fracciones no retenidas (Fracción 7: 5.9 µg, Fracción 11: 109.3 µg, Fracción 14: 109.5 µg.) y las fracciones retenidas en la columna de intercambio catiónico (Pool I: 53.76 µg, Pool II: 75 µg).-----67
- Figura 31 Gel nativo para revelar la actividad de glucanasas en las fracciones no retenidas (Fracción 14: 109.5 µg, Pool I: 53.7 µg, Pool II: 75 µg). -----68
- Figura 32 Efecto de la temperatura en la actividad de β-1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (P I). La reacción enzimática se llevó a cabo a distintas temperaturas en el rango de 4°C a 70°C por 30 min, usando 0.2 µg de proteína.-----69
- Figura 33 Efecto del pH sobre la actividad de β-1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (PI). La reacción enzimática se llevó a cabo con distintos amortiguadores con pHs en un rango de 3 a 9 por 30 min, usando 0.2 µg de proteína -----70
- Figura 34 Efecto del tiempo sobre la actividad de β-1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (PI). Incubación a pH 6.0 con 2 µg proteína.70
- Figura 35 Efecto de la FB1 en extracto crudo al variar la concentración del sustrato (laminarina) de la glucanasas. Se probaron 3 concentraciones de FB1 más un control sin FB1. -----71

- Figura 36 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β -1,3-glucanasas acidas contenida en la fracción no retenida en la cromatografía de intercambio iónico. -----72
- Figura 37 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β -1,3-glucanasas contenida en la fracción retenida (pool I) en la cromatografía de intercambio iónico. -----72
- Figura 38 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β -1,3-glucanasas contenida en la fracción retenida (pool II) en la cromatografía de intercambio iónico. -----73
- Figura 39 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracción ácida) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (50 μM). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 = 6.2 μg , 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$; C2 = 12.4 μg , 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630 \text{ nm}}$ por tres días. -----74
- Figura 40 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracción ácida) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (50 μM). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 = 6.2 μg , 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$; C2 = 12.4 μg , 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630 \text{ nm}}$ por tres días. -----75
- Figura 41 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (25 μM). Se probaron dos cantidades de proteína del Pool I (C1 = 3.58 μg , 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$; C2 = 7.17 μg , 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630 \text{ nm}}$ por tres días. -----76
- Figura 42 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; Pool I) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (25 μM). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 = 3.58 μg , 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$; C2 = 7.17 μg , 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630 \text{ nm}}$ por tres días. -----76
- Figura 43 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; pool II) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (25 μM). Se probaron dos cantidades de proteína del Pool (C1 = 5 μg , 0.03352 mg glu h^{-1}

- 1 mg^{-1} ; C2 =10 μg , $0.03352 \text{ mg glu h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630} \text{ nm}$ por tres días. -----77
- Figura 44 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; pool II) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (25 μM). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 =5 μg ; C2 =10 μg). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630} \text{ nm}$ por tres días. -----78
- Figura 45 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3). A. Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. B. Foto a las 24 h de incubación de los discos en la placa. Discos: B (20 μL de amortiguador pH=6.0), 1-3 (210 μg de proteína a partir de extracto total, $0.00104 \text{ mg glu h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ + 5 μL de amortiguador pH=6.0). -----79
- Figura 46 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY5). A. Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. B. Foto a las 24h de incubación de los discos en la placa Discos: B (20 μL de amortiguador pH=6.0), 1-3 (210 μg de proteína a partir de extracto total, $0.00104 \text{ mg glu h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ + 5 μL de amortiguador pH=6.0) -----80
- Figura 47 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3). A. Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. B. Foto a las 24h de incubación de los discos en la placa Discos: B (20 μL de amortiguador pH=6.0), 1-3 (4.5 μg de proteína del Pool I, $0.05950 \text{ mg glu h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ + 10 μL de amortiguador pH=6.0) -----81

iii Índice de tablas

Tabla 1	Especies de <i>Fusarium</i> causantes de enfermedad en plantas hospederas -----	10
Tabla 2	Relación entre partes de la planta y especies de <i>Fusarium</i> comúnmente aisladas.-----	11
Tabla 3	Principales características de las secciones reportadas como patógenas. -----	13
Tabla 4	Secuencia de los primers para la PCR de las secuencias RPB1 y RPB2 para la clasificación de <i>Fusarium</i> . D= A, G o T; R=A o G; S=G o C; W=A o T; Y=C o T. ---	16
Tabla 5	Clasificación de micotoxinas de <i>Fusarium spp.</i> Las más negras son producidas por <i>F. verticillioides</i> .-----	19
Tabla 6	Genes del locus <i>FUM</i> involucrados en la biosíntesis de FB1.-----	26
Tabla 7	Familias de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP). -----	34
Tabla 8	Glucanasas de maíz. Fuente: NCBI →gene → glucanase <i>Zea mays</i> (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glucanase%2C+zea+mays . Última consulta 02.03.2018, 11 resultados). *Predicho por EXPASY (web.expasy.org/compute_pi/ , consultado 02.03.2018) -----	39
Tabla 9	Descripción de las funciones de tres glucanasas de maíz. -----	40
Tabla 10	Proteína total extraída y actividad específica de β -1,3-glucanasa en muestras de embriones de maíz germinados por 24 horas. -----	56
Tabla 11	Determinación del porcentaje de saturación de sulfato de amonio para la precipitación cuantitativa de la actividad de β -1,3-glucanasa de embriones de maíz. Porcentaje de actividad con respecto al extracto crudo. -----	57
Tabla 12	Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas separadas por cromatografía de intercambio iónico (IC). -----	60
Tabla 13	Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas, intercambio iónico (IC 56) y exclusión molecular (EM).-----	62
Tabla 14	Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas, intercambio iónico (IC57) y exclusión molecular (EM).-----	63
Tabla 15	Propiedades de algunas glucanasas de microorganismos y plantas -----	83

I. Resumen

El maíz está expuesto a diversos patógenos, donde destaca *Fusarium verticillioides*, un hongo ubicuo que infecta diversos órganos de la planta y en distintas etapas del desarrollo. Este patógeno produce varias micotoxinas que además de contaminar los granos de maíz, pueden funcionar como factores de virulencia. Una de estas toxinas, la fumonisina B1, es la más abundante y se ha encontrado que tiene tres blancos moleculares en maíz: inhibe a la ATPasa de protones de la membrana plasmática, a la ceramida sintasa involucrada en metabolismo de esfingolípidos y a las β -1,3-glucanasas. Estas últimas hidrolizan el enlace β -1,3, presente en los glucanos que forman la pared celular de los hongos. Algunas de estas enzimas son consideradas proteínas relacionadas a patógenos (PRPs) pues se inducen en la respuesta de defensa de las plantas ante la presencia de un patógeno o moléculas provenientes de éste. El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar las principales β -1,3-glucanasas de maíz que son inhibidas por la fumonisina B1. Para esto se partió de un extracto de proteínas de embriones de maíz germinados por 24 h, mismo que se fraccionó por precipitación con sulfato de amonio. La fracción redisuelta y desalada se inyectó en una columna de intercambio catiónico en un equipo de FPLC y se separaron las fracciones no retenidas y retenidas en la columna por elución con un gradiente de cloruro de sodio. Con las fracciones retenidas en la columna, se obtuvieron dos grupos de proteína con actividad de glucanasa. Se encontró que el pH óptimo de actividad es 6.0 y la temperatura óptima es de 40°C. Se demostró que las glucanasas purificadas, tienen actividad antifúngica *in vitro* en medio líquido y en medio sólido contra dos cepas de *F. verticillioides* y se comprobó que son inhibidas por la fumonisina B1 a una concentración $>60\mu\text{M}$. Este trabajo aporta las bases que permitirán identificar a las glucanasas inhibidas por la micotoxina.

II. Introducción

A. *Fusarium verticillioides* como patógeno de maíz

Las plantas han evolucionado múltiples mecanismos para defenderse de microorganismos patógenos como son bacterias, virus y hongos, así como de insectos (Blanco-Labra et al., 2002). Estas interacciones se han estudiado con distintos objetivos, desde conocer los procesos moleculares de la patogénesis, hasta buscar estrategias en el campo para controlar las enfermedades y reducir las pérdidas causadas por dichos patógenos. Un patógeno de planta se define como: cualquier organismo que usa una parte o todo el ciclo de vida de la planta hospedera para su beneficio, causando cambios en su fisiología y/o crecimiento (Buchanan, et al., 2015). Estas variaciones en la fisiología se reflejan como los síntomas de las enfermedades, que pueden ser características, para cada interacción planta - patógeno.

El maíz (*Zea mays* L.) está expuesto a muchos microorganismos fitopatógenos que incluyen bacterias, virus, oomicetos y hongos. Los principales patógenos fúngicos pertenecen a los géneros: *Fusarium spp*, *Penicillium spp*, *Stenocarpella spp.*, *Alternaria spp*, *Aspergillus spp*, *Rhizoctonia spp*. *Pythium spp*. (oomiceto) y *Nigrospora oryzae*. Entre éstos, los patógenos más prevalentes son: *Fusarium spp* y *Aspergillus spp*.

El tipo de infección depende del tipo de microorganismo involucrado, por ejemplo: *Pythium aphanidermatum* es un oomiceto patógeno que sobrevive en el suelo y produce tizón en plántulas que se desarrollan pobremente por exceso de humedad, y eventualmente ocasionan la muerte súbita de éstas. Los síntomas consisten en un estrangulamiento del cuello y podredumbre de los tejidos del tallo, observándose zonas oscuras y de aspecto húmedo (CIMMYT, 2004).

Aspergillus spp. infecta mazorcas, tanto en el campo como durante el almacenamiento, cuando éstas tienen un alto contenido de humedad. Se observan masas pulverulentas negras de esporas que cubren los granos. Las principales especies son *A. glaucus*, *A. ochraceus*. *A. flavus* y *A. parasiticus* y las dos últimas producen las micotoxinas y aflatoxinas, que son tóxicas para mamíferos y aves (Ji et al., 2000; CIMMYT, 2004).

Stenocarpella maydis causa pudrición del tallo en zonas con clima frío y húmedo, para zonas cálidas predomina *S. macrospora*. Se puede observar coloración café en la médula de los entrenudos inferiores, los tallos se debilitan y se forman abundantes picnidios (formación de estructuras de esporas) en la superficie (CIMMYT, 2004).

Penicillium oxalicum es un patógeno que puede desarrollarse en el grano de maíz almacenado, deteriorando su calidad y afectando el poder germinativo de las semillas. Muchas veces la infección está asociada con el daño causado por insectos en la mazorca. Los granos dañados por el hongo desarrollan color amarillento y rayas visibles en el pericarpio, causando pudrición de mazorca (CIMMYT, 2004).

Fusarium spp.

Fusarium verticillioides, previamente denominado *Fusarium moniliforme*, es el principal hongo patógeno (Carmona y Scandiani et al., 2011) que afecta la productividad del maíz en el mundo (Theumer et al., 2012), ya que penetra a la plántula de maíz por distintas rutas (raíces, tallo, mazorca), causando enfermedades en distintos órganos de la planta y a lo largo del desarrollo de ésta. Es un patógeno necrótrofo pues causa la muerte del tejido hospedero y sobrevive como saprofito en el suelo o restos de cosechas (De la Torre-Hernández et al., 2014). Asimismo, es capaz de colonizar y sobrevivir en la semilla, la que constituye una importante fuente de inóculo para la siguiente temporada (Carmona y Scandiani, 2011).

Además de maíz, *Fusarium spp.*, infecta otros cultivos; la tabla 1 presenta las principales especies patógenas de cada uno de éstos (Summerell et al., 2003).

Tabla 1 Especies de *Fusarium* causantes de enfermedad en plantas hospederas (Tomado y modificado de Summerell et al., 2003)

Especies de plantas	Especies de <i>Fusarium</i>
Plátano	<i>F. oxysporum</i>
Algodón	<i>F. oxysporum</i>
Leguminosas	<i>F. avenaceum, F. oxysporum, F. solani</i>
Maíz	<i>F. verticillioides, F. graminearum, F. proliferatum, F. subglutinans,</i>
Arroz	<i>F. fujikuroi</i>
Sorgo	<i>F. andiyazi, F. proliferatum, F. thapsinum</i>
Vegetales	<i>F. oxysporum, F. solani</i>
Trigo, cebada, avena	<i>F. culmorum, F. graminearum, F. pseudograminearum</i>

Fusarium spp. está asociado con enfermedades en distintos tejidos de las plantas como se ilustra en la tabla 2.

Tabla 2 Relación entre partes de la planta y especies de *Fusarium* comúnmente aisladas. Tomado de Summerell et al., 2003.

Parte de la planta	Especies de <i>Fusarium</i>
Raíces y base de tallo	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. compactum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>
Hojas y partes aéreas	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. semitectum</i>
Flores	<i>F. semitectum</i>
Semilla y grano	<i>F. chlamydosporum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. semitectum</i>

1. Taxonomía de *F. verticillioides* y características generales (morfología, producción de micotoxinas)

El género *Fusarium* pertenece a los Ascomycetes; en su estado asexual se caracteriza por la producción de macroconidios septados y hialinos en forma de canoa (figuras 1D y 1K), crecen en racimos llamados esporodoquios (figura 2). Además, produce diferentes conidios en el micelio aéreo de tamaño menor, microconidios.

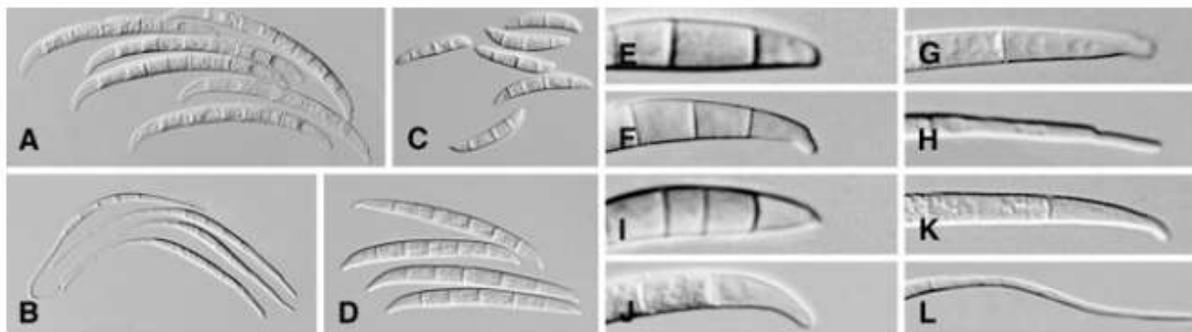


Figura 1 Macroconidios de especies de *Fusarium*. A-D, donde el inciso D corresponde a *F. verticillioides*. Variación en tamaño y forma. A-H Variación en base de macroconidios. El inciso K es característico de *F. verticillioides*. Tomado y modificado de Summerell et al., 2003.

El nombre de *Fusarium* proviene del latín *fusus*=eje (*spindle*), para describir los típicos conidios septados que producen la mayoría de las especies (Geiser et al., 2013).

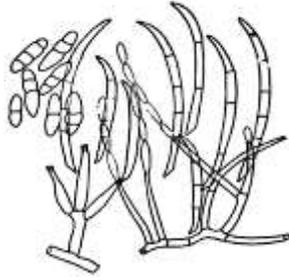


Figura 2 *Fusarium verticillioides*. Tomado de Girisham et al., 2016.

La clasificación taxonómica de *F. verticillioides* se presenta a continuación (O'Donnell et al., 2013):

División: *Eumycota*

Orden: *Moniliales*

Subdivisión: *Deuteromycotina*

Familia: *Tuberculareacea*

Clase: *Hyphomycetes*

Fase teleomórfica: *Gibberella fujikuroi*

La fase teleomórfica o ciclo sexual de *F. verticillioides* se presenta en la naturaleza bajo condiciones de estrés nutricional, en ausencia de un hospedero o cuando requiere sobrevivir en tejido muerto como rastrojo de tallos o de hojas de maíz. En esta forma de reproducción sexual, las ascosporas que son hialinas, elipsoides, septadas están contenidas en las ascas. Cada asca, saco de paredes finas, tiene forma elipsoide, contiene entre 4-6 ascosporas y se encuentran dentro de peritecios. Los peritecios tienen estructura redonda y cerrada de forma globular a cónica (Figura 3) (Sambamurty, 2006).

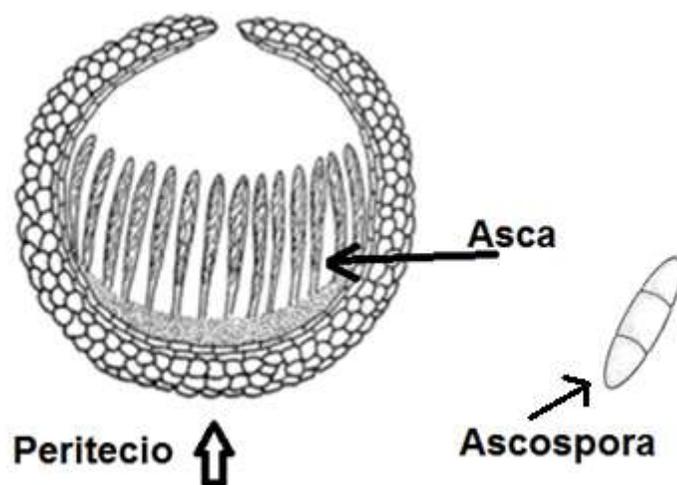
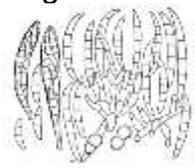
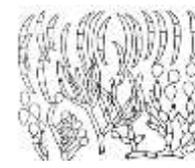
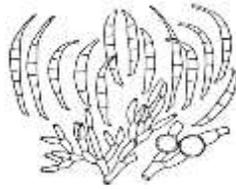
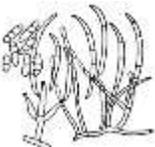


Figura 3 *Gibberella fujikuroi*, las ascosporas se forman en las ascas y éstas se conservan dentro de peritecios para sobrevivir en rastrojo. Tomado y modificado de Martínez, 2017.

El género *Fusarium* se dividió en doce secciones con criterios de presencia/ausencia de microconidios, forma, presencia/ausencia de clamidosporas y su localización, forma de macroconidios y forma basal de los mismos. *Fusarium verticillioides* pertenece a la sección *Liseola* (O'Donnell et al., 2013, tabla 3). Las secciones *Sporotrichiella*, *Gibbosum*, *Discolor* y *Liseola* son caracterizadas como patógenas y toxigénicas en animales, plantas o humanos; sus principales características se presentan en la tabla 3.

Tabla 3 Principales características de las secciones reportadas como patógenas. Imágenes tomadas de Girisham et al., 2016.

Sección	Características	Especies
<i>Discolor</i>	Cultivos blanco-rosa, rojo-café, durazno. Sin microconidios Macroconidios en micelio aéreo, 5 septos. Clamidosporas intercaladas, a veces terminales	<i>F. graminearum</i> , <i>F. sambucinum</i> 
<i>Sporotrichiella</i>	Forma de microconidios: limón o pera, globosos, elipsoides o elongados; dispersos en el micelio aéreo o en falsas cabezas. La frecuencia de micro y macroconidios.	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> 

<p>Gibbosum</p>	<p>Cultivos blanco-pálido rosa, carmín-rojo. Microconidios ausentes o esparcidos en el micelio aéreo. Macroconidios en esporodoquios, con 5 septos (a veces 3). Clamidosporas intercaladas y abundantes.</p>	<p><i>F. equiseti</i></p> 
<p>Liseola</p>	<p>Cultivo blanco-crema-café, naranja, violeta. Microconidios en micelio aéreo, normalmente en largas cadenas o en cabezas falsas, ovales, fusiformes. Macroconidios delgados en esporodoquios, curvos de la punta y con 3 septos.</p>	<p><i>F. verticillioides</i></p> 

Otras características que se emplean para la diferenciación son la morfología en agar PDA (figura 4). *F. verticillioides* presenta un micelio aéreo blanco y producción de pigmento morado (Fig. 4K).

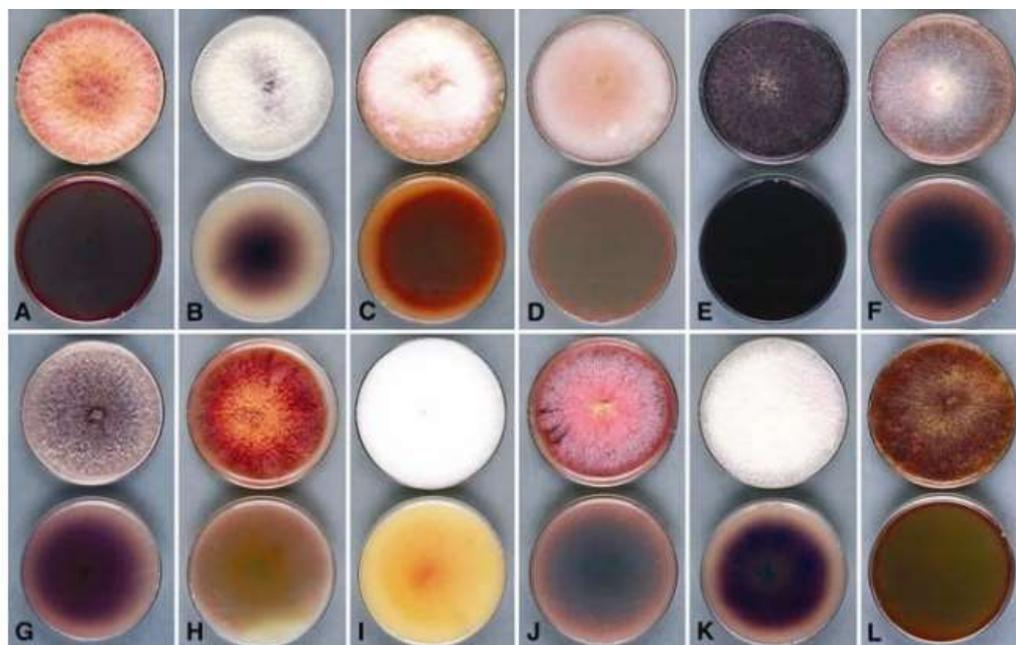


Figura 4 Morfología de especies de *Fusarium* en PDA. La parte de arriba de cada inciso es el agar al abrir las cajas Petri y la parte de abajo es lo que se ve por debajo de la caja Petri. El inciso A es *F. poae*, B=*F. oxysporum*, C=*F. acuminatum*, D=*F. nelsonii*, E=*F. subglutinans*, F=*F. nygamal*, G=*F. pseudonygamal*, H=*F. lateritium*, J=*F. decemcellulare*, K=*F. verticillioides*, L=*F. culmorum*. Tomado de Summerell et al., 2003.

La figura 5 presenta con mayor detalle el crecimiento de *F. verticillioides* en PDA, así como la estructura microscópica de hifas septadas, microconidios y macroconidios; y se observan también las fiálides.

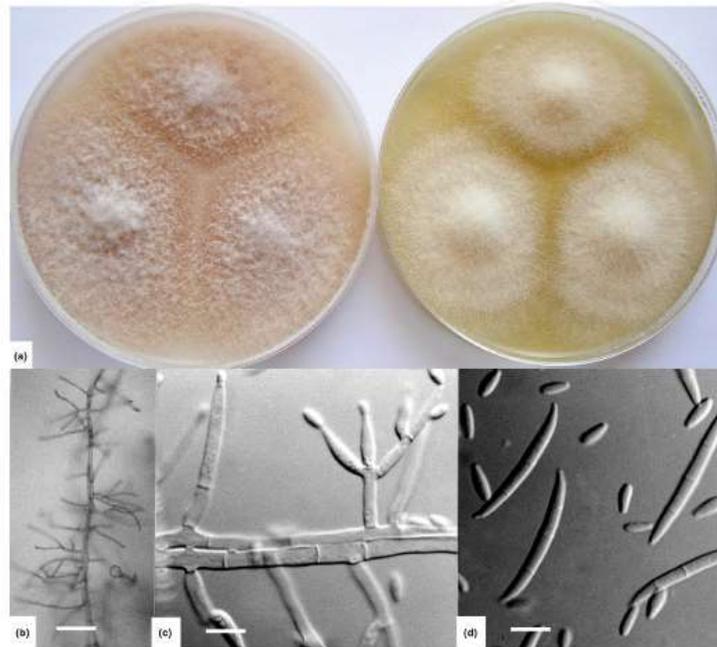


Figura 5 *Fusarium verticillioides*. (a) Colonias en PDA y agar dicloro-cloramfenicol peptona, (b) fiálides de microconidios, barra=50μm; (c) fiálides, barra =10μ; (d) macro y microconidios, barra=10μ. Tomada y modificada de Pitt, 2014

Filogenia Molecular

El avance en las técnicas moleculares y la secuenciación de genomas de varias especies de *Fusarium* ha permitido el desarrollo de su identificación molecular. Se han propuesto las secuencias de varios genes como son las regiones internas transcritas de los RNAs ribosomales (ITS1 e ITS2) y el gen $ETF1\alpha$, entre otros. La base de datos más amplia es la que contiene las secuencias parciales de la RPB1 (RNA Polimerasa II, subunidad más larga) y RPB2 (segunda más larga), que se muestran en la figura 6.

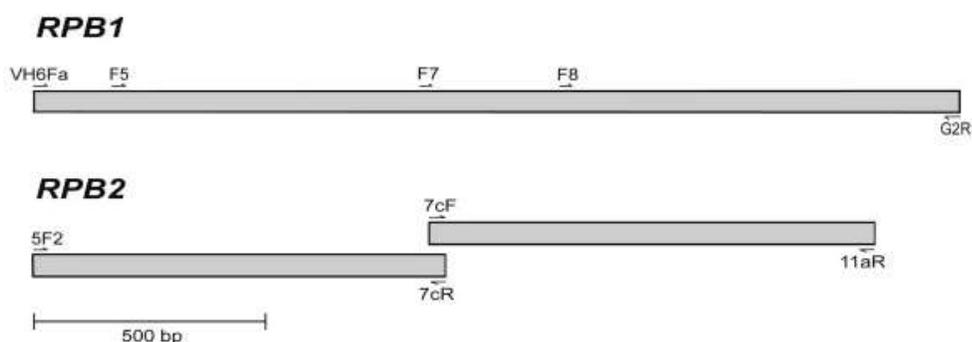


Figura 6 Esquema de los genes RPB1 y RPB2 y posición de los cebadores. Tomada de O'Donnell et al., 2013.

La figura 6 representa la secuencia de RPB1 y de RPB2; los cebadores (tabla 4), localización de la secuencia y la orientación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) están representados con medias flechas. La región de RPB1 se amplificó como un fragmento de 1.9 kb, usando los cebadores VH6Fa y G2R. Para la región de RPB2 se amplificó con los fragmentos traslapados usando los cebadores 5F2-7cR y 7cF-11aR.

Tabla 4 Secuencia de los primers para la PCR de las secuencias RPB1 y RPB2 para la clasificación de *Fusarium*. D= A, G o T; R=A o G; S=G o C; W=A o T; Y=C o T.

LOCUS	Cebador	Secuencia (5'-3')
RPB1	Fa	CAYAARGARTCYATGATGGGWC
	G2R	GTCATYTG DGT DGC DGGYTCDCC
	F5	ATGGGTATYGTCCAGGAYTC
	F6	CTGCTGGTGGTATCATTACG
	F7	CRACACAGAAGAGTTTGAAGG
	F8	TTCTTCCACGCCATGGCTGGTCG
RPB2	5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC
	7cR	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT
	7cF	ATGGGYAARCAAGCYATGGG
	11aR	GCRTGGATCTTRTCRTCSACC

Para este análisis filogenético se usaron los genomas ya secuenciados de *Fusarium*: *graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. verticillioides*, *F. solani*, *F. avenaceum* y *F. langsethiae* (O'Donnell et al., 2013). Además, se formaron 26 familias de metabolitos secundarios (SMB, ver tabla 4) dentro del marco filogenético, para clasificar los distintos géneros de *Fusarium* por el complejo al que pertenecen (Figura 7) y se marcó en distinto color la sección morfológica a la que pertenece.

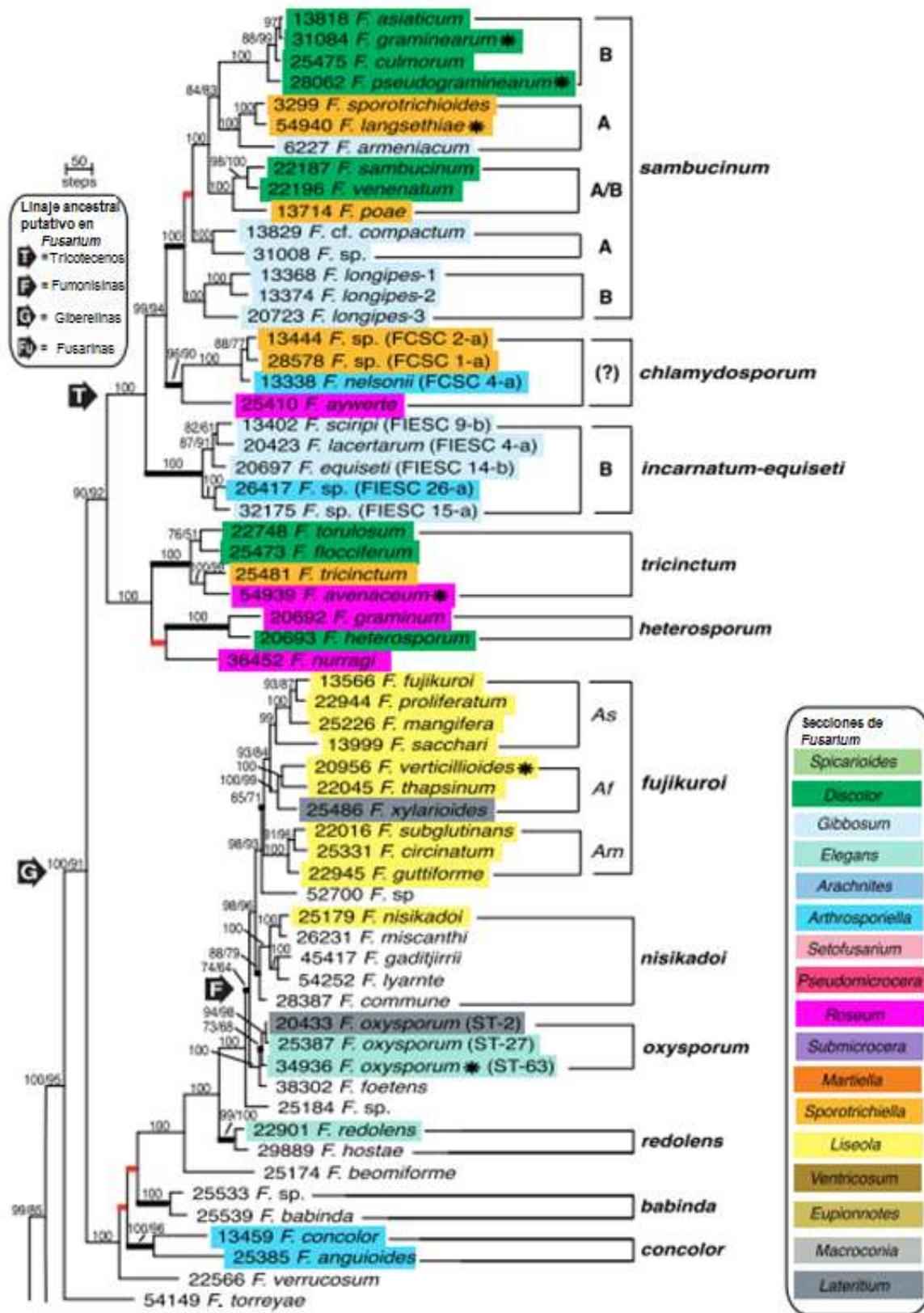


Figura 7 Clasificación de las especies de *Fusarium* por su identidad filogenética, basada en secuencias parciales de los genes RPB1 y RPB2. Tomado y modificado de O'Donnell et al., (2013).

Distintas especies del género *Fusarium* producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran pigmentos y micotoxinas. Por su ruta biosintética, éstos pueden ser policétidos, péptidos no ribosomales o terpenos. La tabla 5 presenta los principales metabolitos secundarios producidos por *Fusarium spp.*

Tabla 5 Clasificación de micotoxinas de *Fusarium spp.* Tomada de O'Donnell et al., 2013. Las más negras son producidas por *F. verticillioides*.

Policétidos		Péptidos no ribosomales	Terpenos	Otros
Aurofusarina	Ácido fusárico	Beauvericina/enniatina	Culmorina	Butenolida
Bikaverina	Fusarinas	Ferricricina	Giberelina	
Depudecina	Pigmento rojo	Fusarinina	Tricoteceno	
Equisetina	Pigmento violeta	Malonicromo		
Fumonisina	Zearalenona			
Fusarelina				

2. Colonización de tejidos de maíz por *F. verticillioides*.

F. verticillioides puede acceder y colonizar los tejidos de maíz por varias rutas, y en buena medida esto determina el tipo de enfermedad que causa. Las principales rutas de colonización del hongo se describen a continuación.

- Infección a través del estigma:

Las esporas de *F. verticillioides* llegan al estigma acarreadas por insectos, agua o viento, de donde germinan y la hifa crece por el canal estilar para acceder al grano en formación. En esta ruta de colonización no se requiere lesión mecánica (Duncan y Howard, 2010). *F. verticillioides* entra al grano de maíz creciendo a lo largo del estigma, asociado al tubo de polen (Figura 8) y las hifas son capaces de atravesar el pericarpio (Figura 9; Duncan y Howard, 2010).

- Daño por insectos:

El daño que causan insectos que se alimentan del grano en la mazorca y del tallo, proporciona rutas de entrada para *F. verticillioides* y otros hongos. Inclusive, los insectos facilitan la dispersión de las esporas del hongo sobre la mazorca; esta inoculación masiva propicia la pudrición del grano y de la mazorca. (Munkvold et al., 1997).

- Infección sistémica:

F. verticillioides es capaz de sobrevivir como endófito en las semillas infectadas y en el suelo, desde donde puede acceder a las células de la epidermis de la raíz de la plántula en desarrollo. Si el inóculo es abundante y las condiciones ambientales favorables, causa pudrición de la raíz y muerte de la plántula. Sin embargo, es más frecuente que su translocación por el tallo para acceder a los granos en la nueva mazorca que se está formando (Oren et al., 2003; Carmona et al., 2009).

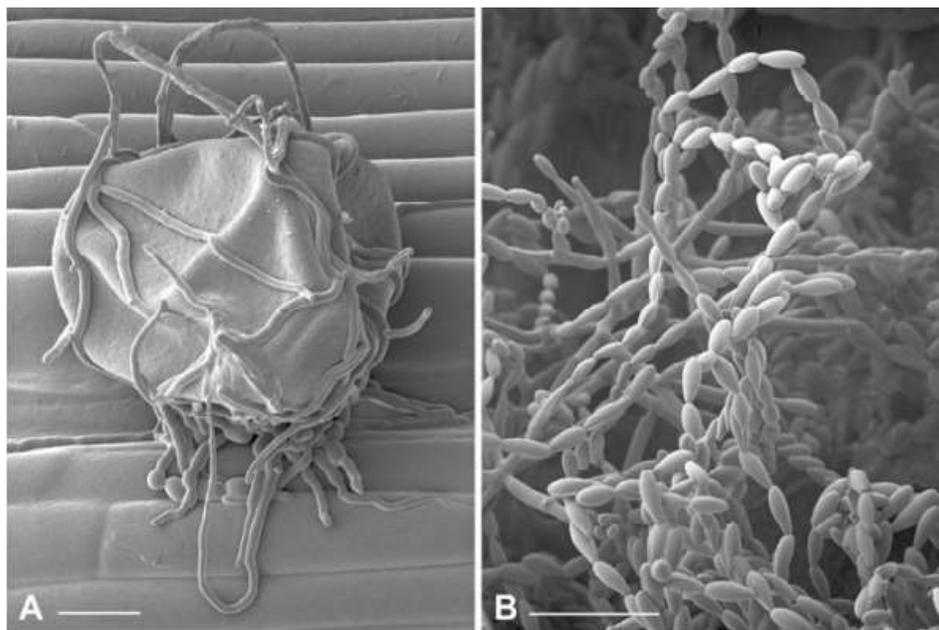


Figura 8 *F. verticillioides* en granos de maíz. A: Crecimiento de hifas alrededor del grano de polen de maíz, se observa mediante Crio-SEM. Barra = 20 μ m B: Producción de conidios de *F. verticillioides* (Tomada de Duncan y Howard, 2010).

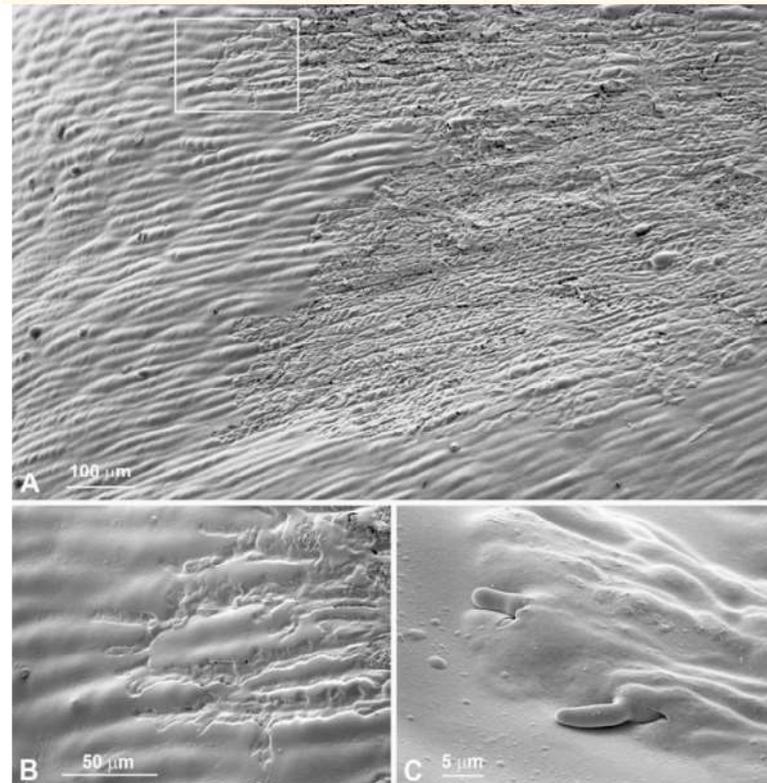


Figura 9 Ruta de entrada de *F. verticillioides* en maíz. **A:** Desintegración del pericarpio, patrón que coincide con los sitios de colonización por *F. verticillioides*. **B:** Ampliación del recuadro marcado en “A”, se observa mejor las marcas por las hifas. **C:** Se observa cómo la hifa sale del pericarpio para elongarse fuera de él y comenzar la formación de conidios para la colonización. Imágenes por Crio-SEM (Tomada de Duncan y Howard, 2010).

3. Enfermedades causadas por *F. verticillioides* en maíz

Dependiendo de la ruta de entrada, cantidad de inóculo, estadio de desarrollo de la planta y de factores ambientales, *F. verticillioides* puede causar distintas enfermedades como las que se mencionan a continuación.

a. Enfermedad en plántulas (tizón)

Ocurre cuando semillas infectadas germinan o bien son colonizadas durante la germinación, que incluso pueden prevenir la emergencia de las plántulas. Los síntomas característicos son plántulas achaparradas que muestran una coloración amarilla a café, dependiendo de la severidad. Si las raíces están infectadas, muestran una

coloración café, al igual que el coleóptilo y van a emerger plántulas poco vigorosas (Oldenburg et al., 2017).

b. Pudrición de tallo

F. verticillioides puede acceder al tallo por crecimiento sistémico como endófito o bien penetrarlo a través de heridas mecánicas. Los síntomas de una infección severa en el tallo es una coloración rosa y que puede llegar a desintegrar la médula parenquimatosa e incluso ruptura del tallo (Oldenburg et al., 2017). Condiciones ambientales extremas como exceso de agua o sequía hacen a la planta más susceptible a esta enfermedad. La severidad del daño de tallo y/o raíz depende en gran medida la ruta de entrada y la etapa de crecimiento de la planta.

c. Pudrición de mazorca

F. verticillioides puede acceder a la mazorca a través de lesiones mecánicas o bien por el canal estilar como ya se describió. Los síntomas característicos de la parte externa de la mazorca son coloración café, blanca o rosa y la presencia del moho diseminado en algunos granos en áreas delimitadas. Si la infección es por el crecimiento sistémico del patógeno en semillas, raíces o tallo, pueden no verse los colores característicos de la infección (asintomáticos) y el hongo se comportaría como endófito (Oldenburg et al., 2017).

B. Fumonisin

Las fumonisin son las principales toxinas producidas por *F. verticillioides* y se encuentran con alta incidencia y niveles elevados en maíz. Sus niveles varían y se han reportado rangos entre 0.12 - 60 µg FB1 por gramo de maíz destinado para consumo animal, concentración que se ha sugerido implicada en enfermedades. Asimismo se han detectado niveles en el intervalo de 0.04 - 6.32 µg/g en muestras de maíz para consumo humano (Yescas-Huerta, 2001). Su producción es dominante en zonas de clima caluroso y seco, y como segunda opción en zonas con periodos de alta humedad (Marín et al., 1999; Reid et al., 1999). Aunque no hay una normatividad estricta para los niveles de fumonisin en maíz, el límite recomendado de fumonisin según la FDA

(Food and Drug Administration, E.U.A.) es entre 2 y 4 $\mu\text{g/g}$, ya sea en maíz limpio para producción de masa o palomitas de maíz, productos de maíz molido y seco, y harinas de maíz (FDA, consultado en junio de 2017). Las principales enfermedades asociadas al consumo de maíz contaminado por fumonisinas descritas como leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar porcinos. También se ha reportado que causa toxicidad en riñones e hígado en ratas, y un promotor de cáncer hepático. Estudios epidemiológicos han asociado una mayor incidencia de cáncer esofágico en humanos con el consumo de maíz contaminado con fumonisinas en Sudáfrica, China e Italia (Jackson et al., 1996a).

1. Diversidad química de las fumonisinas

Son una familia de compuestos con una cadena alifática de 19 a 20 átomos de carbono, posee un grupo amino y varios grupos hidroxilo, 2 de ellos están esterificados con ácido tricarbóxico. Son compuestos anfipáticos pues tienen una región hidrofóbica y otra hidrofílica. Por sus estructuras químicas, las fumonisinas se clasifican en 4 tipos (A, B, C y P) con subtipos de cada una (Figura 10), siendo las B las predominantes y las mejor caracterizadas en términos de su toxicidad. Son producidas por *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* y algunas por *Aspergillus niger* (Pitt, 2014). La FB1 es un compuesto polar, soluble en agua, metanol y acetonitrilo, es termoestable, resistente a un rango amplio de pH que va de 1.5-7 (Jackson et al., 1996a, Jackson et al., 1996b). Es resistente a la fermentación alcohólica y a procesos de producción, la nixtamalización reduce los niveles de fumonisina por hidrólisis, pero los derivados son casi igual de tóxicos (Pitt, 2014).

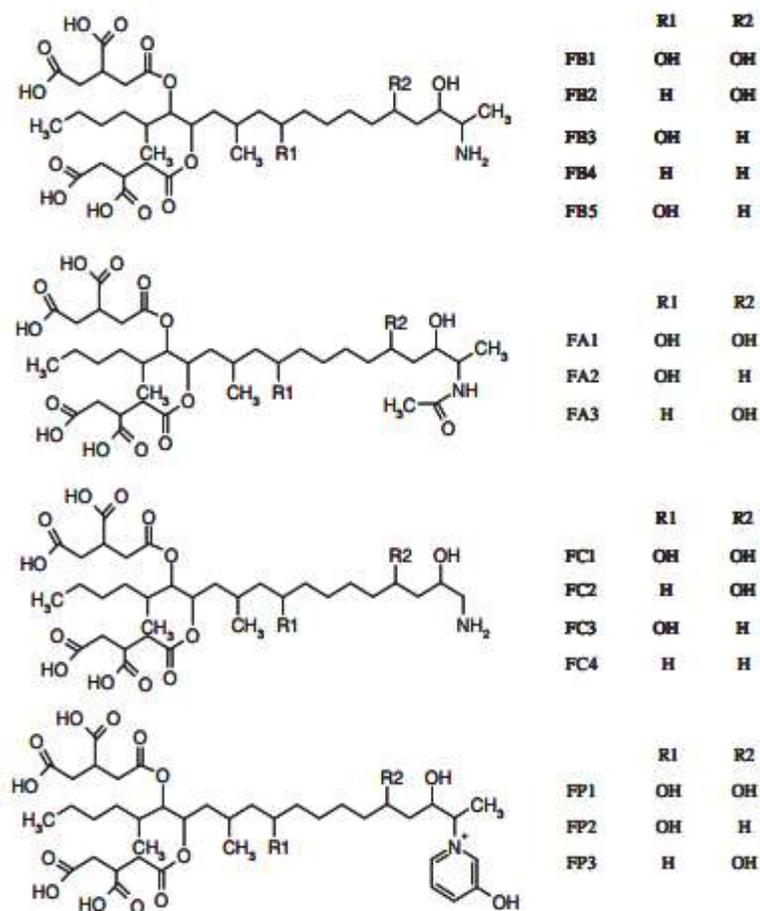


Figura 10 Estructura de las fumonisinas. Se presentan la estructura general de las fumonisinas de las clases B, A, C y P y los sustituyentes en las posiciones R1 y R2 (Lazzaro et al., 2012).

2. Biosíntesis de fumonisinas

La fumonisina es considerada una micotoxina análoga de la esfinganina (SAMT, por sus siglas en inglés) (Sánchez-Rangel & Plasencia, 2010), por su similitud estructural con esta base esfingoidea (figura 11):

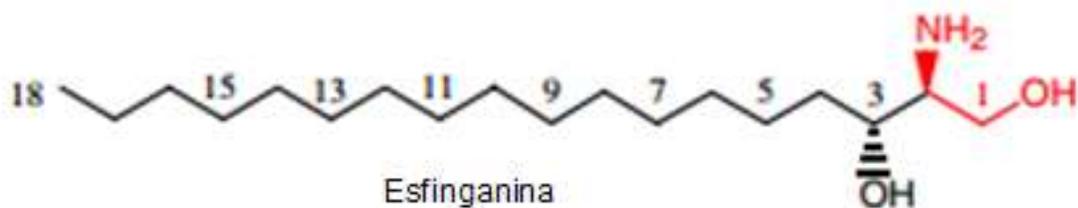


Figura 11 Estructura de la esfinganina.

La capacidad de sintetizar fumonisinas depende de la presencia del locus *FUM*, el cual se encuentra en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y contiene 17 genes (Figura 12A) que codifican las enzimas requeridas para su síntesis (Figura 12B), además de las proteínas necesarias para la secreción y resistencia a la toxina. La tabla 6 se muestra los genes y las enzimas que codifican para dar las principales reacciones en la síntesis de fumonisina (Galeana-Sánchez, 2014).

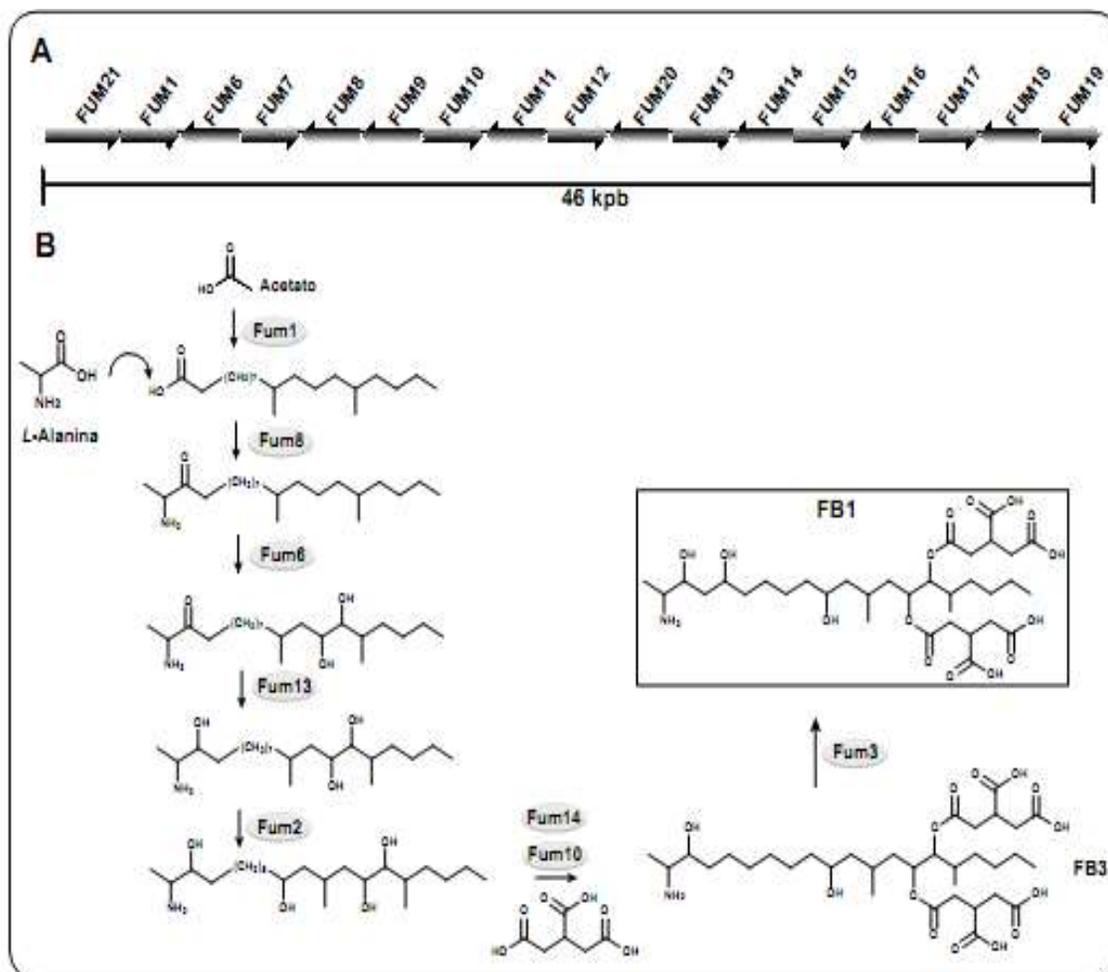


Figura 12 A: Estructura genómica del locus *FUM* en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*. B: Ruta biosintética de FB1. (De la Torre-Hernández et al., 2014).

Tabla 6 Genes del locus *FUM* involucrados en la biosíntesis de FB1. (De la Torre-Hernández et al., 2014).

Gen	Enzima	Actividad
<i>FUM 1</i>	Policétido sintasa (PKS)	Extensión de la cadena
<i>FUM 8</i>	Aminotransferasa	Acarrea el grupo amino de la alanina
<i>FUM 6</i>	Oxidasa	Oxidación de posición C-14 y C-15
<i>FUM13</i>	Reductasa	Reduce de grupo ceto a hidroxilo
<i>FUM 7, 10, 11, 14</i>	Transferasas	Esterificación de los ácidos tricarbóxicos

La fumonisina se compone (figura 13 y 12B) de una cadena de 20 carbonos, los carbonos 3-20 son derivados de acetato y los carbonos 1-2 del aminoácido alanina; así como el grupo amino del carbono 2 también proviene de la alanina. Los grupos metilo del carbono 12 y del carbono 16 son derivados de S-adenosil metionina. Los ésteres tricarbóxicos al parecer provienen del ciclo del ácido cítrico, aunque todavía no está claro el origen de los mismos.

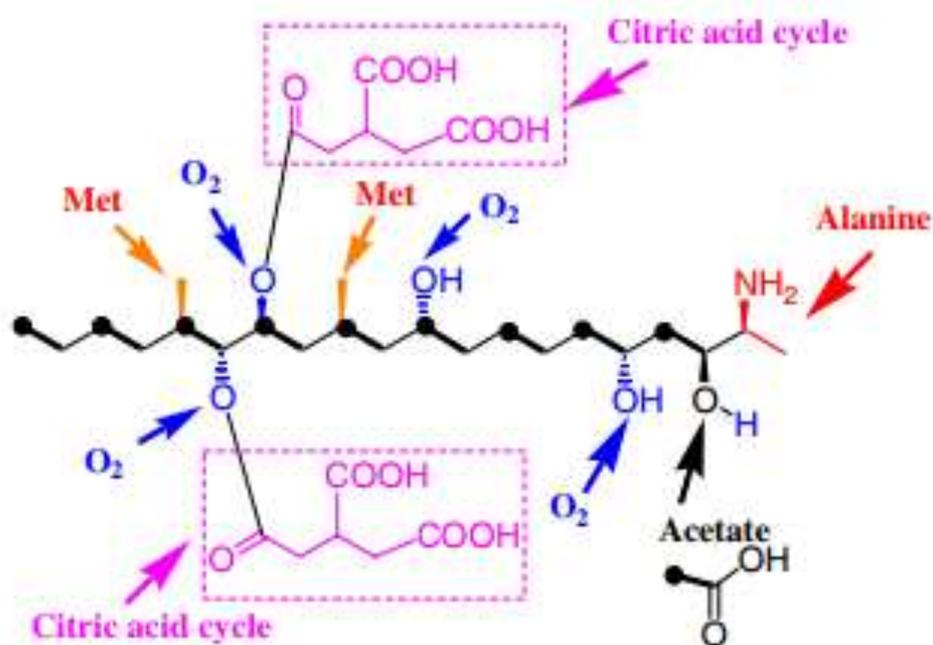


Figura 13 Orígenes biosintéticos de la FB1. Tomada y modificada de Du et al., 2008.

3. Actividad biológica de las fumonisinas en maíz

En maíz, se han descrito tres blancos moleculares de la FB1 que son el metabolismo de esfingolípidos, la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática y las β-1,3-glucanasas. A continuación, se detalla la actividad biológica de la micotoxina.

a. Metabolismo de esfingolípidos

Los esfingolípidos son moléculas necesarias para la integridad de las membranas y en la formación de las mismas, así como sus metabolitos que regulan procesos celulares como apoptosis y participan en cascadas de señalización. Además, en plantas están presentes en el desarrollo del polen, la transducción y en la respuesta a estrés biótico y abiótico. Los esfingolípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico a partir de la condensación entre la serina y la palmitoil coenzima A (CoA) en una reacción catalizada por la serina-palmitoil transferasa (SPT) para generar la base esfingoidea 3-cetoesfinganina (figura 14). Ésta es reducida por la la ceto-esfinganina reductasa (KSR) para producir esfinganina. (Michaelson et al., 2016; Murray et al., 2012).

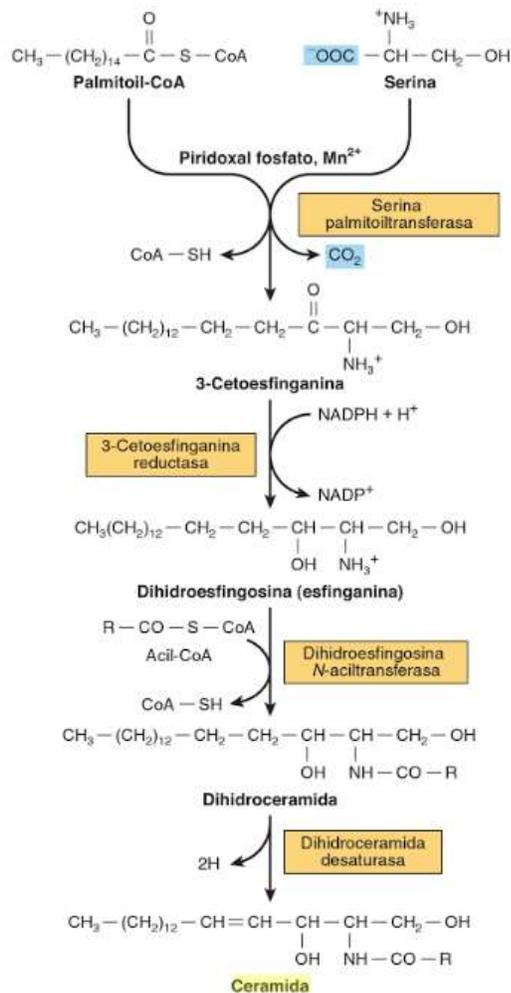


Figura 14 Biosíntesis de ceramida (Modificada de Murray et al., 2012).

La FB1 inhibe competitivamente a la siguiente enzima en la ruta que es la ceramida sintasa (también llamada Dihidroesfingosina N-acetiltransferasa) lo que causa acumulación de esfinganina y otras bases esfingoideas, y depleción en los niveles de ceramida y esfingolípidos complejos. Una concentración de 10^{-4} – 10^{-6} M de fumonisina es suficiente para afectar el crecimiento, desarrollo y alterar biosíntesis de esfingolípidos (Abbas et al., 1994; Chen et al., 2009). En maíz, la elevación en los niveles de esfinganina y fitoesfingosina se ha asociado con la producción de ácido salicílico, que es una fitohormona que activa diferentes vías de señalización en la respuesta de defensa en plantas (de la Torre et al., 2010).

b. ATPasa de protones

En plantas, la ATPasa de protones es una bomba responsable de establecer el potencial de la membrana celular, usa la hidrólisis de ATP para translocar los protones

del citosol al espacio extracelular. El gradiente electroquímico de protones que se genera a través de la membrana plasmática, se utiliza para el transporte de solutos (por canales o acarreadores), así como la acidificación del medio externo, que facilita la elongación de los tejidos (Elmore et al., 2011). La FB1 inhibe a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática purificada de embriones de maíz, la inhibición es del tipo acompetitiva con una KI de 17.5 μM y se asocia con la reducción de hasta 78 % en la acidificación del medio y la disminución en la elongación radicular del maíz durante la germinación (Gutiérrez-Nájera et al., 2005).

c. β -1,3-glucanasas

Estas enzimas tienen actividad hidrolítica sobre los glucanos de la pared celular del hongo y conforman un grupo de proteínas relacionadas a la patogénesis, pues se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Ferreira et al., 2007).

Cuando embriones de maíz se germinan en presencia de FB1, se inducen isoformas ácidas, pero se inhibe la actividad de isoformas básicas separadas en geles nativos revelados por actividad de glucanasa (Figura 15, Sánchez-Rangel et al., 2012).

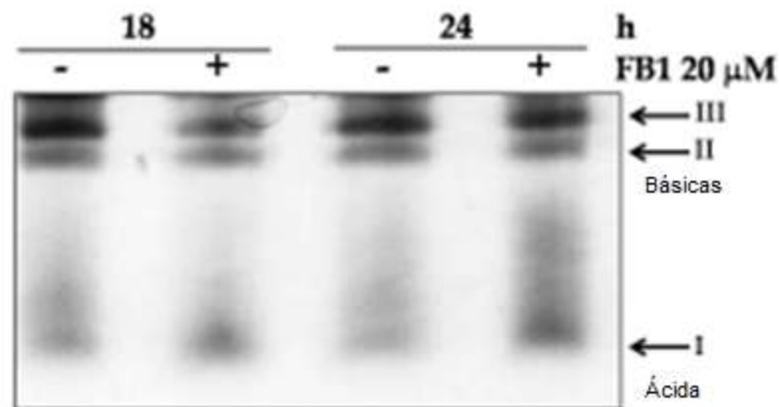


Figura 15 Efecto de la FB1 sobre las glucanasas de maíz (Sánchez-Rangel et al., 2012). Patrón de isoformas de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados en ausencia o presencia de FB1 20 μM . Las proteínas (100 μg / carril) se separaron en geles nativos y la actividad se reveló usando laminarina como sustrato.

Para confirmar la naturaleza de las isoformas, se realizó su corrimiento mediante isoelectroenfoque, se determinó que la isoforma I es la ácida ($\text{pI} = 5.3$) y las isoformas II y III son básicas ($\text{pI} = 8.5 - 9$) (figura 16).

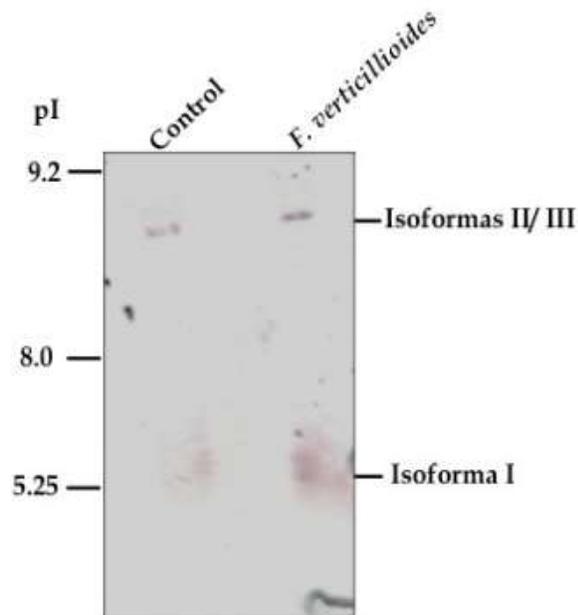


Figura 16 Isoelectroenfoque de las isoformas de las glucanasas de maíz (Sánchez-Rangel et al., 2012). El intervalo de pH fue de 3 a 10, la isoforma I dio como pI estimado de 5.3 lo que la clasifica como ácida; a diferencia de las isoformas II y III que se clasificarían como básicas por tener un pI de 8.5 y 9, respectivamente.

Más tarde Galeana et al. (2017), demostraron que la FB1 producida *in planta* (por las cepas de *F. verticillioides*) a las 24 horas post-inoculación (hpi) y 30 hpi es suficiente para inhibir a las β -1,3-glucanasas básicas (isoformas II y III, ver figura 17) de embriones de maíz durante la germinación. Esto es particularmente claro con la cepa MY3 que produce entre 10 a 100 veces niveles mayores de FB1 que otras cepas como la MY5, e inhibe a la isoforma II desde las 24 hpi y la cepa MY5 se observa mejor la inhibición a las 30 hpi.

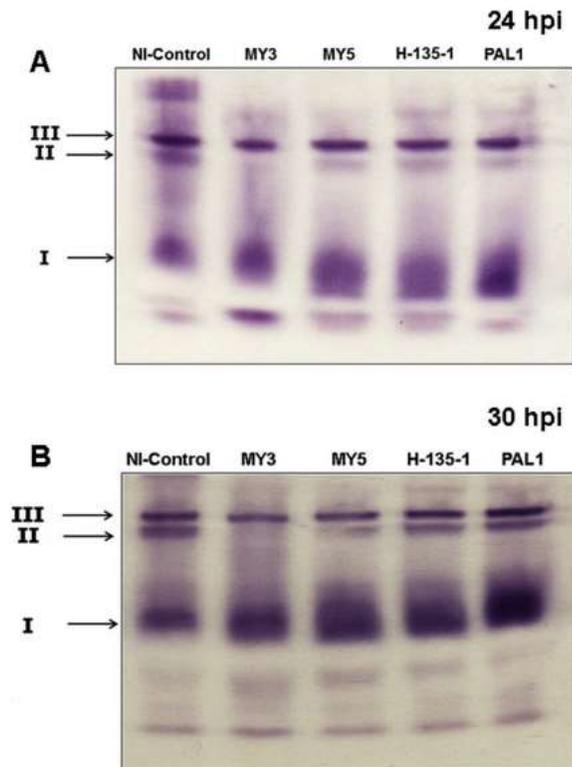


Figura 17 Antecedente de la inhibición de las isoformas de β -glucanasas de maíz (Tomado de Galeana et al., 2017). Isoforma ácida I, isoformas básicas II y III. La diferencia entre el panel A y B, son las horas post-inoculación (hpi) con 4 cepas de *F. verticillioides*, las cuales tienen diferente producción de FB1.

C. Respuesta de defensa en plantas

Las plantas han evolucionado una serie de sistemas de defensa contra el ataque de insectos y microorganismos patógenos, que pueden ser barreras estructurales o químicas, generalmente constitutivas, o inducibles que se activan en presencia del organismo externo. Cuando se activa el mecanismo de defensa por patógenos, se debe reconocer la amenaza o señal, con lo que activa vías de señalización para que se dé una respuesta. Esta última es regulada a nivel transcripcional por medio de la expresión de genes relacionados con la defensa (Lamb et al., 1989). Este reconocimiento de la señal ocurre en dos niveles, dependiendo del tipo de molécula percibida a través de los PAMPs o por los efectores.

1. Reconocimiento de PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a la Patogénesis) e inducción de la defensa

Parte de la inmunidad innata de plantas (defensa basal) se encuentra en la capacidad de percibir a los PAMPs, la cual se activa en estadios tempranos en la interacción planta-patógeno. La naturaleza química de los PAMPs es muy diversa e incluye moléculas como ergosterol, proteínas específicas glicosiladas y los componentes de su pared celular quitina y β -glucano en hongos, y flagelina y lipopolisacárido (LPS) en bacterias (Zipfel y Felix, 2005).

El modelo de zig-zag sobre la evolución del sistema inmunitario de las plantas para percibir PAMPs y efectores se presenta en la figura 18 (modelo por Jones, et al., 2006):

- Fase 1: PAMPs o MAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos/microorganismos) son reconocidos por receptores específicos (PRRs), lo que resulta en el encendido de la respuesta inmunitaria (PAMP-PTI) que detiene la colonización del patógeno
- Fase 2: Los patógenos producen efectores que contribuyen a la virulencia de los mismos y pueden interferir con la PTI, lo que da como resultado a la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS).
- Fase 3: Un efector en específico es reconocido por proteínas NB-LRR, lo que produce ETI (una respuesta PTI amplificada y acelerada). ETI es el factor para

determinar resistencia y usualmente lleva a producir la respuesta hipersensible (HR) en el sitio de infección.

- Fase 4: Mediante selección natural los patógenos pueden evitar ETI por dos caminos: propagación o diversificación del gen efector (el que puede reconocer la defensa de plantas) o por adquirir efectores adicionales que suprimen ETI, pero ETI puede detonarse por estos nuevos efectores (proteínas secretadas por el patógeno para invadir el tejido huésped, suprimir o distraer su sistema inmunitario o para ayudarlo a sobrevivir)

La respuesta hipersensible no se da normalmente en la célula infectada, es un efecto retardado y activa mecanismos en la planta que comprometen su integridad como hospedero, una defensa de este tipo puede ser la muerte celular programada.

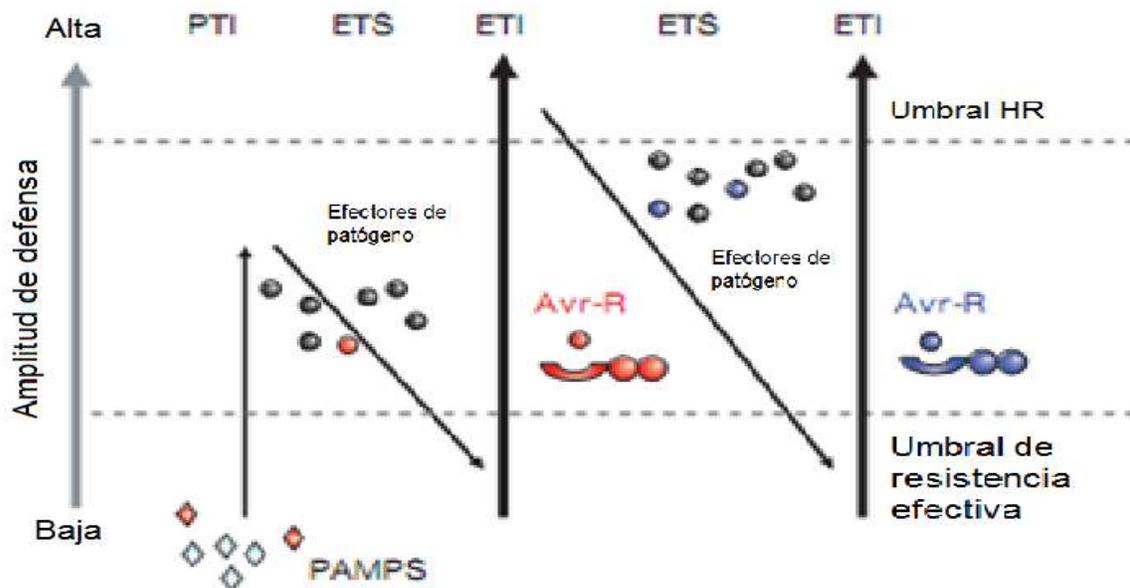


Figura 18 Modelo del sistema inmunitario en plantas (Tomado y modificado de Jones, J. et al., 2006) Abreviaturas: PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a la Patogénesis (por sus siglas en inglés), MAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (por sus siglas en inglés), PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (por sus siglas en inglés), PTI: Inmunidad desencadenada por patógenos (por sus siglas en inglés), ETS: Susceptibilidad desencadenada por efectores (por sus siglas en inglés), ETI: Inmunidad desencadenada por efectores (por sus siglas en inglés), HR: Respuesta de hipersensibilidad (por sus siglas en inglés), Avr-R: proteínas R que reconocen al efector avirulento (por su denominación en inglés), Umbral de resistencia efectiva: intensidad de

la señal necesaria para activar la defensa, Umbral HR: intensidad de la señal que produce un respuesta que compromete la vida del hospedero.

2. Proteínas relacionadas con la patogénesis

Parte de la respuesta de defensa que ocurre por la percepción de PAMPs o de efectores, incluye la apertura de canales iónicos, formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), modificaciones en la polaridad de la membrana, modificación en actividad enzimática de NAD(P)H oxidasas, fosfolipasas, fosfatasa, y cinasas, producción de fitoalexinas, ácido salicílico, óxido nítrico, ácido jasmónico, y etileno, así como la inducción de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP) como quitinasas y glucanasas.

Las PRPs se acumulan en el tejido vegetal infectado o durante la infección por distintos tipos de patógenos (Riveros-Angarrita, 2010). Asimismo, algunas señales químicas o físicas como fitohormonas, reguladores de crecimiento y factores como daño mecánico, ozono y luz UV-C, inducen la producción de estas proteínas. Algunas PRP han sido involucradas en la inhibición del crecimiento de hongos, liberación de moléculas que son inductores endógenos de la defensa de plantas (elicitores) y en el reforzamiento de las estructuras de la pared celular. Las PRPs se clasifican por sus propiedades (tipo de enzima a la que se atribuye actividad), masa molecular y miembro. Se clasifican en 17 familias que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Familias de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP). Tomada y modificada de: Fuentes-Silva et al., 2006, Ebrahim et al., 2011)

Familia	Miembro tipo	Masa mol (kDa)	Clasificación/propiedades
PR-1	Tobacco PR-1 ^a	15-17	Antifúngica
PR-2	Tobacco PR-2	23-35	Antifúngica, β -1,3-glucanasa clases I-III
PR-3	Tobacco P, Q	25-35	Antifúngica, quitinasa tipo I, II, IV-VII
PR-4	Tobacco "R"	13-19	Antifúngica, quitinasa tipo I y II
PR-5	Tobacco S	22-24	Proteínas tipo taumatina
PR-6	Tomato Inhibitor 1	6-13	Inhibidor de proteasas
PR-7	Tomato p69	69	Endoproteasas
PR-8	Cucumber chitinase	28	Quitinasa/lisozima, tipo III

PR-9	Tobacco “lignin forming peroxidase”	39-40	Peroxidasa
PR-10	Parsley “PR1”	17-18	Ribonucleasas-like, proteínas homólogas a Bet v 1
PR-11	Tobacco “class V” chitinase	41-43	Quitinasa, clase I
PR-12	Radish Rs-AFP3	5	Defensinas
PR-13	Arabidopsis TH12.1	14	Tioninas
PR-14	Barley LTP4	7-12	Proteínas transportadoras de lípidos
PR-15	Barley Ox Oa (germin)	22-36	Oxalato oxidasa
PR-16	Barley OxOLP	22-36	Oxalato oxidasa-like
PR-17	Tobacco PRp27	27	Desconocida

3. Hidrolasas de glucanos: quitinasas y glucanasas

Las hidrolasas son un grupo de enzimas (E.C. clase III) que están involucradas en la ruptura hidrolítica (intervienen moléculas de agua) de enlaces C-O, C-N, O-P y/o C-S. Las quitinasas y glucanasas son PRPs con actividad hidrolítica y cuya función es relevante en la respuesta de defensa contra hongos patógenos.

Quitinasas

La quitina es un polisacárido lineal de la β -1,4-N-acetilglucosamina y es abundante en la naturaleza ya que se encuentra en insectos, hongos, levaduras, algas y en estructuras de vertebrados (Punja et al., 1993, Ver figura 18). Por lo que las enzimas encargadas de la degradación de quitina reciben el nombre de quitinasas; contribuyen a la generación de carbono y nitrógeno en el ecosistema (Hamid et al., 2013).

Las quitinasas están clasificadas como EC 3.2.2.14 Endoquitinasas y EC 3.2.1.52 Exoquitinasas de acuerdo a CAZy, al ser glicosil hidrolasas de las familias 18-20. Su peso molecular varía entre 20-90 kDa y son producidas por diversos organismos como bacterias, hongos, levaduras, plantas, actinomicetos y humanos (Hamid et al., 2013).

Mecanismo:

Las endoquitinasas hidrolizan enlaces internos en el polímero para producir el dímero dicetilquitobiosa y otros multímeros como quitriosa y quitotetraosa. Las exoquitinasas por su lado se divide en 2 subcategorías: Quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), catalizan la

liberación de diacetilquitobiosa y no forma monosacáridos y oligosacáridos. β -1,4-N-acetil-glucosaminidasas (EC 3.2.1.30), descompone los polímeros de quitina como quitriosa o quitotetraosa para dar monómeros de N-acetil-glucosamina (figura 19).

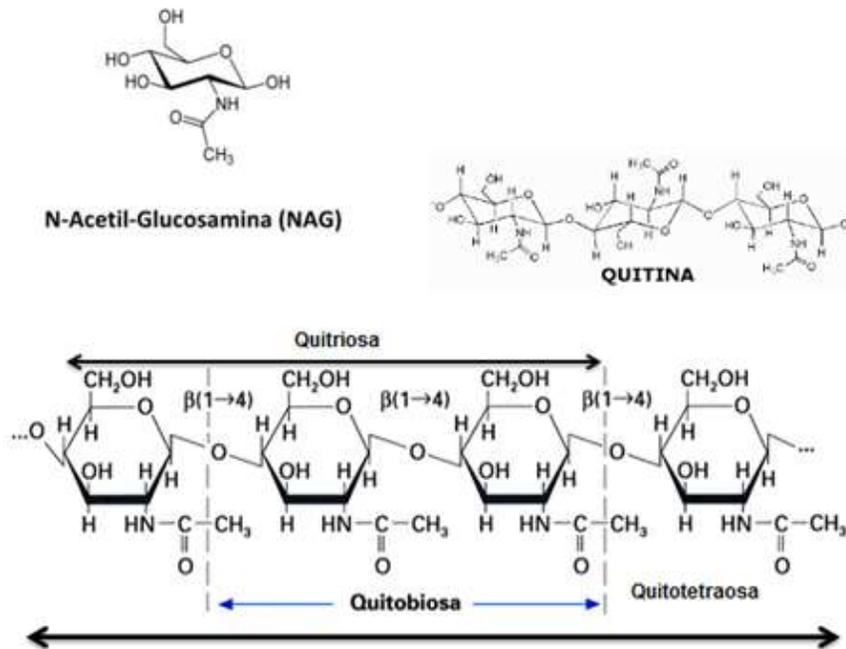


Figura 19 Monómero=NAG, Polímero=Quitina, Número definido de monómeros en la cadena: Quitobiosa (2), Quitotetraosa (3), Quitotetraosa (4). Tomado y modificado de Rahar et al., 2011.

Glucanasas

Las glucanasas son glicosil hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos, los cuales se encuentran en glucanos (polímeros de glucosa). En plantas existen 3 grupos principales de glucanasas:

- β -1,3-glucanasas, cuyo sustrato son los enlaces β -1,3-glucosídicos
- β -(1,3-1,4)-glucanasas, cuyo sustrato son los enlaces alternados β -(1,3-1,4)-glucosídicos
- β -1,4-glucanasas, cuyo sustrato son los enlaces β -1,4-glucosídicos

Por lo que son altamente específicas. Los enlaces β -D-glucosídicos se encuentran en los β -glucanos, componentes de la pared celular de hongos filamentosos (Figura 20).

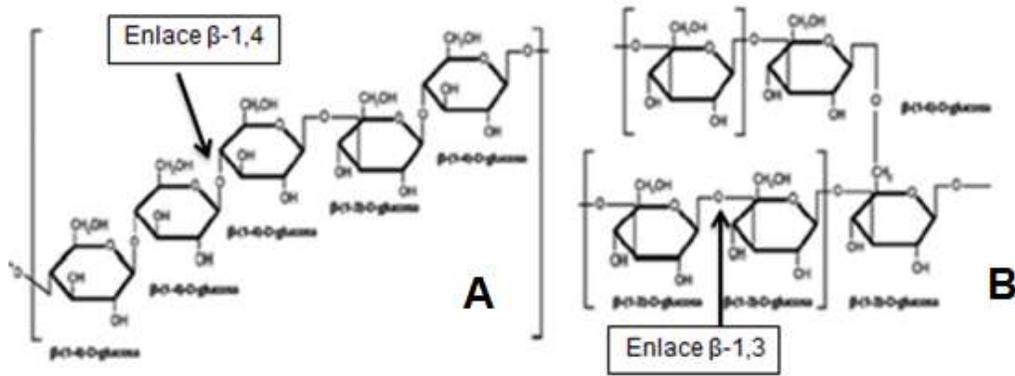


Figura 20 Enlaces glucosídicos. Tomado y modificado de Pizarro et al., 2014. A: Se muestra un polímero de glucano, formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. B: Trímero de enlaces β -1,3-glucosídicos y el último posee ambos enlaces (β -1,3 y β -1,4) para unir otra cadena con enlaces β -1,3-glucosídicos.

El glucano es un polisacárido formado por unidades de glucosa unidas mediante enlaces β -glucosídicos, la configuración β le permite formar cadenas largas, lineales y paralelas unidas entre sí formando una estructura organizada. Como podemos observar en la Figura 21, la diferencia entre la conformación α y β de monómeros de glucosa es en el Carbono 1.

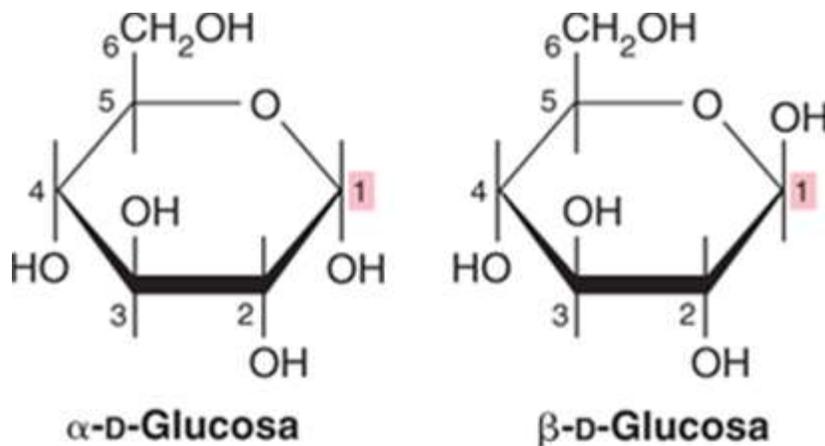


Figura 21 Configuración de la glucosa. Tomada y modificada de McKee et al., 2014.

El mecanismo de hidrólisis de las glucanasas puede clasificarse por el tipo de enlace sobre el que actúan y por su modo de acción en:

Exo- β -1,3-glucanasas hidrolizan los polímeros de β -1,3-glucano desde el extremo no reductor, así produce monómeros de glucosa (Figura 22).

Endo- β -1,3-glucanasas que rompen enlaces internos de la cadena, dando lugar a oligómeros de glucosa (Figura 22).

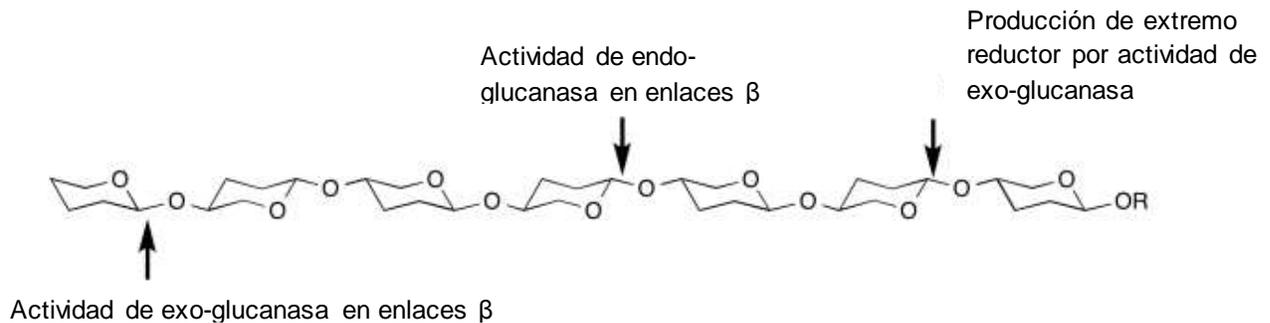


Figura 22 Clasificación de glucanasas por el mecanismo de hidrólisis. Tomado y modificado de Withers et al., (Última consulta 05.11.2017)

Clasificación

La información más detallada procede del análisis de la secuencia de aminoácidos derivada de clonas de DNA genómico y cDNA de 1,3- β -glucanasas de tabaco; de acuerdo a la identidad de secuencia de aminoácidos se clasifican del I al IV (Goñi, 2011). Todas están dentro de la familia PR-2 de PR y de la familia 17 de las glicosil hidrolasas. Las principales características de éstas son:

- 1,3- β -glucanasas de clase I son representadas por isoenzimas básicas como la de tabaco con una masa aproximada de 33 kDa. Se caracteriza por tener una secuencia N-glicosilada en el extremo C-terminal, la cual es responsable de su transporte a vacuola.
- 1,3- β -glucanasas de clase II, III y IV son de carácter ácido, carecen del péptido señal en el extremo C-terminal y son excretadas al medio extracelular. Las glucanasas de clase II son las más abundantes, tienen un peso molecular promedio de 34-36 kDa, y difieren un 48 % en la secuencia de aminoácidos con la clase I.
- 1,3- β -glucanasa de clase III en tabaco, es de 35 kDa y tiene por nombre PR-2d, difiere en más de 40 % con la clase I y II.

-1,3-β-glucanasas de clase IV se asocian a la proteína Tag1 expresada en la antera de las flores de tabaco, está caracterizada por un péptido señal en el extremo N-terminal, tiene una masa de 35 kDa y una identidad del 37.5 % aproximadamente con las demás.

Glucanasas de maíz:

El genoma de maíz (*Zea mays*) se encuentra secuenciado y consta de 2135.08 Mb y su anotación predice 58,291 proteínas. Su genoma está dividido en 10 cromosomas y posee al menos 11 genes anotados que codifican potencialmente para glucanasas, cuyas características se resumen en la tabla 8.

Tabla 8 Glucanasas de maíz. Fuente: NCBI →gene → glucanase *Zea mays* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Glucanase%2C+zea+mays>. Última consulta 02.03.2018, 11 resultados). *Predicho por EXPASY (web.expasy.org/compute_pi/, consultado 02.03.2018)

Nombre	Descripción	Cromo-soma	# de amino-ácidos	PM (kDa)	pl predicho*
geb1	glucan-endo-1,3-β-glucanase homolog 1	3	335	36.85	12.01
gla3	β-glucanase	5	633	69.63	11.56
LOC 103653383	endo-1,3;1,4-β-D-glucanase-like	4	264	29.04	9.52
LOC100281146	endo-1,4-β-glucanase	9	620	68.20	9.49
LOC100285405	endo-1,4-β-glucanase Cel 1	1	621	68.31	9.87
LOC103653384	endo-1,3-1,4-β-D-glucanase-like	4	276	30.36	9.14
LOC100282382	endo-1,3-1,4-β-D-glucanase	8	241	26.51	9.35
LOC103638141	putative endo-1,3(4)-β-glucanase 2	9	Sin dato	Sin dato	7.75
gpm842	α/β-hydrolases superfamily protein	8	241	26.51	9.47
LOC109941680	endo-1,3;1,4-β-D-glucanase-like	8	112	12.32	9.78
gpm530	uncharacterized LOC100194227	8	237	26,07	9.41

Los genes anteriores mejor estudiados y caracterizados son geb1, gla3 y LOC103653383, cuyas características se presentan en la tabla 9.

Tabla 9 Descripción de las funciones de tres glucanasas de maíz.

Gen	Descripción	Referencia
geb 1	Proteína relacionada a la patogénesis (glucanasa clase II). Es inducida por Hg, NaCl, agua contaminada y daño mecánico	Wu et al., 1994
gla 3	Exo- β -glucanasa y usa a la laminarina como sustrato. Proteína liberada por el polen, ayuda a romper la pared celular y a secretar proteínas para perder y/o generar una nueva pared celular.	Suen et al., 2003
LOC 103653383	Endo-1,3;1,4- β -D-glucanasa y comparte actividad de xylo- β -glucanasa en dicotiledóneas.	Thomas et al., 2000

4. β -1,3-glucanasas y su función en la defensa

Las β -1,3-glucanasas son proteínas ampliamente distribuidas en plantas implicadas en muchos procesos metabólicos como estrés, infección y procesos de desarrollo. Debido a su capacidad para hidrolizar β -1,3-glucanos, componentes esenciales de la pared celular de hongos y bacterias, han sido designadas como proteínas relacionadas a la patogénesis perteneciente a la familia 2 (PR-2). Se han aislado de tomate, plátano y tabaco (Fuentes-Silva et al., 2006).

En planta tienen función en división celular, elongación celular, maduración del fruto, germinación de polen, fertilización, embriogénesis somática, germinación de semillas y formación de flores (Shen-Quan et al., 1989). Su función en defensa se ha demostrado por varias líneas de evidencias que son:

- Inducción de glucanasas en respuesta de defensa:

En plantas de soya atacadas por *Phytophthora sojae* se inducen 1,3- β -glucanasas liberando β -glucanos que a su vez funcionan como elicitores para activar otros mecanismos de defensa del hospedero, ya que interactúan con receptores de membrana y activan la cascada de señalización PTI (Esquerré-Tugayé et al., 2000). En *Arabidopsis thaliana*, se encontraron glucanasas inducidas por ácido salicílico, por etefón (sf) y al infectar con extracto de *Erwinia carotovora* que también induce PR en tabaco (Fritig et al., 1993).

- Sobreexpresión de glucanasas en plantas transgénicas y su efecto en la resistencia a patógenos fúngicos

En plantas de cacahuate transformadas con una β -1,3-glucanasa de tabaco presentan una reducción en el número de manchas y un retraso en la aparición de la enfermedad respecto a plantas no transformadas, cuando se inocularon con el patógeno fúngico *Cercospora arachidicola*. Asimismo, al retarse con *Aspergillus flavus* se notó un retraso en la propagación de las hifas y se redujo la aparición de aflatoxinas en las semillas (Balasubramanian et al., 2012).

- Mutación de glucanasas y su efecto en la respuesta a patógenos fúngicos

En *Nicotiana sylvestris* se generó una mutante deficiente de glucanasas, la cual se infectó con virus necrosantes, se observó que las plantas compensaron la actividad de glucanasas produciendo proteínas “ersatz” (Minic, 2008).

- Inhibición de glucanasas y su efecto en la respuesta a patógenos fúngicos

Resulta interesante encontrar organismos patógenos que han evolucionado y han generado mecanismo de contradefensa para neutralizar la defensa de su hospedero, tal es el caso de *Phytophthora sojae* que es un oomiceto patógeno, capaz de sintetizar proteínas inhibidoras de glucanasas (GIPs, por sus siglas en inglés) producidas por plantas de soya (Rose et al., 2002). La soya tiene 2 glucanasas: endoglucanasa A y B (EGaseA y EGase B), y la proteína GIP1 inhibe selectivamente a la EGaseA (Fig. 23).

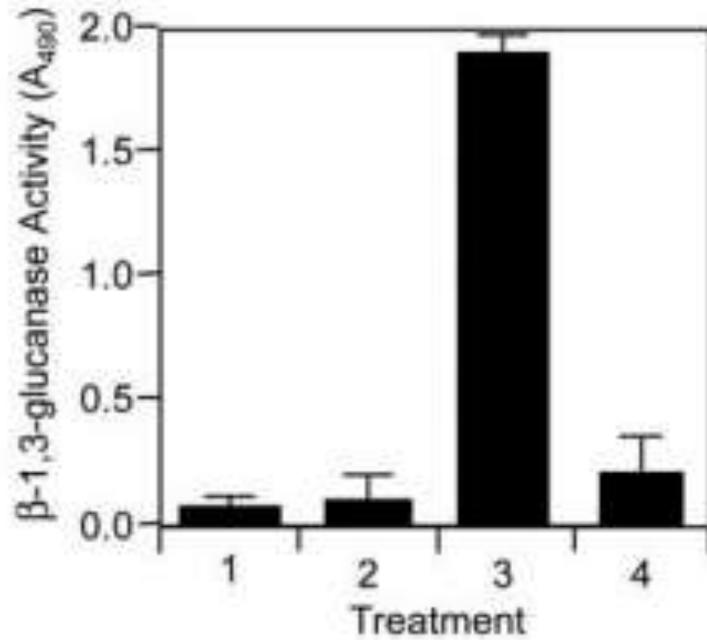


Figura 23 Actividad de glucanasa de extractos de cultivos de frijol de soja. Tratamiento 1 solo amortiguador, tratamiento 2 GIP1, tratamiento 3 EGaseA, tratamiento 4 EGaseA-GIP1 (Rose et al., 2002)

D. Antecedentes inmediatos

La fumonisina B1 (FB1) es un factor de virulencia de *F. verticillioides*, pues contribuye a la infección y colonización de plántulas de maíz. Esto está sustentado por:

1. Los genes del locus *FUM* se expresan en las etapas tempranas de la infección *in planta* y ocurre la síntesis de FB1 (Williams et al., 2006; Sánchez-Rangel et al., 2012).
2. Cuando cepas de *F. verticillioides* son incapaces de infectar maíz y de producir FB1, son complementadas con una secuencia genómica que contiene el locus *FUM* íntegro, se obtiene una cepa productora de FB1, capaz de colonizar plántulas de maíz y de causar todos los síntomas de la infección (Glenn et al., 2008).

Nuestro grupo de investigación reportó que la FB1 inhibe a las β -1,3-glucanasas básicas de maíz (Sánchez-Rangel, et al., 2012) y que esta inhibición ocurre *in vivo* al infectar embriones de maíz con *F. verticillioides* (Galeana-Sánchez et al., 2014). Las isoformas básicas, determinadas por corrimiento electroforético, son más sensibles que las isoformas ácidas a esta inhibición. Sin embargo, conocemos poco sobre estas enzimas. En el genoma de maíz hay al menos 12 secuencias relacionadas que tienen un grado de identidad que va del 64% al 100% con β -1,3-glucanasas. En otros modelos planta-patógeno se han identificado proteínas (GIP1, producida por *Phytophthora sojae*) capaces de inhibir β -1,3-glucanasas de plantas de soja (Ham et al., 1997). A diferencia de GIP1 y otros inhibidores, la FB1 es una molécula no proteica, por lo que resultará novedosa la caracterización de la interacción e inhibición de la FB1 con β -1,3-glucanasas purificadas de maíz. Se ha propuesto que las β -1,3-glucanasas básicas son blancos de la fumonisina B1, por lo que identificar las β -1,3-glucanasas que son sensibles al patógeno contribuye a establecer la función de la fumonisina como un factor de virulencia del hongo patógeno *F. verticillioides*.

III. Hipótesis

En la interacción entre *F. verticillioides* y maíz la fumonisina B1 disminuye la actividad enzimática de las isoformas básicas de las β -1,3-glucanasas.

IV. Objetivos generales y particulares

Objetivo general: Purificar, identificar y caracterizar las β -1,3-glucanasas básicas sensibles a inhibición por fumonisina B1

Objetivos particulares:

1. Identificar las β -1,3-glucanasas básicas de maíz susceptibles a inhibición por FB1
2. Purificar a las β -1,3-glucanasas básicas sensibles a FB1 a partir de embriones de maíz
3. Obtener los parámetros bioquímicos (pH y temperatura óptimos) de la actividad de las β -1,3-glucanasas básicas sensibles a la FB1

V. Materiales y métodos

A. Material biológico: cultivo de *Fusarium verticillioides*

1. Preparación de medio de cultivo para cepas de *F. verticillioides* (Galeana-Sánchez, 2014)

PDA 0.5X, para preparar 300 mL del medio para 10 cajas Petri de plástico, pesar 5.85 g de PDA y 1.35 g de agar. Condiciones de esterilización 20 minutos, 121°C, 15 psi.

2. Crecimiento de cepas de *Fusarium verticillioides* (Windels et al., 1988)

A partir de frascos con sustrato y vermiculita inoculados con las cepas de *F. verticillioides* (MY3 y MY5; Sánchez-Rangel et al., 2005), se esparció sobre cajas Petri de PDA y se incubó a 28°C para obtener los cultivos. Después se extrajo un cubo de aproximadamente 1 cm³ del medio para resembrar en PDA y tener cultivo fresco libre de vermiculita. Para favorecer la producción de conidios, se alternó la incubación a 28°C en luz fluorescente con oscuridad. Después de 8-10 días se observaba que el hongo llenaba la caja.

3. Conteo de conidios y preparación de la suspensión (Galeana-Sánchez, 2014)

Se utilizaron cultivos de 10 días de cada una de las cepas de *F. verticillioides* en medio PDA a 29°C bajo luz fluorescente, se adicionó entre 5-10 mL de agua estéril a cada caja y se agitaron a 150 rpm durante 60 a 90 min. Con una punta estéril se raspó delicadamente para desprender los conidios del micelio y se recolectó en tubos de 16 x 150 mm. Para el conteo de conidios se usó una cámara de Neubauer y en el microscopio óptico se contaron los conidios de los cuadrantes de las esquinas usando el objetivo de 40x, el número de conidios se calculó con la fórmula:

$$C \times FD \times 10 = \frac{\text{Conidios}}{\mu\text{l}}$$

C= promedio de conidios

FD=factor de dilución para el conteo de conidios en la cámara

Con el conteo de conidios, se preparó 1 mL de una concentración de 5000 conidios/μL.

B. Material biológico: embriones de maíz embebidos

1. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz (Galeana-Sánchez, 2014)

Se usaron semillas de maíz en buen estado de la raza "Chalqueño", los embriones se obtuvieron mediante la disección manual de la semilla usando una navaja para eliminar el endospermo y cuidando la integridad del embrión; los embriones colectados se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Para desinfectarlos se usaron 100 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % y se agitaron por 2 minutos. Se realizaron 4 lavados con agua estéril por 2 min cada vez con agitación vigorosa, después se dejaron secar entre 2 servitoallas estériles, bajo campana. Para el crecimiento, se distribuyeron los embriones en contacto con el agar al 0.9 % y se incubaron a 29°C bajo luz fluorescente. Los embriones germinan entre 24h y 48h.

2. Preparación de medio de cultivo para embriones (Galeana-Sánchez, 2014)

Agar 0.9%, se prepararon 400 mL del medio para 10 cajas Petri de plástico. Se pesaron 3.6 g de agar y las condiciones de esterilización fueron 20 minutos, 121°C, 15 psi.

3. Inoculación de embriones con las cepas de *F. verticillioides* (Galeana-Sánchez, 2014)

A cada embrión colocado en el agar 0.9 %, se les inoculó con 10 µL de la suspensión preparada de 5000 conidios/µL y se incubó a 29°C con luz fluorescente por 24 h o 48 h dependiendo del experimento. Para su recolección se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

C. Técnicas bioquímicas: extracción de proteínas y ensayo de actividad para β-1,3-glucanasas

1. Extracción de proteínas totales de los embriones de maíz (Galeana-Sánchez, 2014, con modificaciones)

Se pesaron 75 embriones, posteriormente se molieron con nitrógeno líquido hasta obtener polvo fino. Se adicionaron 2.5 mL de amortiguador de extracción (Ver apéndice), por cada 2 g de embriones y fueron mezclados con espátula hasta obtener una pasta. El macerado se transfirió a varios microtubos de 2 mL. Los tubos se centrifugaron en microfuga MiniSpin Eppendorf a 13400 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó la capa de lípidos formada en la parte superior y se tomó el sobrenadante, se colectó en microtubos de 1.5 mL. Si aún se presentaba demasiado material particulado,

los tubos se centrifugaban nuevamente bajo las mismas condiciones. Se almacenaron alícuotas de 500 μ L con 20% de glicerol a -70°C para los distintos experimentos.

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

Se preparó la curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA) y los componentes indicados en el apéndice. Se utilizaron 3 réplicas por cada punto de la curva y por duplicado en el caso de las muestras. Se calculó la concentración de proteína de cada muestra mediante regresión lineal. La absorbancia de las muestras se leyó a $\lambda=595\text{nm}$ en celdas de plástico. Se muestra una curva típica obtenida en el apéndice.

3. Electroforesis de proteínas

Los geles de poliacrilamida-SDS se prepararon de acuerdo a los componentes del apéndice, utilizando separadores de 0.75 mm. De cada muestra se cargó en el pozo aprox. 20-50 μ g de proteína mezclando con amortiguador de carga (1:2). El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham a 95 V por 3 horas, las muestras antes de cargarlas en el gel se calentaron 5 minutos a 95°C . Para revelar las proteínas en el gel se incubó por 2 horas en solución fijadora, 2 horas en solución teñidora (azul de Coomassie) y 1 hora en solución desteñidora. Se almacena a 4°C en solución de almacén (glicerol 5%).

4. Electroforesis nativa para observar la actividad de β -1,3-glucanasas en gel (Sánchez-Rangel et al., 2012, con modificaciones)

La mezcla de proteínas se resolvió por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones nativas (sin SDS ni agentes reductores). Los geles – separador y concentrador- se prepararon de acuerdo a los componentes descritos en el apéndice y utilizando separadores de 1.5 mm. De cada muestra se cargó en el pozo un volumen equivalente a 100-200 μ g de proteína total, mezclado con el amortiguador de carga en una porción 1:4. El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham Biosciences a 50 V por 15-17 horas a 4°C o a 95 V por 3.5 horas a temperatura ambiente.

5. Ensayo de la actividad de β -1,3-glucanasas en gel nativo (Sánchez-Rangel et al., 2012, con modificaciones)

El gel se desprendió cuidadosamente del vidrio y se colocó en un recipiente de plástico y se cubrió con 5 mL de solución de laminarina (2.5 mg/mL) en amortiguador de acetato de sodio pH 5.0 y se incubó por 1-2 h a 40°C con agitación suave y constante.

Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó la solución anterior y se realizaron de 1-2 lavados de 5-7 min cada uno con fosfato de potasio 0.05 M pH 7.0, seguido de otro lavado de 5 minutos de agua desionizada. El agua se sustituyó por 5.0 mL de reactivo de glucosa (SIGMA) y se incubó 20 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Para el desarrollo de color se añadió a la solución anterior azul de tetrazolio o NBT (0.25 mg/mL) y se incubó a 40°C por una noche.

6. Determinación de la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas, mediante método espectrofotométrico A.

En microtubos de 1.5 mL se hizo la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

	Amortiguador *	Solución sustrato**	Proteína
Blanco	400 μ L		
Blanco de reacción	200 μ L	200 μ L	
Muestra	100 μ L	200 μ L	100 μ L

*El amortiguador usado es acetato de sodio 0.05M, pH 5.0. **La solución sustrato es 5mg/mL de laminarina-azure en amortiguador de acetato de sodio 0.05M, p =5.0.

Se mezclaron por inversión del tubo y fueron incubados 2 h a 37°C, parar la reacción con 1 mL de etanol frío (almacenado a 4°C) y dejar 2 horas en hielo. Después se centrifugó 5 min a 4°C a 13400 rpm en la microcentrífuga (Mini Spin, Eppendorf), se decantó y leyó el sobrenadante a 590 nm.

7. Determinación de la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas, mediante método espectrofotométrico B.

En microtubos de 0.600 mL se hizo la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

	Amortiguador *	Solución sustrato**	Proteína
Blanco	400 μ L		
Blanco de reacción	200 μ L	200 μ L	
Muestra	150 μ L	200 μ L	50 μ L

*El amortiguador usado es acetato de sodio 0.05M, pH 5.0. **La solución sustrato es 2.5 mg/mL de laminarina en amortiguador de acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0.

Se mezcló por inversión del tubo y se incubó 30 min a 40°C, se tomaron 200 µL de la mezcla de reacción y se colocaron en un tubo de 13 x 100 mm. En el tubo se mezcló con 600 µL de amortiguador de fosfatos pH 7.0 y 200 µL de reactivo de glucosa. Se leyó a 595nm.

8. Ensayo para detección de azúcares reductores con DNS en placa

En microtubos de 0.600 mL se hizo la mezcla de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

	Amortiguador *	Solución sustrato**	Proteína
Blanco	160-250 µL		
Blanco de reacción	150 µL		10-100 µL
Muestra		150 µL	10-100 µL

*El amortiguador usado es acetato de sodio 0.05M, pH=6.0. **La solución sustrato es 2.5 mg/mL de laminarina en amortiguador de acetato de sodio 0.05M, pH=6.0.

Se mezcló en vórtex el tubo y con microcentrífuga (Mini-Spin, Eppendorf) se concentraron la mezcla de reacción en el fondo del tubo, se incubó 30 min a 40°C, se tomaron 50-100 µL de la mezcla de reacción y se colocaron en otro microtubo de 0.600 mL a que previamente se le añadieron 50 µL de reactivo DNS***. Se procedió a calentar 5 minutos a 95°C, después se colocó en hielo 5 minutos, agregar agua cbp 100 µL, se transfirió a una microplaca para leer a 540nm. Para conocer la cantidad de azúcares reductores detectados, se hizo una curva patrón con glucosa (Ver apéndice) usando el reactivo DNS.

***Ver apéndice

9. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 1)

Los geles de poliacrilamida sin SDS (nativo) se prepararon de acuerdo a los componentes del apéndice, utilizando separadores de 0.75mm. De cada muestra se cargó en el pozo aprox. 200 µg de proteína mezclado con amortiguador de carga para

gel semidesnaturalizante (SDS 1%, ver apéndice). El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham a 95V por 2.5 - 3 horas, las muestras antes de cargar para este experimento no se calentaron.

Al salir el gel, se lavó dos veces con 10 mL de una solución de isopropanol 25% en Tris 10 mM (pH=8.0) por 10 minutos con agitación (solución de lavado), a temperatura ambiente. Después del segundo lavado, se enjuagó el gel con amortiguador de acetatos 0.05M pH=5.0 por 10 minutos, a temperatura ambiente (por duplicado). Después del segundo enjuague, se evaluó la actividad de glucanasas en gel como se describe en la sección C4.

10. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 2)

Los geles de poliacrilamida sin SDS (nativo) se prepararon de acuerdo a los componentes del apéndice, utilizando separadores de 0.75 mm. De cada muestra se cargó en el pozo aprox. 200 µg de proteína mezclado con amortiguador de carga para gel desnaturalizante (ver apéndice). El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham a 95V por 2.5-3 horas, las muestras antes de cargar calentar por 5 min a 95°C.

Al salir el gel, se lavó con 20 mL de una solución de isopropanol 20% en amortiguador de acetatos 0.05M pH=5.0 cada 10 minutos hasta completar 5 lavados (solución de lavado), con agitación a temperatura ambiente. Después del lavado, se sumergió el gel en 20 mL de una solución de Tween-20 (1%) en amortiguador de acetatos 0.05 M pH=5.0, por 10 minutos hasta completar 5 lavados, con agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el gel dos veces más únicamente con el amortiguador de acetatos y se realizó el ensayo de actividad de glucanasas en gel (sección C4).

11. Electroforesis/Geles semidesnaturalizantes (Protocolo 3)

Los geles de poliacrilamida sin SDS (nativo) se prepararon de acuerdo a los componentes del apéndice (gel separador con 3 mg/mL de laminarina), utilizando separadores de 0.75mm. De cada muestra se cargó en el pozo aprox. 200 µg de proteína mezclado con amortiguador de carga para gel semidesnaturalizante (SDS 2%, ver apéndice). El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham a 25 mA por 3-4 horas, y las muestras se calentaron a 95°C 3 minutos antes de cargar. El gel se lavó dos veces con 10 mL de una solución de Tritón 1% en amortiguador de

acetatos 0.05M pH=5.0 por 10 minutos a temperatura ambiente y después con 10 mL con únicamente amortiguador de acetatos en un baño de agua a 37 °C con agitación. Al término se incubó el gel por 2 horas a 37°C sobre un vidrio en cama de papel mojado para secar, después incubar por 15-16 horas en 200 mL de amortiguador de acetatos a 37°C y se procedió al ensayo de actividad de glucanasas en gel.

D. Técnicas bioquímicas: Purificación y caracterización de las β -1,3 glucanasas.

Después de extraer las proteínas de 75 embriones se continuó con la purificación:

1. Fraccionamiento con sulfato de amonio

Se midió el volumen del extracto de proteínas y se transfirió a un vaso de precipitados de 10 mL para adicionar sulfato de amonio para obtener 60% de saturación (3.7 g por cada 10 mL), el sulfato de amonio se añadió poco a poco con agitación en un recipiente de hielo. La suspensión se transfirió a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 3600 rpm por 25 min en una centrífuga Beckman GS-6R. El sobrenadante se almacenó mientras que el precipitado se disolvió en 8-12 mL de amortiguador de extracción II (ver apéndice) y se procedió a aclarar por centrifugación.

2. Ultrafiltración

Se transfirió la solución resuspendida a un tubo corex de vidrio y se centrifugó 20 min a 10,500 rpm en una centrífuga Jouan MR1812. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se transfirió a un tubo Amicon Ultra-K10 y se centrifugó a 3600 rpm por 30-70 min hasta tener 1 mL en la parte superior del filtro, en centrífuga Beckman GS-6R a 5°C. La fracción retenida se transfirió a un microtubo de 2 mL y se almacenó a -20°C.

3. Cromatografía de Intercambio Iónico

Para la purificación de las glucanasas se eligió una columna empacada con 1 mL de Hi Trap SP XL (GE Healthcare). La columna se colocó en un equipo FPLC GE Healthcare con detector D-900 y bomba P-900. Todas las soluciones, incluyendo la muestra proteica, fueron filtradas mediante Nylon 0.45 μ m el día de uso. La muestra proteica no tuvo más de 48 h de almacenamiento a -20°C.

Antes de su uso, la columna se equilibró con al menos 5 volúmenes de columna con amortiguador de acetatos 0.05M a pH 5.0 a un flujo de 0.1 - 0.4 mL/min. Se inyectaron 500 μ L de muestra a 0.4 mL/min, se lavó con 2 volúmenes de columna y se comenzó el

gradiente lineal de NaCl de 0 - 1 M (amortiguador de acetatos 0.05 M + NaCl 2 M). Se generó un cromatograma por el sistema Unicorn y se recolectaron las fracciones (150 μ L cada una, nombradas por el número de fracción que da el sistema) para ensayo de actividad.

Nota: se deben de inyectar 8 muestras para tener un volumen final de 1.2 mL de cada fracción y hacer los experimentos correspondientes

4. Cromatografía de exclusión molecular

Para la purificación de las glucanasas se eligió una columna empacada con 24 mL de resina Superdex 200 (GE Healthcare). La columna se colocó en un equipo FPLC GE Healthcare con detector D-900 y bomba P-900. Todas las soluciones, incluyendo la muestra proteica, fueron filtradas por membranas de Nylon 0.45 μ m el día de uso. La muestra proteica no tuvo más de 36 h de almacenamiento a -20°C .

La columna se equilibró con al menos 2 volúmenes de columna con amortiguador de acetatos 0.05M + 300 mM de NaCl a pH 5.0 a un flujo de 0.4-0.8 mL/min. Se inyectaron 500 μ L de muestra de las fracciones de intercambio iónico con actividad de glucanasa a 0.4 mL/min, se lavó con 0.2 volúmenes de columna y se corrió por 2x volúmenes de columna. Se generó un cromatograma por el sistema Unicorn y se recolectaron las fracciones (500 μ L cada una) para ensayo de actividad.

5. Precipitación de proteínas con acetona

En un microtubo de 2 mL, se mezclaron 500 μ L del extracto proteico (fracción) con 1.5 mL de acetona fría (-20°C) y se mezcló por inversión. Se incubó a -20°C por una noche y se centrifugó a 4°C por 15 min a 13400 rpm en microcentrífuga MiniSpin Eppendorf. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar las trazas de acetona por 10 min manteniendo el tubo abierto. Si no se usaba de inmediato, se dejaba el precipitado en el tubo y se almacenaba a 4°C . El precipitado se disolvió en 20 - 60 μ L de amortiguador de carga desnaturizante y se calentó 5 - 10 min a 95°C para facilitar la disolución.

E. Ensayos de actividad antifúngica de las β -1,3-glucanasas de maíz

1. Experimento del efecto de extracto de proteína de maíz en discos durante el crecimiento de *F. verticillioides* en agar PDA

Se inocularon 1×10^6 conidios de las cepas de *F. verticillioides* (MY3 y MY%) en el centro de una caja Petri de PDA y se incubaron por 48h a 29°C con luz lo que permitió

el desarrollo de la colonia. Se colocaron discos de papel filtro impregnados con extracto proteico, tanto de crudo como de fracciones purificadas (10-80 μL) a unos 5 mm del borde de la colonia. Se incubó la caja por 24h a 29°C con luz y se fotografiaron las cajas.

2. Experimento en placa del efecto de extracto/fracción de proteína de maíz y/o FB1 en el crecimiento de *F. verticillioides* en medio Czapeck modificado

Se incubaron 10,000 o 20,000 conidios de las dos cepas de *F. verticillioides* en medio Czapeck modificado (Ver apéndice) en los pozos de una microplaca de 96 pozos, con los tratamientos de proteína y fumonisina B1 de acuerdo a la siguiente tabla:

	Medio Czapeck (μL)	Volumen de conidios a partir de 1000 con/ μL (μL)	Agua (cbp 250 μL)	FB1 2 mM	Extracto de proteína
Blanco medio	200		50		
Blanco FB1 50μM	200		43.75	6.25μl	
Blanco FB1 100μM	200		37.5	12.5μl	
Blanco C1 proteína	200		40		10μl
Blanco C2 proteína	200		30		20μl
Blanco FB1 50μM + C1	200		33.75	6.25μl	10μl
Blanco FB1 50μM + C2	200		23.75	6.25μl	20μl
Blanco FB1 100μM + C1	200		27.5	12.5μl	10μl
Blanco FB1 100μM + C2	200		17.5	12.5μl	20μl
<i>F. vert.</i> Control	200	10-20	30-40		
<i>F. vert.</i> + C1 proteína	200	10-20	20-30		10μl
<i>F. vert.</i> + C2 proteína	200	10-20	20-10		20μl
<i>F. vert.</i> + FB1 50μM	200	10-20	23.75-33.75	6.25μl	
<i>F. vert.</i> + FB1 100μM	200	10-20	17.5-27.5	12.5μl	
<i>F. vert.</i> + C1 + FB1 50μM	200	10-20	13.75-23.75	6.25μl	10μl
<i>F. vert.</i> + C1 + FB1 100μM	200	10-20	7.5-17.5	12.5	10
<i>F. vert.</i> + C2 + FB1 50μM	200	10-20	3.75-13.75	6.25	20
<i>F. vert.</i> C2 + FB1 100μM	200	10-20	0-7.5	12.5	20

C1: 6.2 μg proteína de fracciones no retenidas (11-14), Act. Esp. 0.0334 mg glu h⁻¹ mg⁻¹

C2: 12.4 μg proteína de fracciones no retenidas (11-14), Act. Esp. 0.0334 mg glu h⁻¹ mg⁻¹

Los blancos se hicieron por duplicado y las muestras por triplicado. Se leyó la densidad óptica (crecimiento del hongo) a $\lambda=630$ nm cada 12 h por 3 días.

Para los ensayos con las fracciones de intercambio iónico (glucanasas básicas), el volumen final fue de 310 μL y se usó 25 μM de FB1, por lo que se modificó el volumen del stock de FB1 2 mM para añadir 3.8 μl en la mezcla de reacción. También se usaron para C1 de proteína 40 μL y para C2 fueron 80 μL de proteína. Se dejó constante el volumen de medio Czapeck a 200 μl y se usaron 20,000 conidios (20 μL a partir de 1000 con/ μL) de las cepas de *F. verticillioides*, lo demás se ajustó con agua para llegar a los 310 μL .

Datos C1 PI: 3.58 μg proteína de fracciones retenidas (52-59), 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Datos C2 PI: 7.17 μg proteína de fracciones retenidas (52-59), 0.05950 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Datos C1 PII: 5.0 μg proteína de fracciones retenidas (62-68), 0.03352 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Datos C2 PII: 10.0 μg proteína de fracciones retenidas (62-68), 0.03352 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$

VI. Resultados

A. Purificación de las β -1,3-glucanasas

1. Actividad en extracto crudo

Para la purificación de las β -1,3-glucanasas se partió de un extracto total de proteínas solubles obtenidas de 75 embriones de maíz imbibidos por 24h con luz. La cantidad de proteína extraída de estas muestras varió entre 7.251-19.057 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen total de 10 ± 0.5 ml y la actividad específica de glucanasa se encontró entre 0.0026-0.1957 $\text{mg glucosa h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ según se muestra en la tabla 10.

Tabla 10 Proteína total extraída y actividad específica de β -1,3-glucanasa en muestras de embriones de maíz germinados por 24 horas.

Extracto total de proteína 8x	Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad total de proteína obtenida (mg)	Actividad específica ($\text{mg glucosa h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)
D0828	17.593	8.797	0.196
D0830	7.251	3.626	0.049
D1157	15.217	7.609	0.212
D1201	15.654	7.827	0.003
L0746	19.057	9.529	0.061
L0756	17.726	8.863	0.042
L1153	15.882	7.941	0.061
L1201	17.745	8.873	0.065
Promedio	15.766	7.883	0.086

2. Determinación de la concentración de sulfato de amonio para precipitar la actividad de β -1-3-glucanasas a partir de extractos crudos de proteína.

Como primer paso de purificación se planteó la precipitación con sulfato de amonio por lo que se realizaron experimentos para determinar el % de saturación de esta sal en la que se precipitara cuantitativamente la actividad de β -1,3-glucanasa a partir de los extractos de proteína total. La tabla 11 muestra que a 60 % de saturación de sulfato de amonio se precipita la mayor actividad de β -1,3-glucanasa.

Tabla 11 Determinación del porcentaje de saturación de sulfato de amonio para la precipitación cuantitativa de la actividad de β -1,3-glucanasa de embriones de maíz. Porcentaje de actividad con respecto al extracto crudo.

% de saturación sulfato de amonio	% Actividad en precipitado	% Actividad en sobrenadante
40%	715%	ND
60%	744%	0%
80%	120%	0%

ND: No determinado

3. Separación de las proteínas por cromatografía de intercambio iónico

Una vez establecido el protocolo de extracción de proteínas solubles y la precipitación con sulfato de amonio (60% saturación), las fracciones precipitadas se redisolieron en amortiguador, se desalaron y concentraron mediante filtración molecular. Las proteínas se separaron por FPLC en una columna de intercambio catiónico Hi Trap SP XL de 1 mL, usando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M. La figura 24 muestra un cromatograma típico obtenido en este trabajo; muestra los picos formados por el paso de proteínas no retenidas en la columna en las primeras fracciones (1-25) y el pico formado por la elución de proteínas en un gradiente lineal de NaCl (40-80), seguido de un lavado de la columna con 1 M NaCl. Las fracciones no retenidas corresponden a proteínas ácidas y el gradiente lineal permite separar gradualmente las proteínas unidas a la columna dependiendo de la fuerza con la que estén unidas a ella.

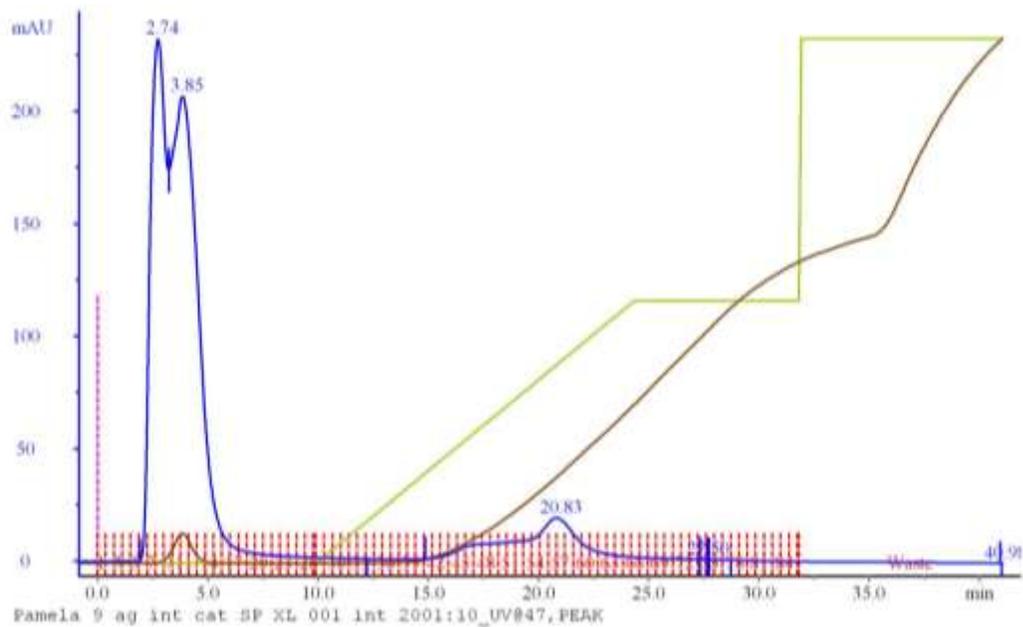


Figura 24 Cromatograma de intercambio iónico en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. Las proteínas se separaron por FPLC en una columna de intercambio catiónico Hi Trap SP XL usando un gradiente de NaCl (0 – 1 M). Las líneas rojas muestran el número de fracción a la que corresponde, la línea azul la lectura del detector a 280 nm para detectar a las proteínas, la línea café es la conductancia de la fracción, la línea verde el gradiente de NaCl y la línea rosa la inyección de la muestra.

El cromatograma de la figura 25 es la amplificación del pico formado por la elución con el gradiente de sal mostrado en la figura 24 y fue usado para elegir las fracciones. Además se observa el área del pico que es un indicador de la cantidad de proteína en la fracción determinado por la absorbancia a $\lambda = 280$ nm de los grupos aromáticos de las proteínas.

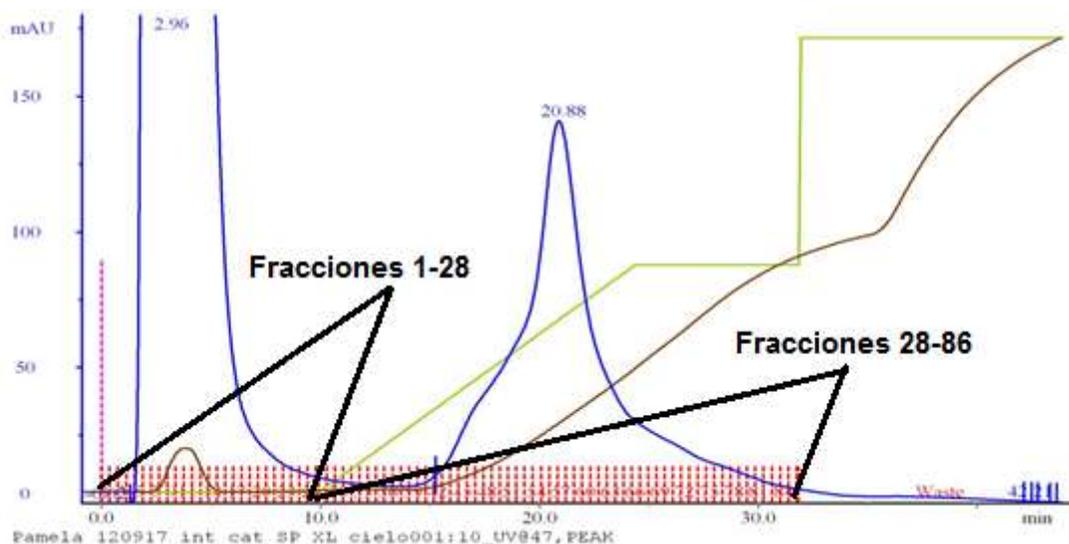


Figura 25 Amplificación del pico del cromatograma de la Figura 24. Las líneas rojas muestran el número de fracción a la que corresponde, la línea azul la lectura del detector a 280 nm para detectar a las proteínas, la línea café es la conductancia de la fracción, la línea verde el gradiente de NaCl y la línea rosa la inyección de la muestra.

Se colectaron tanto las fracciones no retenidas como las retenidas para la determinación de la actividad enzimática y corrimiento en gel de electroforesis de poliacrilamida-SDS.

4. Análisis de las fracciones purificadas provenientes de cromatografía de intercambio iónico; Tabla de Purificación.

Las fracciones obtenidas en los pasos cromatográficos se analizaron para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática, con el fin de determinar el grado de pureza y rendimiento de la purificación, según se observa en la tabla de purificación (tabla 12).

Tabla 12 Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas separadas por cromatografía de intercambio iónico (IC).

Paso	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (mg glu h ⁻¹)	Actividad específica (mg glu h ⁻¹ 1mg ⁻¹)	Veces de Purificación	Rendimiento (%)
Homog. crudo	0.5	7.883	0.0120	0.00152	1.00	100
Ppt. de sulf. amon (60%)	0.6	9.509	0.0112	0.00118	0.77	93.613
Fracc. IC (10-14)	1.2	0.705	0.0066	0.00936	6.16	54.967
Fracc. IC (45-48)	1.2	0.034	0.001	8.626	236.04	8.935
Fracc. IC (52-57)	1.2	0.13	0.0012	0.00923	6.07	9.674
Fracc. IC (58-61)	1.2	0.197	0.002	1.712	46.832	18.427

A partir de las fracciones 56, 57 y 59 de intercambio iónico, se tomó una alícuota de 500 μ L para inyectar a columna de exclusión molecular para fraccionar a las glucanasas aprovechando esta propiedad.

5. Separación de proteínas por cromatografía de exclusión molecular

De las fracciones 56, 57 y 59 de la cromatografía de intercambio iónico con mayor actividad, se separaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 de 24 mL que separa masas moleculares entre 10-600 kDa, la figura 26 presenta un cromatograma típico obtenido de esta separación donde se observan varios picos que son representativos de las proteínas presentes en la fracción.

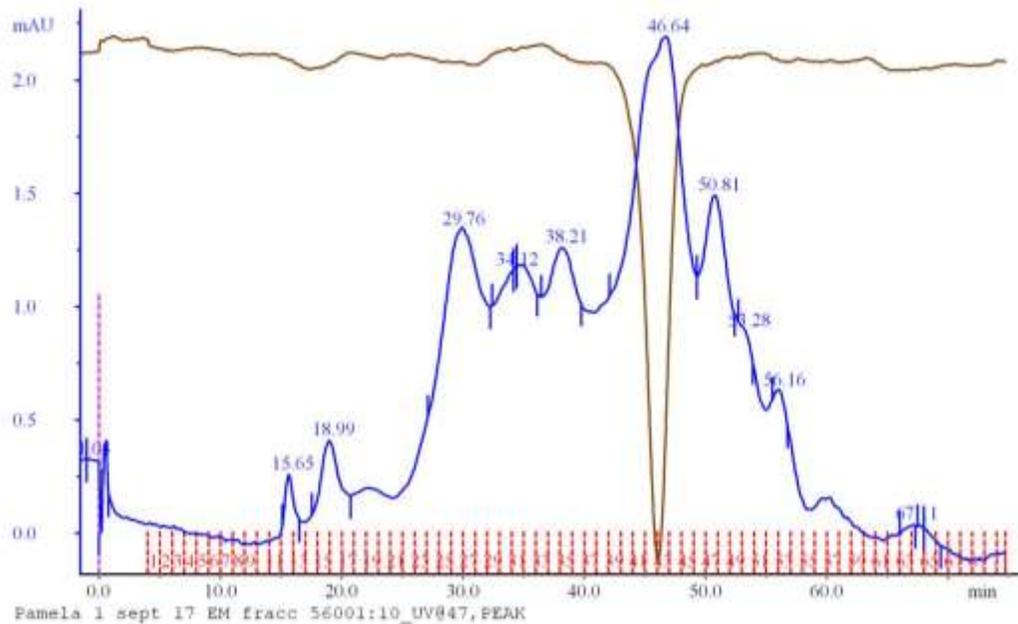


Figura 26 Cromatograma de exclusión molecular en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. Las proteínas se separaron por FPLC en una columna Superdex 200. Línea azul: detector de fluorescencia Abs_{280} para detectar a las proteínas Línea café: conductancia de la fracción. Líneas rojas: fracciones. Línea rosa: inyección de la muestra.

6. Análisis de las fracciones purificadas provenientes de cromatografía de exclusión molecular; Tablas de Purificación.

Las fracciones obtenidas en los pasos cromatográficos se analizaron para determinar la concentración de proteína y la actividad enzimática, con el fin de determinar el grado de pureza y rendimiento de la purificación, según se observa en la tabla de purificación (tablas 13 y 14).

Tabla 13 Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas, intercambio iónico (IC 56) y exclusión molecular (EM).

Paso	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (mg glu h ⁻¹)	Actividad específica (mg glu h ⁻¹ mg ⁻¹)	Veces de Purificación	Rendimiento (%)
Homogenado Crudo	0.5	7.883	0.0120	0.00152	1.00	100
Ppt. de sulf. amon. (60%)	0.6	9.509	0.0112	0.00118	0.78	93.613
Fracción IC 56	1.2	0.167	0.0013	0.00767	5.04	10.669
Fracción EM 15	0.5	0.003	0.0018	0.59156	389.18	14.789
Fracción EM 25	0.5	0.004	0.0021	0.52476	345.24	17.492
Fracción EM 26	0.5	0.003	0.0018	0.61472	404.42	15.368
Fracción EM 36	0.5	0.005	0.0022	0.44760	294.47	18.650
Fracción EM 38	0.5	0.003	0.0018	0.59928	394.26	14.982

A través de estos pasos se logró un enriquecimiento de más de 400 a 2000 veces de la actividad de β -1,3-glucanasa (Tablas 13-14), sin embargo, la cantidad de proteína fue muy baja para poder realizar ensayos bioquímicos y de actividad por lo que la mayor parte de los resultados que se presentan sobre la caracterización bioquímica y de actividad corresponden a fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico.

Tabla 14 Tabla de Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz germinados por 24 horas, intercambio iónico (IC57) y exclusión molecular (EM).

Paso	Volumen de fracción (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (mg glu h ⁻¹)	Actividad específica (mg glu h ⁻¹ mg ⁻¹)	Veces de Purificación	Rendimiento (%)
Homogenado Crudo	0.5	7.883	0.012	0.00152	1.00	100
Ppt. sulfato amon.	0.6	9.509	0.011	0.00116	0.76	93.613
Fracción IC 57	1.2	0.14	0.0015	0.01071	7.05	12.723
Fracción EM 6	0.5	0.0009	0.0014	1.56	1023.39	12.086
Fracción EM 14	0.5	0.0007	0.0014	2.00	1315.79	11.893
Fracción EM 33	0.5	0.0007	0.0014	2.00	1315.79	11.700
Fracción EM 34	0.5	0.0004	0.0014	3.50	2302.63	11.314
Fracción 35 EM	0.5	0.0005	0.0014	2.80	1842.11	11.507
Fracción 56 EM	0.5	0.0007	0.0014	2.00	1315.79	11.700

7. Análisis de las fracciones purificadas por electroforesis en geles SDS.

Una vez identificadas las fracciones con mayor actividad específica, tanto de la cromatografía de intercambio iónico como por la cromatografía de exclusión molecular, se concentraron las proteínas por precipitación con acetona y se analizaron por electroforesis desnaturizante (Figuras 27 y 28). En el gel en el que se separaron las

fracciones de intercambio iónico se observa que en las fracciones de la 52 a la 58, presentan una banda intensa de 50 kDa y otra muy cercana a los 75 kDa, además de otras proteínas (Figura 27). A diferencia de las fracciones 9 a 11, que fueron las fracciones no retenidas en la columna, contienen un mayor número de proteínas.

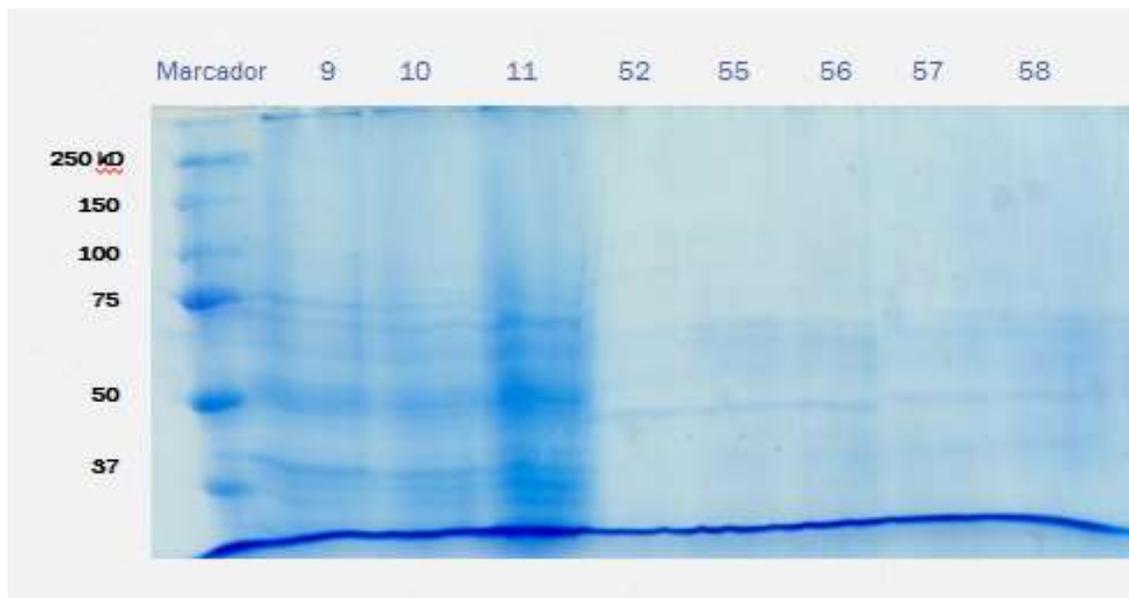


Figura 27 Análisis por electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones separadas por cromatografía de intercambio iónico. Se analizaron las proteínas de las fracciones no retenidas en la columna (9-11) y también las retenidas (52-58) se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.

Por otra parte las fracciones provenientes de la columna de exclusión molecular fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS (Figura 28). Las proteínas de las fracciones 24, 27 y no fueron retenidas en la columna de intercambio iónico y están en el rango de peso molecular entre 30 a 75 kDa. Las proteínas de las fracciones 27, 28, 32, 42 y 45 si fueron retenidas en la cromatografía de intercambio iónico y son bandas muy tenues que varían entre 50 y 75 kDa de peso molecular. Esta observación corrobora lo obtenido en la cuantificación de proteína de estas fracciones (Tablas 13 y 14).

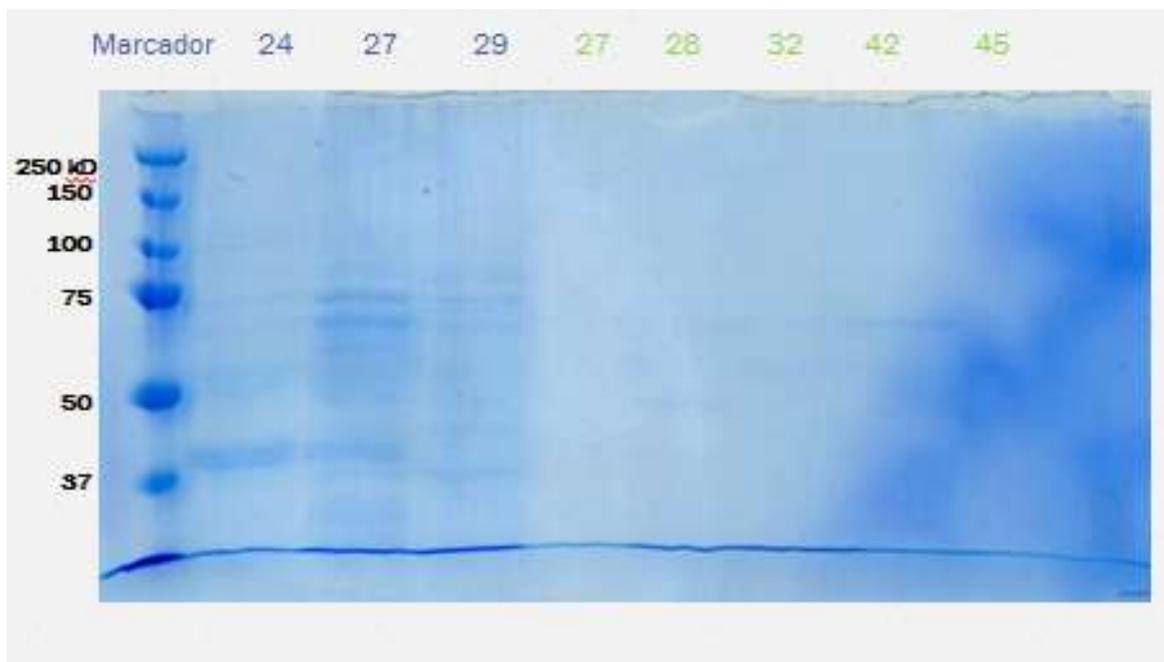


Figura 28 Análisis por electroforesis en poliacrilamida-SDS de las fracciones separadas cromatografía de exclusión molecular. Las proteínas de las fracciones 24, 27 y 29 provienen de la fracción 11 de intercambio iónico y las proteínas de las fracciones 27, 28, 32, 42 y 45 provienen de la fracción 56 de intercambio iónico. Se separaron en un gel de poliacrilamida (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.

Una vez establecido y estandarizado el protocolo de purificación en el que se empleó la precipitación con sulfato de amonio (60% saturación), seguido de cromatografía de intercambio catiónico, se obtuvieron consistentemente una serie de fracciones retenidas que se agruparon y denominamos PI fracciones 49-56 y PII contuvo las fracciones 57-65. Se siguió este esquema y el patrón de proteínas en cada fracción se presenta en el gel (Figura 29). Se observa en el extracto crudo que la mayoría de las proteínas se encuentran entre 25 a 100 kDa y el número de bandas se reduce en las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico (P I y II).

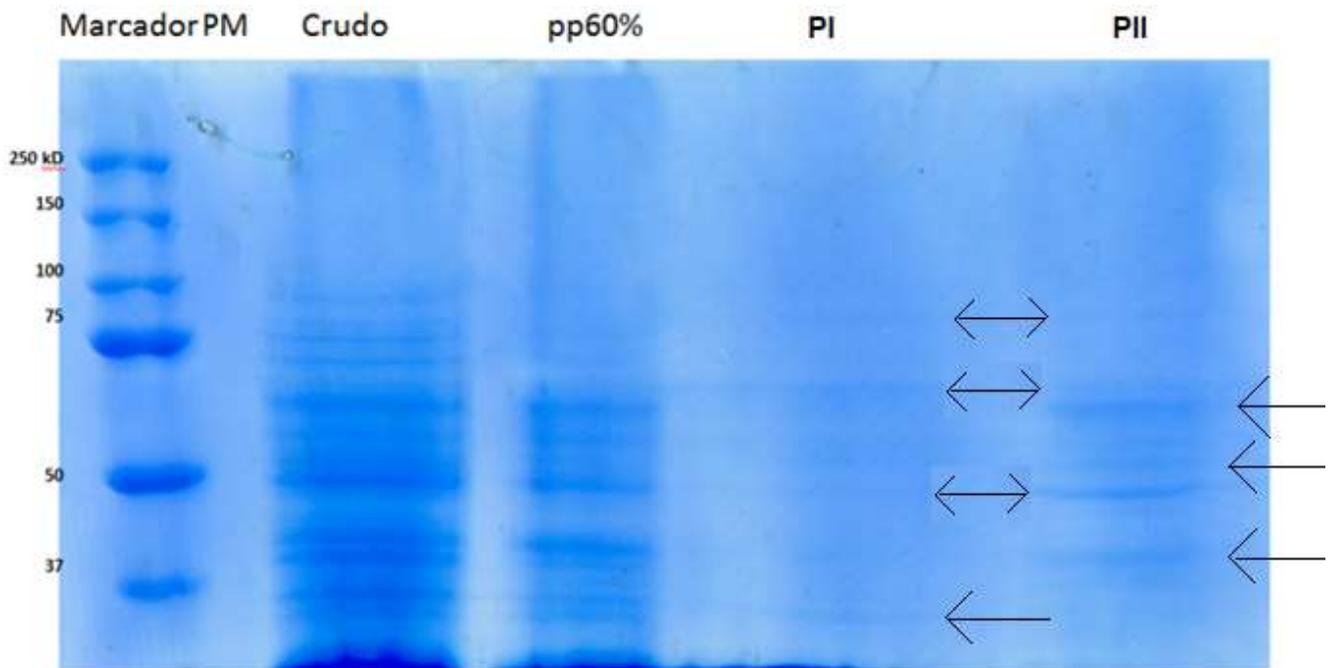


Figura 29 Análisis del extracto crudo, precipitado con sulfato de amonio a 60% de saturación y las fracciones retenidas en la cromatografía de intercambio iónico (pool I y pool II) por electroforesis SDS-PAGE (12%) teñido con azul de Coomassie.

8. Detección de las β -glucanasas mediante geles nativos de Actividad

Debido a que detectamos actividad de β -1,3-glucanasa tanto en las fracciones no retenidas como en las fracciones retenidas en la columna de intercambio iónico, corroboramos su presencia por geles de actividad. La Figura 30 muestra bandas de actividad de glucanasa tanto en las fracciones retenidas en la columna (P I y II), como en las fracciones no retenidas (7,11 y 14), lo que es consistente con la existencia de isoformas ácidas y básicas de estas hidrolasas.



Figura 30 Gel nativo para revelar la actividad de glucanasas en las fracciones no retenidas (Fracción 7: 5.9 μg , Fracción 11: 109.3 μg , Fracción 14: 109.5 μg .) y las fracciones retenidas en la columna de intercambio catiónico (Pool I: 53.76 μg , Pool II: 75 μg).

La figura 31 muestra una réplica de gel de actividad de las fracciones no retenida (14) y los Pools de fracciones retenidas en la columna de intercambio catiónico, PI y PII.

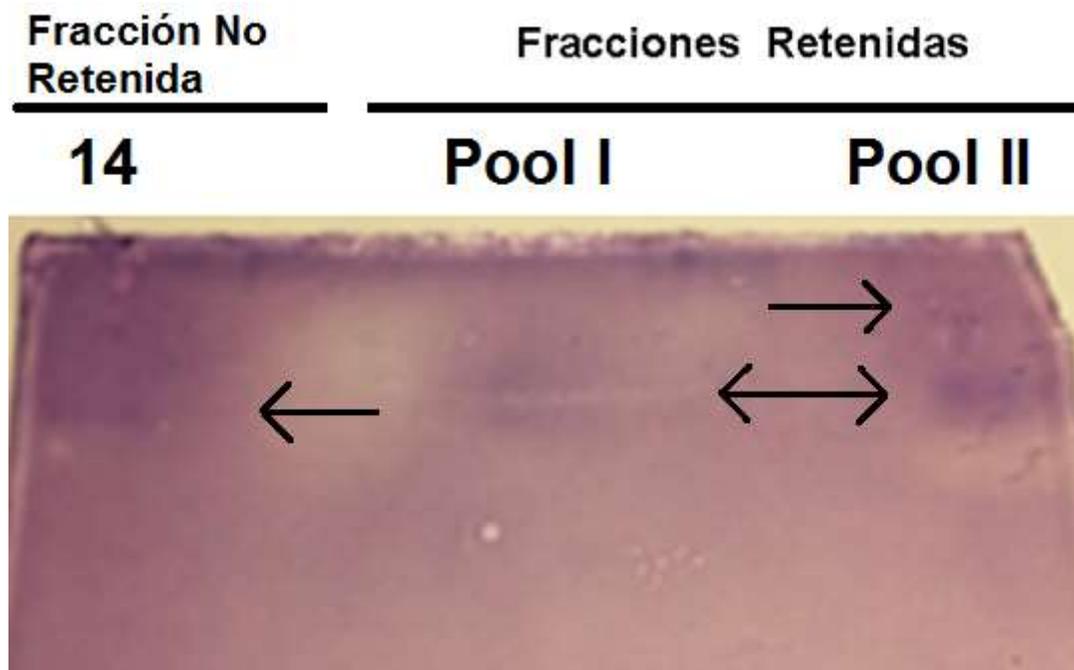


Figura 31 Gel nativo para revelar la actividad de glucanasas en las fracciones no retenidas (Fracción 14: 109.5 μg , Pool I: 53.7 μg , Pool II: 75 μg).

B. Caracterización bioquímica de las fracciones purificadas

1. Efecto de la temperatura

Para caracterizar las actividades de β -1,3-glucanasa empleamos las fracciones retenidas en la columna de intercambio iónico, PI. Se evaluó la actividad a diferentes temperaturas (4°C a 70°C) y la figura 32 muestra que la actividad se incrementa conforme aumenta la temperatura, hasta alcanzar un máximo a los 40°C, y cae a 50°C llegando la actividad a ser menor al 50 %; a partir de 60°C no detectamos actividad enzimática.

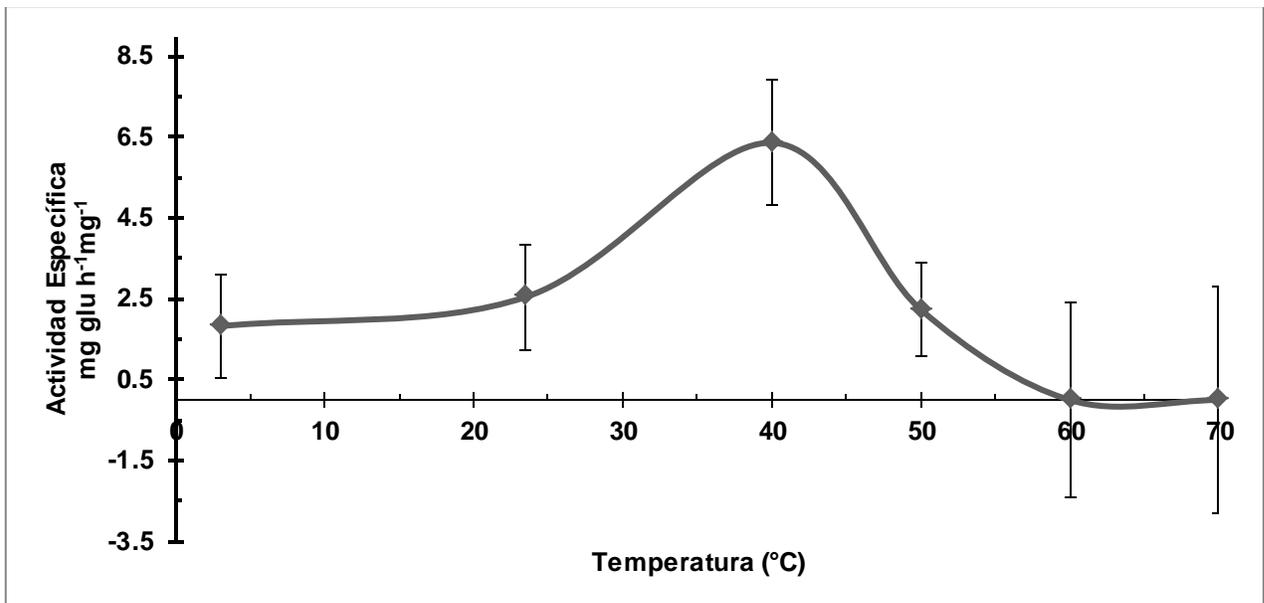


Figura 32 Efecto de la temperatura en la actividad de β -1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (P I). La reacción enzimática se llevó a cabo a distintas temperaturas en el rango de 4°C a 70°C por 30 min, usando 0.2 μ g de proteína.

2. Efecto del pH

Asimismo, se evaluó el efecto del pH (amortiguadores de acetatos y de Tris-HCl), para conocer el pH óptimo, En la gráfica se identifica que a pH=6.0, la enzima muestra mayor actividad (figura 33).

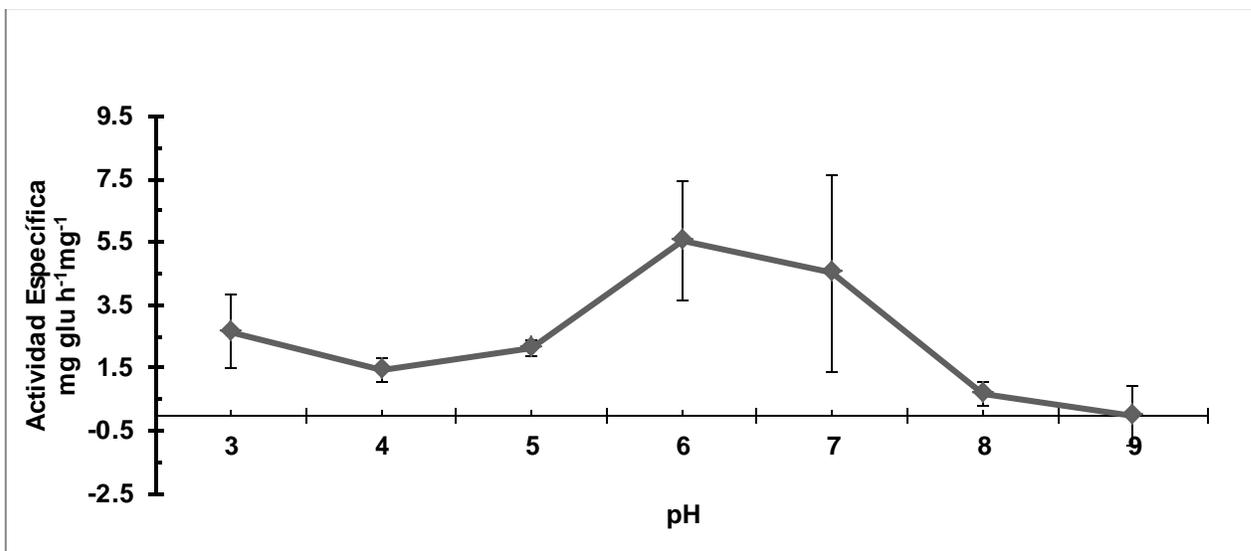


Figura 33 Efecto del pH sobre la actividad de β -1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (PI). La reacción enzimática se llevó a cabo con distintos amortiguadores con pHs en un rango de 3 a 9 por 30 min, usando 0.2 μ g de proteína

3. Efecto del tiempo

Para el experimento del efecto del tiempo se usaron varias fracciones consecutivas de la columna de intercambio iónico. La figura 34 muestra que hay un incremento en la actividad durante los primeros 10 minutos y ésta se estabiliza a tiempos posteriores.

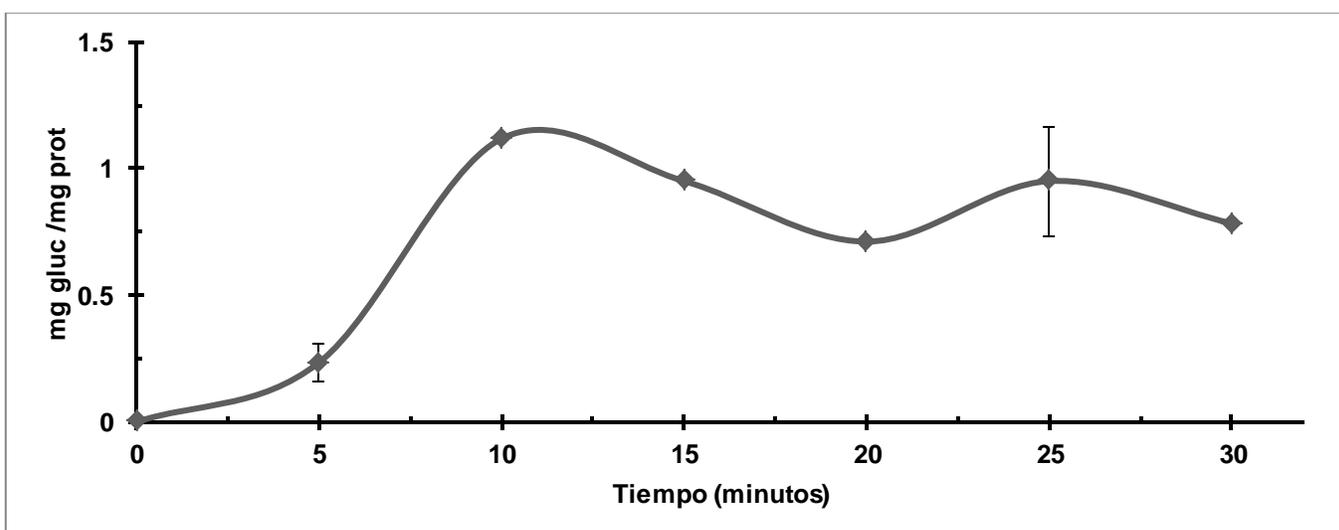


Figura 34 Efecto del tiempo sobre la actividad de β -1,3-glucanasas purificadas por cromatografía de intercambio iónico (PI). Incubación a pH 6.0 con 2 μ g proteína.

4. Efecto de la fumonisina B1

Para corroborar que la FB1 inhibe a las glucanasas de maíz, se realizó un control con extracto crudo, el cual contiene las 3 isoformas de glucanasas antes descritas por Sánchez-Rangel (2012) y Galeana-Sánchez (2014). Se incubaron por 30 minutos cuatro medios de reacción 3 de ellos contenían FB1 en diferentes concentraciones y otro donde no se añadió FB1 (control), donde observamos en la gráfica que a 50 μM de FB1 la actividad se ve disminuida, pero a 25 y 100, el patrón es similar al control (figura 35).

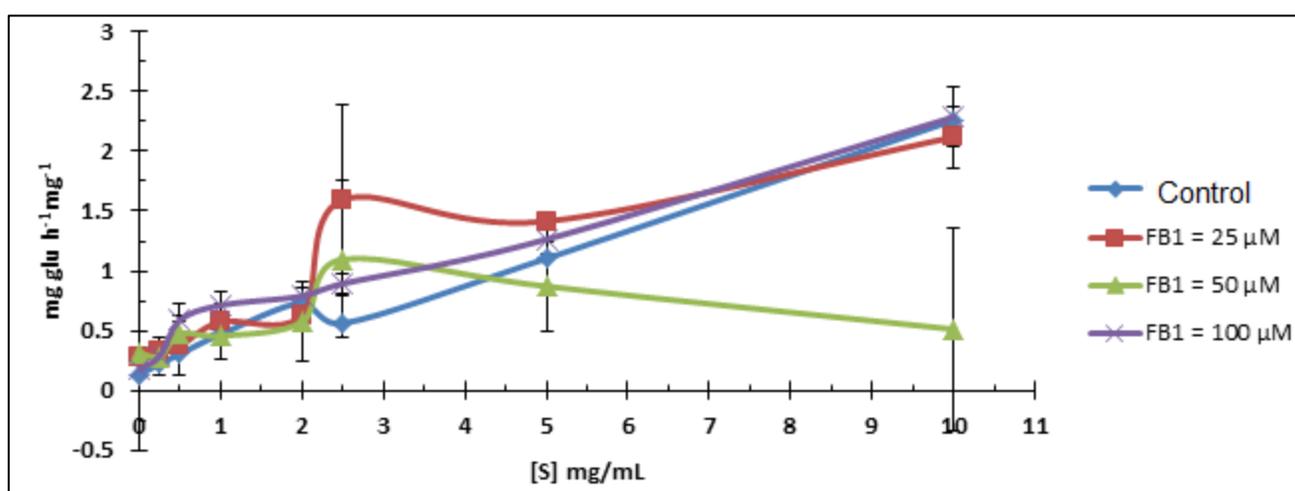


Figura 35 Efecto de la FB1 en extracto crudo al variar la concentración del sustrato (laminarina) de la glucanasa. Se probaron 3 concentraciones de FB1 más un control sin FB1.

Por lo anterior, se probó el efecto de la micotoxina (20 μM a 100 μM) sobre la actividad de β -1,3-glucanasa con las fracciones no retenidas (Figura 36). Se observa que la FB1 tuvo un efecto marginal sobre la actividad enzimática, y aunque se observa una reducción de ésta a 60 μM de FB1, esto probablemente se debe a una cuestión técnica en la que se incluyó menor cantidad de proteína en estos pozos. A concentraciones más elevadas de la toxina (80 y 100 μM), los valores de actividad son similares a aquellos en ausencia de FB1.

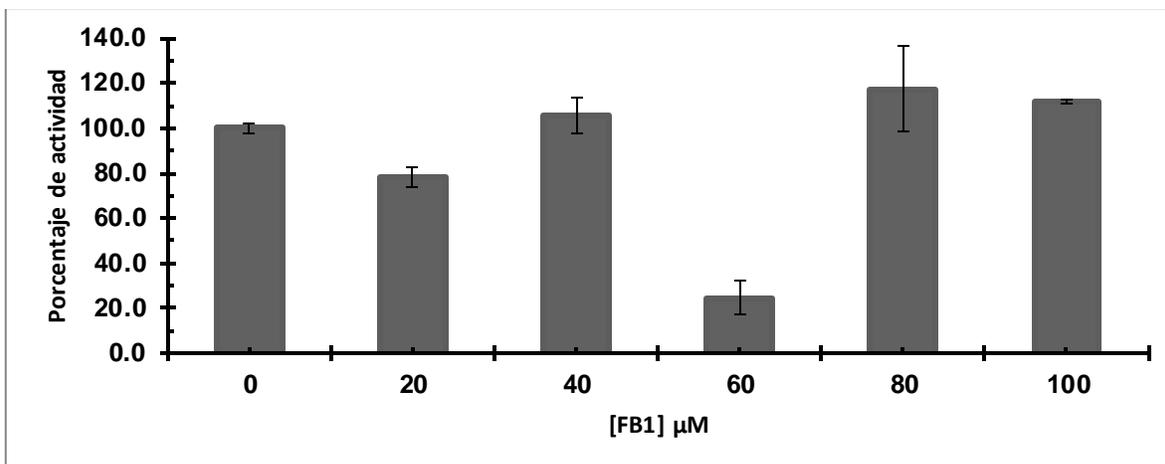


Figura 36 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β-1,3-glucosidas ácidas contenida en la fracción no retenida en la cromatografía de intercambio iónico.

También se determinó el efecto de diferentes concentraciones de FB1 sobre las fracciones básicas de glucosidas, PI y PII (Figuras 37 y 38). La actividad se ve reducida en un 15 % con 80 μM de FB1 para el PI y para inhibir al PII al menos 10% se necesita más de 100 μM de FB1. Por lo que las tres isoformas tienen un patrón de inhibición por FB1.

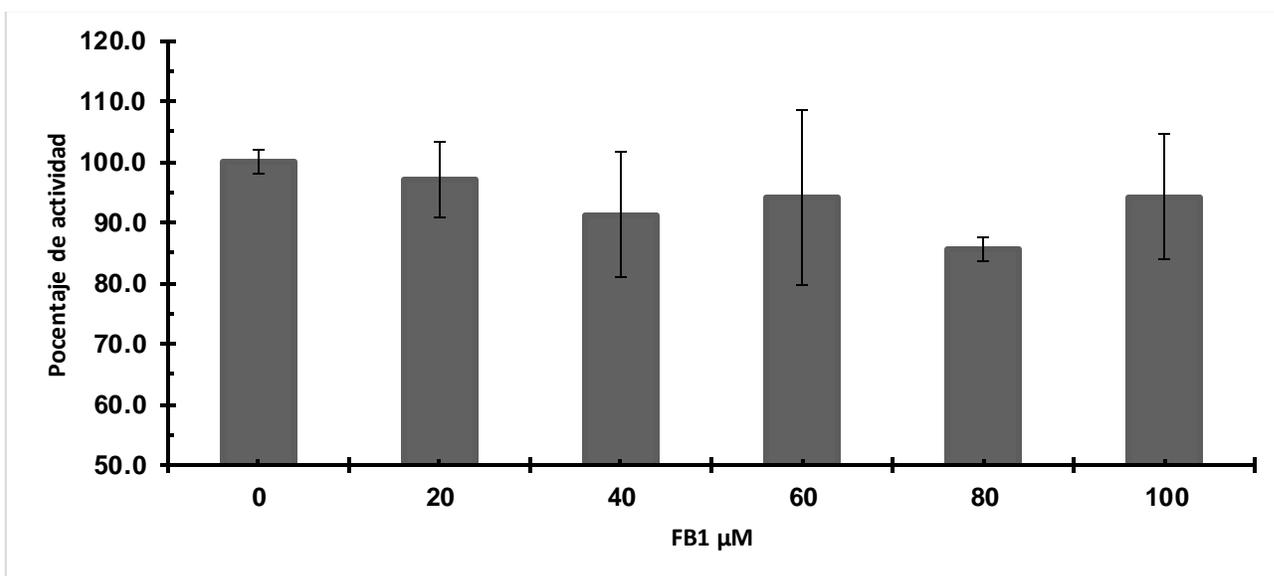


Figura 37 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β-1,3-glucosidas básicas contenida en la fracción retenida (pool I, PI) en la cromatografía de intercambio iónico.

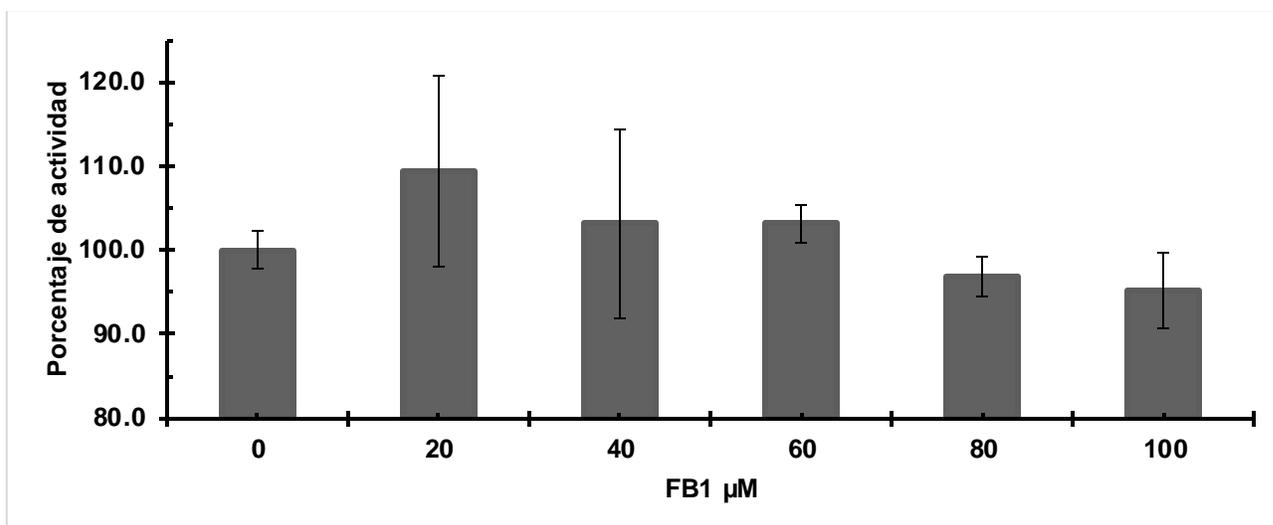


Figura 38 Efecto de la FB1 (20 – 100 μM) sobre la actividad de β -1,3-glucanasas contenida en la fracción retenida (pool II, PII) en la cromatografía de intercambio iónico.

C. Actividad antifúngica de las β -1,3-glucanasas.

Para determinar si las β -1,3-glucanasas estudiadas poseen actividad antifúngica, se montaron dos ensayos en los que se emplearon como blanco las cepas de *F. verticillioides*, MY3 y MY5, previamente caracterizadas en el laboratorio como alta y baja productoras de FB1, respectivamente.

1. Ensayos en medio líquido en placa multipozos

Para este ensayo se probaron dos cantidades de la proteína purificada y 50 μM de FB1. En el experimento con la cepa MY3 (Figura 39) se observa que durante la fase lag, las primeras 20 h, no hay diferencia entre los tratamientos. La FB1 inhibe el crecimiento de la cepa MY3, ya que los valores de A_{630} son aproximadamente 20 % menores que en el control a lo largo del experimento hasta los 72 h. Lo que es claro también es que las fracciones que tienen actividad de glucanasa inhibieron el crecimiento de forma significativa, la C1 (6.2 μg de proteína, 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) provocó una reducción del 35 %, mientras que la C2 (12.4 μg , 0.03339 $\text{mg glu h}^{-1} \text{mg}^{-1}$) causó una inhibición del 55 % del crecimiento. Dado que la FB1 también afectó el crecimiento, fue difícil determinar si inhibe la actividad de glucanasas en este ensayo.

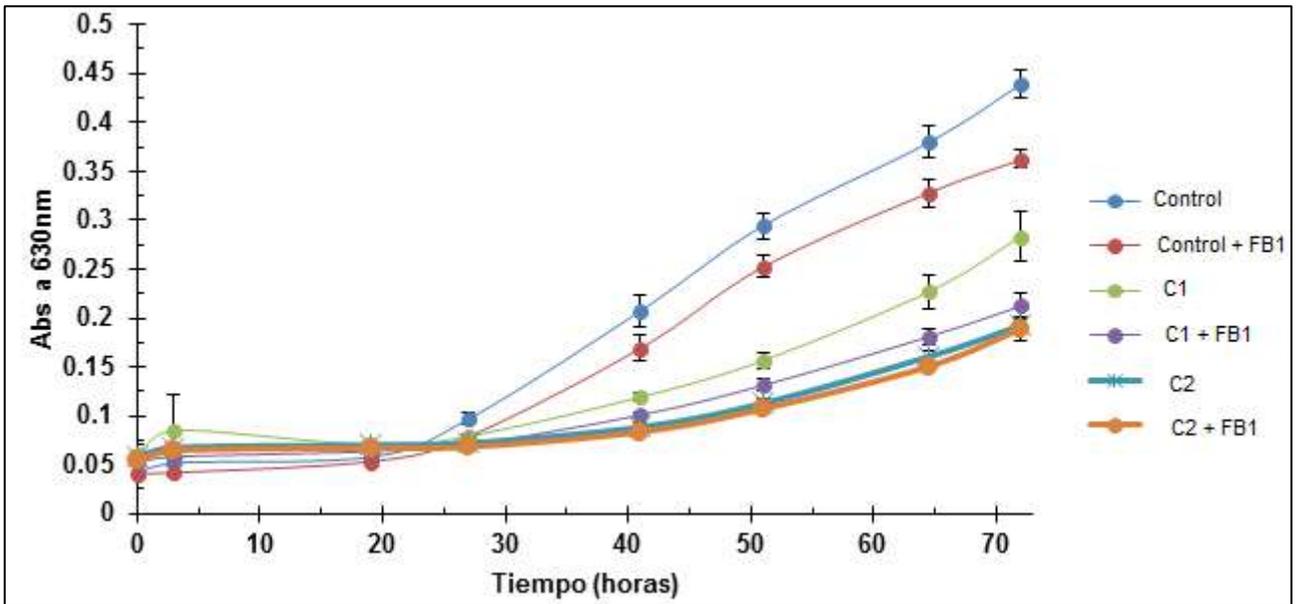


Figura 39 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracción ácida) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (50 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 = 6.2 μ g, 0.03339 mg glu h⁻¹ mg⁻¹; C2 = 12.4 μ g, 0.03339 mg glu h⁻¹ mg⁻¹). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630\text{ nm}}$ por tres días.

Cuando se probó la cepa MY5, observamos que ésta es más tolerante a la FB1 pue no hay diferencia en crecimiento entre el medio solo y medio suplementado con FB1 (Figura 40). Las fracciones que contienen actividad de glucanasa inhibieron el crecimiento de esta cepa de *F. verticillioides* y la FB1 tuvo poco efecto sobre esta actividad.

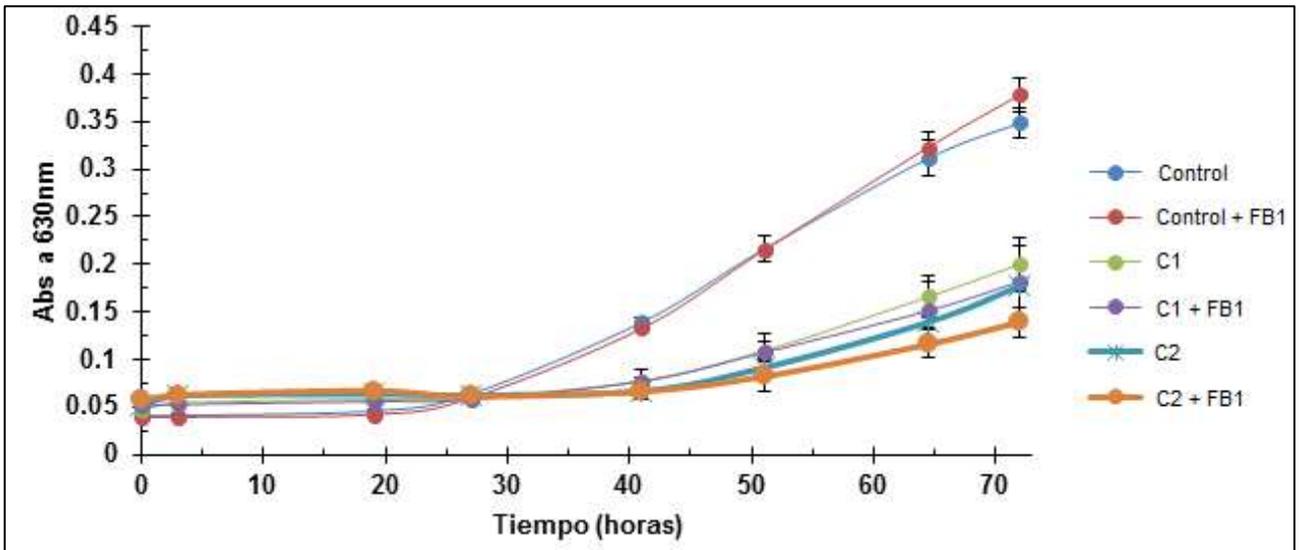


Figura 40 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracción ácida) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (50 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 = 6.2 μ g, 0.03339 mg glu h⁻¹ mg⁻¹; C2 = 12.4 μ g, 0.03339 mg glu h⁻¹ mg⁻¹). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de $A_{630 \text{ nm}}$ por tres días.

Se realizó el mismo experimento con los grupos de fracciones con actividad de glucanasas básicas, en los que se empleó una concentración de FB1 de 25 μ M. A pesar de reducir la concentración de FB1, la micotoxina afectó el crecimiento del hongo (Figura 41). La actividad de glucanasa si tiene actividad antifúngica pero es difícil determinar el efecto de la FB1.

Cuando probamos la cepa MY5, observamos que es más tolerante a FB1 y la curva en la que se incuban la glucanasa (C2 = 7.2 μ g, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹, + FB1) está por arriba en valores de A_{630} , a lo largo del experimento que la curva en la que se incubaba con la glucanasa. Este resultado sugiere que la toxina podría estar inhibiendo la actividad de la hidrolasa.

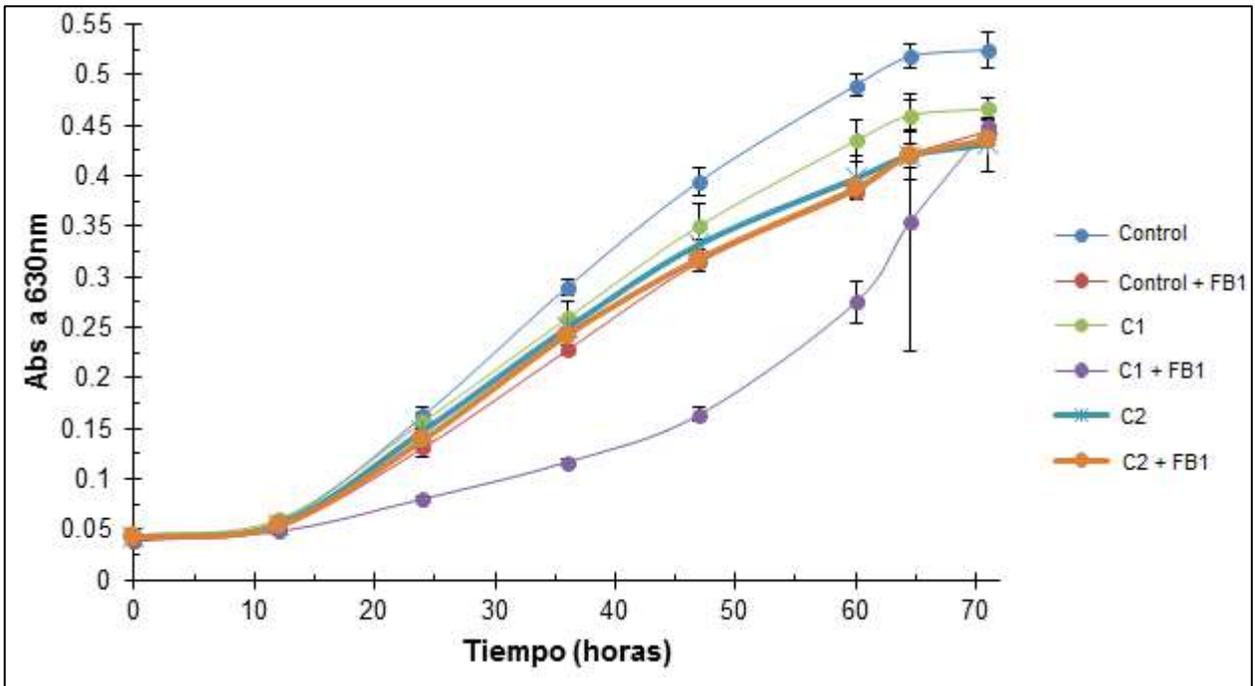


Figura 41 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (25 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína del Pool I (C1 =3.58 μ g, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹; C2 =7.17 μ g, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹). Se inocularon 2 x 10⁴ conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de A₆₃₀ nm por tres días.

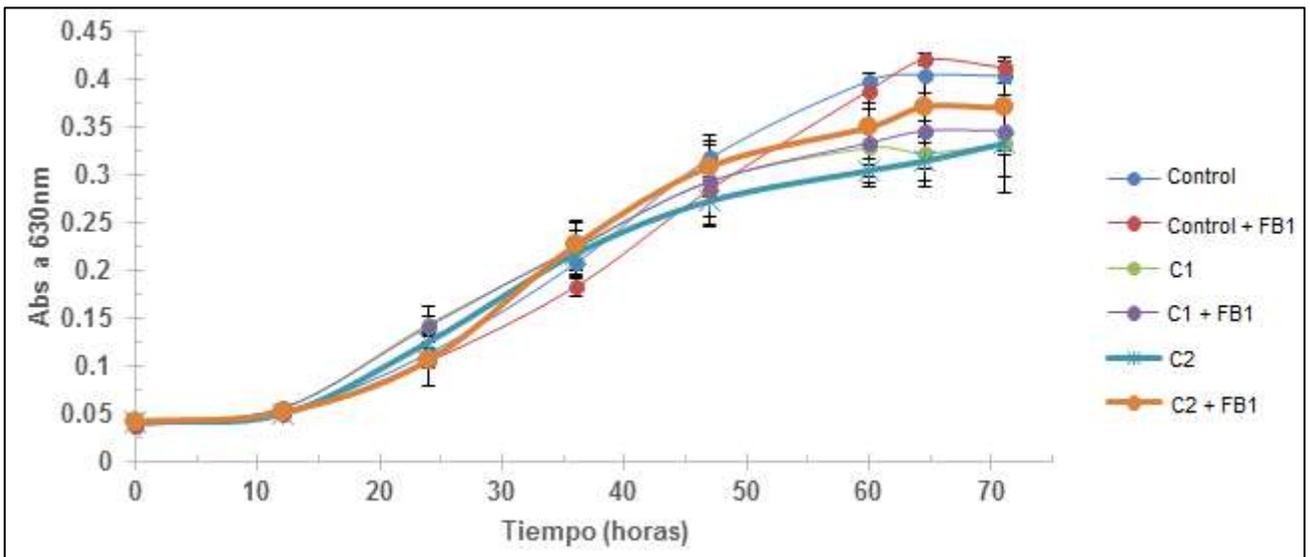


Figura 42 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; Pool I) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (25 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 =3.58 μ g, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹; C2 =7.17 μ g, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹). Se inocularon 2 x 10⁴ conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de A₆₃₀ nm por tres días.

Las cruvas de crecimiento en presencia de PII con el mismo experimento incluyen a la figura 43 (MY3) y 44 (MY5), donde podemos resaltar del crecimiento de MY3 que los tratamientos que tienen FB1 + proteína, se encuentran por arriba de los tratamientos que tienen únicamente proteína, lo que da buen indicio de que la FB1 ayuda al crecimiento de la cepa en presencia de las glucanasas en el Pool II. En la Figura 44, resalta que la curva (C2 + FB1) está por encima que la curva con glucanasa.

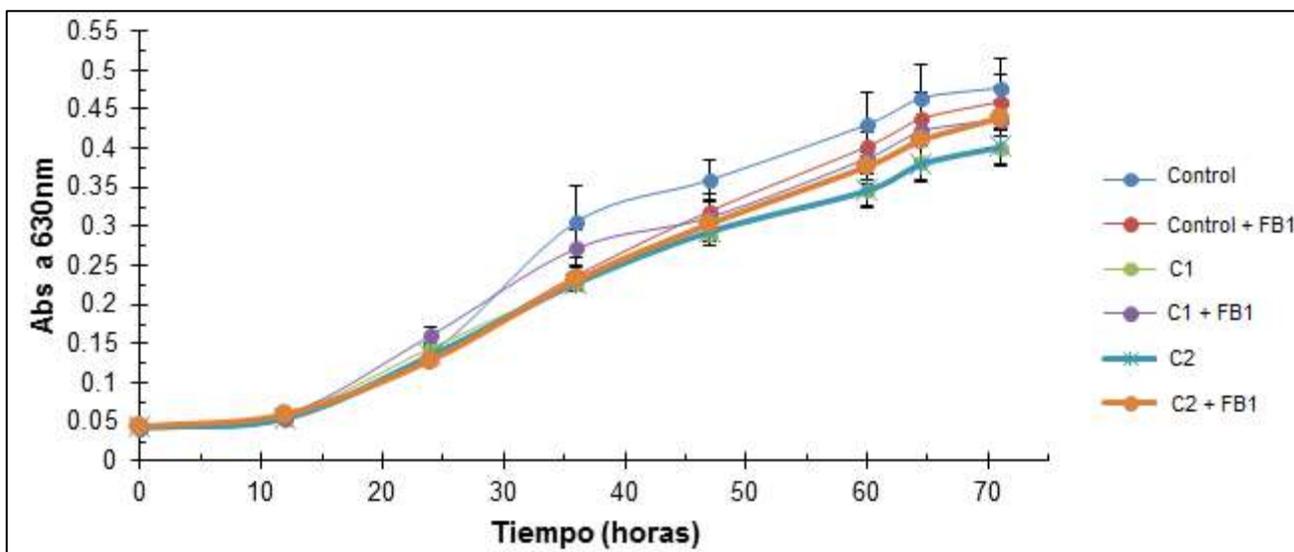


Figura 43 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; pool II) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY3 en ausencia y presencia de FB1 (25 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína del Pool (C1 =5 μ g, 0.03352 mg glu h⁻¹ mg⁻¹; C2 =10 μ g, 0.03352 mg glu h⁻¹ mg⁻¹). Se inocularon 2 x 10⁴ conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de A₆₃₀ nm por tres días.

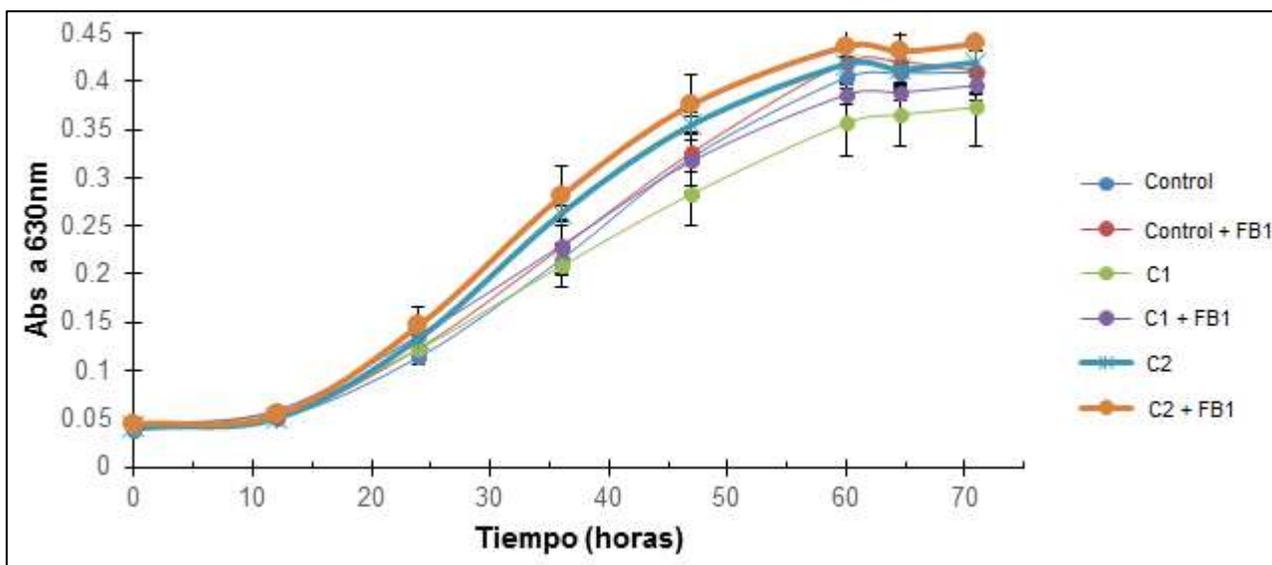


Figura 44 Efecto antifúngico de las β -1,3-glucanasas (fracciones básicas; pool II) sobre el crecimiento de *F. verticillioides*, cepa MY5 en ausencia y presencia de FB1 (25 μ M). Se probaron dos cantidades de proteína (C1 =5 μ g; C2 =10 μ g). Se inocularon 2×10^4 conidios en cada pozo y se siguió el crecimiento mediante la lectura de A_{630} nm por tres días.

2. Ensayos en medio sólido en caja de Petri

Para evaluar el efecto antifúngico *in vitro* en medio sólido se sembraron 1×10^6 conidios de cada una de las cepas en el centro de la caja Petri en medio PDA (0.5X) y se dejaron crecer por 48 horas a 30°C. Transcurrido ese tiempo se colocaron discos de papel filtro (diámetro = 7-10 mm) impregnados en amortiguador o en solución de proteínas (extracto crudo) a una distancia de 0.1-0.5 cm del crecimiento radial. Las cajas se incubaron por 24 horas y el efecto sobre el crecimiento se documentó mediante fotografías de las placas.

Para la cepa MY3 de *F. verticillioides* observamos que con 210 μ g de proteína (0.00104 mg glu h⁻¹ mg⁻¹) no se ve un “halo de inhibición” (Figura 45-B), pero el micelio no crece sobre la zona de los discos, sino alrededor de éstos. A diferencia del disco con amortiguador, se puede ver que sí hay crecimiento de micelio sobre el disco, incluso se ve coloración al inicio del disco.

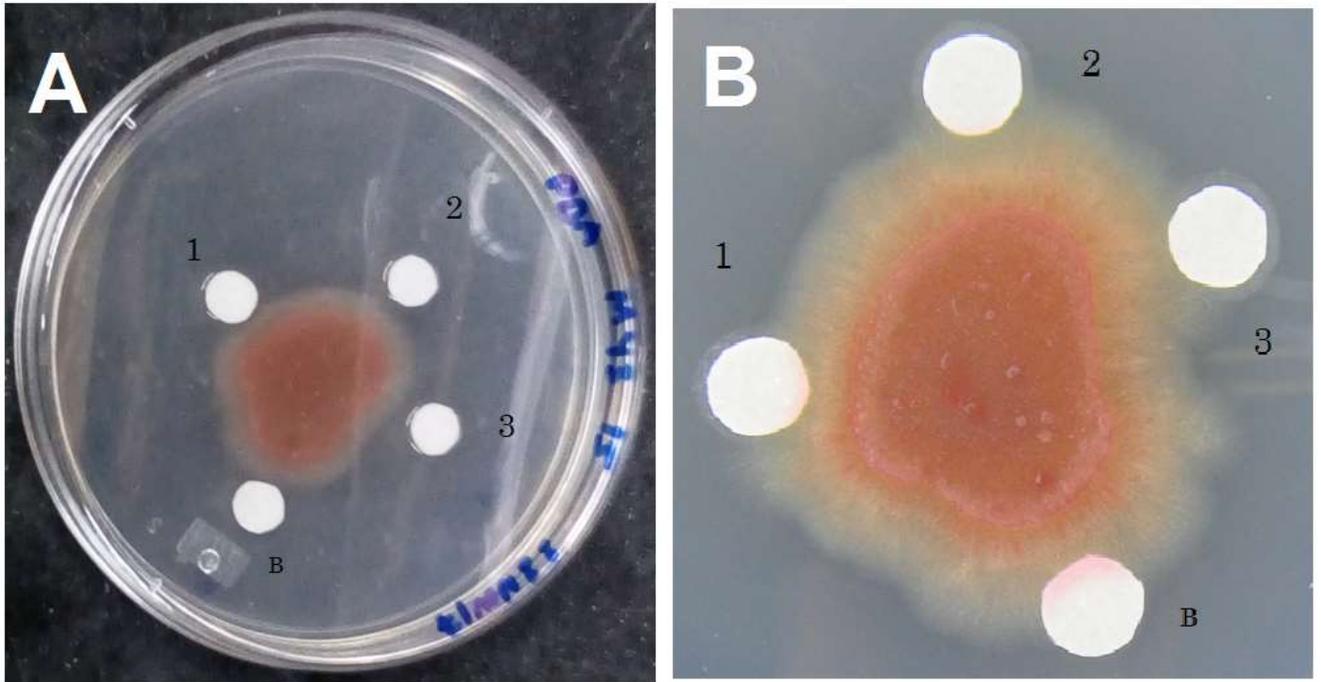


Figura 45 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3). A. Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. B. Foto a las 24 h de incubación de los discos en la placa. Discos: B (20 μ L de amortiguador pH=6.0), 1-3 (210 μ g de proteína a partir de extracto total, 0.00104 mg glu h⁻¹ mg⁻¹ + 5 μ L de amortiguador pH=6.0).

El experimento se realizó igualmente con la cepa MY5 y 210 μ g de extracto de proteína (0.00104 mg glu h⁻¹ mg⁻¹), se observó que en el disco del amortiguador hay micelio, alcanzó el disco y creció sobre éste (figura 46-B). En los discos 1-3 el micelio alcanzó el disco y creció alrededor de éste. Al menos en los discos 2 y 3, se ve una ligera inhibición del hongo en la mitad cercana al micelio inicial, lo que sugiere el efecto inhibitorio del extracto total de proteínas.

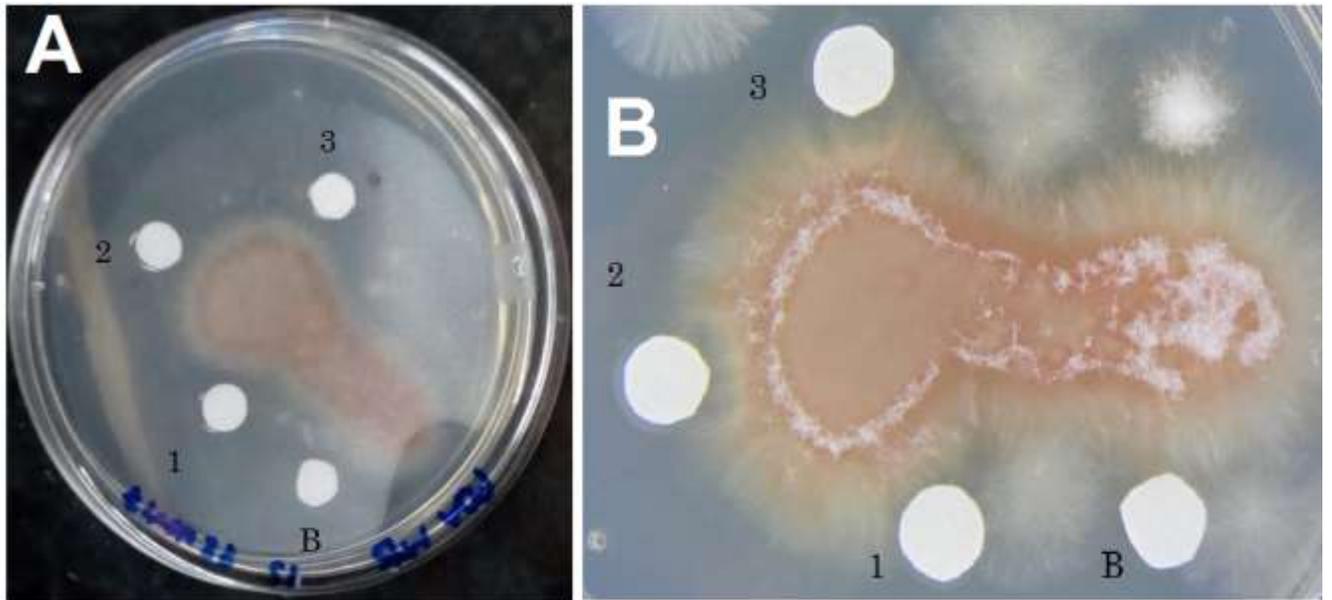


Figura 46 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY5). **A.** Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. **B.** Foto a las 24h de incubación de los discos en la placa Discos: B (20 μ L de amortiguador pH=6.0), 1-3 (210 μ g de proteína a partir de extracto total, 0.00104 mg glu h⁻¹ mg⁻¹ + 5 μ L de amortiguador pH=6.0)

Se evaluaron también las proteínas de los grupos PI y PII. Se observó el mismo patrón que en el extracto total, donde las colonias evaden a los discos con extracto proteico (figura 47). Es consistente el hecho de que ambas cepas evaden los discos con extracto de proteína independientemente de que sea extracto total o fracciones obtenidas de las cromatografía de intercambio iónico, a diferencia de los discos que tienen únicamente amortiguador ya que en esos discos hay crecimiento e incluso una coloración más evidente que en los discos con proteína.

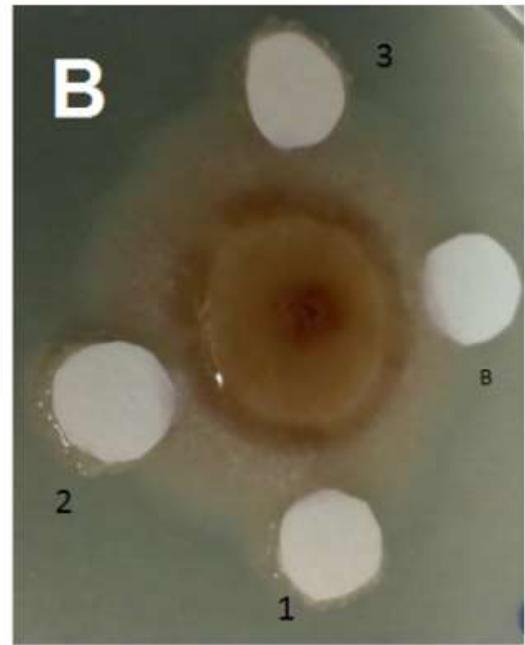
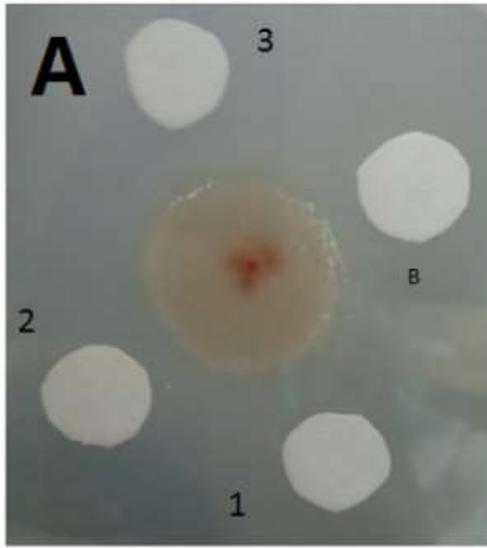


Figura 47 Efecto de las β -1,3-glucanasas sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3). A. Foto a las 48 h de crecimiento del hongo y la posición de los discos en la placa. B. Foto a las 24h de incubación de los discos en la placa Discos: B (20 μ L de amortiguador pH=6.0), 1-3 (4.5 μ g de proteína del Pool I, 0.05950 mg glu h⁻¹ mg⁻¹ + 10 μ L de amortiguador pH=6.0)

VII. Discusión

1. Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz

En este trabajo se establecieron las condiciones para la purificación parcial de las β -1,3-glucanasas presentes en embriones de maíz. En el genoma de esta planta hay más de 10 genes anotados que codifican enzimas con esta actividad, pero hay poca información sobre su caracterización bioquímica. Un aspecto que complicó la purificación de estas enzimas fue su estabilidad; a diferencia de muchas glucohidrolasas, las β -1,3-glucanasas no se renaturalizaron después de la separación electroforética, para luego determinar la actividad. Esto nos impidió determinar con precisión el P.M. de las enzimas purificadas. Las propiedades de carga neta de las glucanasas permitieron hacer una separación efectiva de estas enzimas en fracciones no retenidas en la columna de intercambio catiónico y la obtención de dos grupos de fracciones (PI y PII) que eluyeron gradualmente al incrementar la concentración de cloruro de sodio. En las tablas de purificación se observa claramente el incremento en la actividad específica de las glucanasas conforme se avanza en los pasos de purificación. Es por ello que para tener una buena cantidad de proteína se incubaban ocho lotes de 75 embriones cada uno para precipitar con sulfato de amonio y de ahí se inyectaba a la columna, para tener ocho veces más de la misma fracción de intercambio iónico.

Mediante geles de poliacrilamida-SDS de las fracciones purificadas por intercambio iónico se observó que hay entre 3 y 6 bandas prominentes (entre 37 kDa y 100 kDa). Otro indicador de que en las fracciones hay glucanasas fue el zimograma. Después del paso de cromatografía de intercambio iónico, se inyectaron varias fracciones con actividad de glucanasa a una columna de exclusión molecular. A pesar de que se enriqueció la actividad y se logró un alto grado de purificación (más de 2000 veces), la cantidad de proteína fue muy baja para corroborar por zimograma. Las fracciones de exclusión molecular se observaron en geles de poliacrilamida, encontrando que las bandas más intensas en fracciones con actividad son una de 50 kDa y otra de 70-75 kDa.

2. Propiedades bioquímicas de las glucanasas de maíz

En las fracciones purificadas con actividad de glucanasa se determinó que las condiciones óptimas de actividad fueron 40°C y a pH 6.0. Estos valores están en el rango de otras glucanasas purificadas de plantas y microorganismos. A 50°C hubo pérdida considerable de la actividad, lo que es consistente con la baja estabilidad de estas enzimas de maíz.

Se han reportado glucanasas de otras plantas con características parecidas como se puede ver en la tabla 15.

Tabla 15 Propiedades de algunas glucanasas de microorganismos y plantas

Glucanasas de:	Temperatura	pH	Propiedades	PM (kDa)	pl	Referencia
<i>Pichia anomala</i>	37°C	3-5.5	Km= 0.3 mg/mL Vmax= 350 μ mol/min*mg con laminarina	45.7	4.7	Izgu et al., 2004
<i>Trichoderma asperellum</i>	55°C	5.1	Km= 0.087 mg/mL Vmax= 0.246 U/min con laminarina	83.1	ND	Bara et al., 2003
<i>Capsicum annuum</i>	ND	ND	Act específica: 4020 nkat/mg proteína	34	9.3	Kim et al., 1997
Clavel	37 °C	5.5	Inducción entre las 12-24 hpi	ND	ND	Ardila et al., 2005

ND: No determinado

El peso molecular, resulta variado entre las diferentes especies, sin embargo, ninguna excede de los 100 kDa incluyendo a las de maíz (por los geles de electroforesis de SDS de las fracciones y la información teórica de NCBI); también el resultado es diverso en el punto isoeléctrico, ya que de unas especies solo hay glucanasas ácidas y en otras básicas, por lo que resulta novedoso que el maíz tenga de ambas.

Con la información proporcionada en la tabla 7 y los resultados, se puede inferir que se obtuvo la glucanasa del gen *gla3* al ser de 70 kDa de peso molecular y tener un pI predicho básico, lo que confirma que sale en fracciones no retenidas en la columna de intercambio iónico a las condiciones usadas.

3. Papel de las glucanasas en la defensa de las plantas vs microorganismos patógenos

La defensa innata de las plantas se caracteriza por ser rápida y producir señales para activar otro tipo de defensas, por lo que en este caso se puede clasificar a las glucanasas básicas como sensoras por el patógeno *F. verticillioides*. Las glucanasas al romper la pared celular del hongo, podrían formar pequeños fragmentos de glucano (elicitors) y por ende se activarían otro tipo de glucanasas u otro tipo de defensas de la planta. De acuerdo con Ham et al. (1997), las glucanasas son proteínas liberadas por patógenos y también por estrés químico, ya que comprobaron que la producción de elicitors aumenta con la infección o los tratamientos con cloruro de mercurio y genera aumento en la actividad de glucanasas, por lo que sí son consideradas como parte de la respuesta de defensa de la planta.

Tanto el extracto crudo como las fracciones ácidas (no retenidas) y las básicas (retenidas) mostraron actividad antifúngica al inhibir el crecimiento de dos cepas de *F. verticillioides*. Esto resalta la importancia de estas enzimas en los mecanismos de defensa de la planta de maíz contra este patógeno.

Por otra parte, el experimento *in vitro* de retar la cepa MY3, clasificada como alta productora de FB1, con tan solo 6.2 µg de extracto proteico, que contiene 0.03339 mg glu h⁻¹ mg⁻¹ de actividad enzimática de glucanasas ácidas, produjo un efecto antifúngico que causó la disminución de casi el 35 % con respecto al control. A diferencia de las fracciones PI y PII de glucanasas básicas que causaron una disminución del 11-18 % con la misma cepa. A pesar de tener un porcentaje diferente del crecimiento del hongo, ambas demostraron tener una capacidad antifúngica. También se retaron los extractos con glucanasas ácidas y básicas con la cepa MY5, clasificada como baja

productora de FB1, el resultado fue inhibir el crecimiento aproximadamente un 45 % con las ácidas y con los PI y PII de las básicas en un 9-18%.

El resultado anterior sugiere que las glucanasas básicas al parecer no se ven afectadas por la producción de FB1 por el hongo, al no haber casi diferencia en el porcentaje de inhibición del crecimiento con la cepa baja productora con la alta productora de FB1, a diferencia de las ácidas, que aumentaron su porcentaje de inhibición en la cepa baja productora de FB1.

Lo que sí se corroboró es que la FB1 tiene un papel importante en el crecimiento del hongo ya que al adicionar en el mismo experimento *in vitro* FB1 25-50 μM , dio como resultado en que la cepa MY3 disminuyó su crecimiento con respecto al control al adicionar 50 μM , lo que da indicio de que a esa concentración de FB1 le impide crecer normalmente al hongo. Respecto a la cepa MY5 al adicionar FB1 disminuyó también el crecimiento únicamente los extractos de glucanasas, esto quiere decir que para MY5 adicionar FB1 no ayuda a reestablecer su crecimiento y/o inhibir a las glucanasas adicionadas a esa concentración de FB1.

Sin embargo, en el experimento con las glucanasas básicas se adicionó 25 μM y el resultado con la fracción PI fue que al crecer MY3 control con FB1 también disminuye el crecimiento y no hay diferencia en los tratamientos glucanasas y glucanasas + FB1, por lo que no se ven afectadas las glucanasas *in vitro* con FB1 y las cepas de *Fusarium*. Pero con MY5 da indicio de que sí se está inhibiendo la actividad de las glucanasas y que la FB1 ayuda al crecimiento de MY5 en el medio enriquecido, pese a que MY5 es una cepa baja productora de FB1.

Para el PII es interesante ver que al crecer MY3 con FB1, sí inhibe a las glucanasas al tener mayor OD en los pozos glucanasas + FB1 que el de solo glucanasas, lo que da un fuerte indicio de que la adición de FB1 a MY3 sí inhibe las glucanasas básicas en experimentos *in vitro*. Para la cepa MY5 al retarla con 10 μg de proteína del PII + 25 μM de FB1, da un indicio de la glucanasas en el Pool II (PII) se inhibe lo suficiente como para superar la OD del control. También con 5 μg del PI + FB1 se observa que la OD sube a diferencia del pozo con ausencia de FB1, pero no llega a igualar el valor del control (solo MY5 en medio enriquecido).

VIII. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

Se implementaron los protocolos para fraccionar las β -1,3-glucanasas de embriones de maíz en base a su carga neta; se confirmó la presencia de la glucanasas de ácidas y básicas por su comportamiento en cromatografía en intercambió iónico.

Se realizó una caracterización bioquímica inicial y se encontró que las condiciones óptimas de actividad para las glucanasas fraccionadas fue a pH 6.0 y temperatura de 40°C.

Tanto las fracciones ácidas como básicas de β -1,3-glucanasas mostraron actividad antifúngica contra dos cepas de *F. verticillioides*, y fue difícil determinar el efecto de la FB1 sobre esta capacidad pues la micotoxina también afectó el crecimiento del hongo.

Se encontró que la FB1 inhibió de manera marginal la actividad de β -1,3-glucanasas básicas.

Perspectivas

A partir de los protocolos generados en este trabajo se podrán purificar a mayor grado y cantidad, las glucanasas de maíz de manera que puedan ser analizadas por técnicas de proteómica moderna y conocer su identidad.

A través del conocimiento de secuencias parciales de aminoácidos de estas enzimas, se podrán clonar sus genes, lo que permitirá realizar estudios bioquímicos y moleculares de las β -1,3-glucanasas en la interacción *Fusarium verticillioides* – maíz.

IX. Referencias

- Abbas, et al. "Fumonisin and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *J Plant Physiol* 106, 1085-93 (1994).
- Ardila, H. et al. "Inducción diferencial de polifenoloxidasas y beta-1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus*) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* raza 2" *Acta Biol Colomb* 10(2):61-74 (2005).
- Balasubramanian, V.; Vashisht, D.; Cletus, J. and Sathivel, N. "Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi" *Biotechnol Lett* 34:1983-1990 (2012).
- Bara, M. et al. "Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*" *FEMS Microbiol Lett* 219:81-85 (2003).
- Blanco-Labra, A. y Aguirre-Macilla, C. "Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas". *Acta Universitaria*, Vol. 12, 3 (2002).
- Bradford M.A. "A rapid and sensitivity method for detection of binding-dye proteins" *Anal Biochem.* 72:248-254 (1976)
- Buchanan, B.; Grissem, W. and Jones, R. "Biochemistry and molecular biology of plants, 2nd edition". American Society of planta biologists. Ed. Wiley Blackwell (2015).
- Carmona, M. y Scandiani, M. "Importancia y control de *Fusarium verticillioides* en semillas de maíz. Propuesta para su manejo". *Aapresid Revista maíz* (2011)
- Carmona, M.; Scandiani, M.; Luque, A. "Severe outbreaks of soybean frog-eye leaf spot caused by *Cercospora sojina* in the Pampean Region, Argentina". *Plant Dis*, 93(9):966 (2009).
- CIMMYT "Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo, 4^a edición". Centro Internacional de Mejoramiento de maíz y trigo (2004).
- Chen, et al. "Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. In lipids photosynthesis: essential and regulatory functions." Springer; 77-115 (2009)
- De la Torre-Hernández, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernández, N., Cruz-Ortega, R. & Plasencia, J. "Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize." *Physiol Mol Plant Pathol* 74, 337-345 (2010)

- De la Torre-Hernández, M.E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., Plasencia, J. “Fumonisin-Synthesis and function in the interaction *F. verticillioides*-maize” TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 17:77-91 (2014).
- Du, L. et al. “Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins”. J Ind Microbiol Biotechnol 35:455–464 (2008).
- Duncan, E. and Howard, R. “Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*”. Mol Plant Microbe Interact 23(1):6-16 (2010).
- Ebrahim, S.; Usha, K. and Singh, B. “Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism”. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Méndez-Vilas (Ed). (2011).
- Elmore, J. and Coaker, G. “The role of the plasma membrane H⁺ -ATPase in Plant-Microbe Interactions” Mol Plant 4(3):416-427 (2011).
- Esquerré-Tugayé, M.; Boudart, G. and Dumas, B. “Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens”. Plant Physiol Biochem 38(1/2):157-163 (2000).
- Ferreira, R. et al. “The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis.” Mol Plant Pathol 8, 677-700 (2007)
- Fritig, B. and Legrand, M. “Mechanisms of Plant Defense Responses” Springer Science-Business Media USA (1993).
- Fuentes-Silva, D. y Rodríguez-Romero, A. “Endo- β -1,3-glucanases recognized by antibodies of IgE type of sera of allergic patients”. Alergia, asma e inmunología pediátricas, Vol. 15, 1:35-42 (2006).
- Galeana-Sánchez, E. A. “Tesis: Asociación entre la producción de fumonisin B1 y la virulencia de *Fusarium verticillioides* en plántulas de maíz”. UNAM, FQ (2014)
- Galeana-Sánchez, E., Sánchez-Rangel, D., de la Torre-Hernández, M.E., Nájera-Martínez, M., Ramos-Villegas, P. y Plasencia, J. “Fumonisin B1 produced *in planta* by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize β -1,3-glucanase activity and increased aggressiveness” Physiol Mol Plant Pathol 100:75-83 (2017).
- Geiser, D. et al. “One Fungus, One Name: Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use”. Phytopathology 103(5):400-408 (2013).
- Girisham, S.; Koteswara, R. and Reddy, S. “Taxonomy of mycotoxigenic fungi” Scientific Publishers, India (2016).

- Glenn, A.E., et al. "Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisina production and pathogenicity on maize seedlings". *Mol Plant Microbe Interac* 21(1):87-97 (2008).
- Gutiérrez-Nájera, N., et al. "Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase." *Planta* 221, 589-96 (2005)
- Goñi Ramos, Ó. "Tesis de doctorado: Aislamiento, caracterización y funcionalidad de quitinasas y 1,3-β-glucanasas inducidas diferencialmente en frutos de *Annona cherimola* mill. por bajas temperaturas y elevadas concentraciones de CO₂". Universidad Complutense de Madrid (2011).
- Ham, K. et al. "Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo-β-1,3-glucanases." *Plant J* 11, 169-179 (1997)
- Hamid, R.; Khan, M.; Ahmad, M.; Ahmad, MM., Abdin, M.; Musrrat, J. and Javed, S. "Chitinases: an update" *J Pharm Bioallied Sci* 5(1):21-29 (2013).
- Izgu, F. and Altinbay, D. "Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo-β-1,3-glucanase" *Biosci Biotechnol Biochem* 68(3):685-693 (2004).
- Jackson, L.; DeVries, J. and Bullerman, L. "Fumonisin in food". Springer Science – Business Media. USA (1996a).
- Jackson, L.; Hlywka, J.; Senthil, K.; Bullerman, L. and Musser, S. "Effects of time, Temperature, and pH on the stability of fumonisina B1 in an Aqueous Model System" *J Agric Food Chem* 44:906-912 (1996b).
- Ji, C. et al. "Isoform Patterns of chitinase and β-1,3-glucanase in maturing corn kernels (*Zea mays* L.) associated with *Aspergillus flavus* mil stage infection". *J. Agric. Food Che.* 48:507-511 (2000).
- Jones, J. and Dangl, J. "The plant immune system" *Nature* 444:323-329 (2006).
- Kim, Y. and Hwang, K. "Isolation of a basic 34 kiloDalton β-1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems" *Physiol Mol Plant Pathol* 50:103-115 (1997).
- Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M., and Dixon R. A. "Signals and transduction mechanism for activation of plant defenses against microbial attack". *Cell* 56, 215-224 (1989).
- Lazzaro, I. et al. "Fumonisin B, A and C profile and masking in *Fusarium verticillioides* fumonisin-inducing and maize-based media". *Int J Food Microbiol* 159:93-100 (2012).

- Marín, S. et al. "Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors potential for modeling toxin formation in maize grain". *Int J Food Microbiol* 51:159-167 (1999).
- Martínez, J. "Tesis: Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de fumonisina B1 y la expresión de los genes del locus *FUM* de *Fusarium verticillioides*" FQ-UNAM (2017).
- McKee, T. y McKee, J. "Bioquímica: Las bases moleculares de la vida, 5ta edición" Graw-Hill Interamericana, Impreso en México, 2014.
- Michaelson, L.; Napier, J.; Molina, D. and Faure, J. "Plant sphingolipids: Their importance in cellular organization and adaptation" *Acta Biochim Biophys* 1861:1329-1335 (2016).
- Minic, Z. "Physiological roles of plant glycoside hydrolases" *Planta* 227:723-740 (2008).
- Munkvold, G.; McGee, D. and Carlton, W. "Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*". *Phytopathology* 87(2):209-217 (1997).
- Murray, R.; Bender, D.; Botham, K.; Kennelly, P.; Rodwell, V. and Weil, P. "Harper: Bioquímica ilustrada, 29a. edición". Ms Graw Hill-Interamericana, traducido al español, impreso en México (2012).
- O'Donnel, K. et al. "Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria". *Fungal Genet Biol* 52:20-31 (2013).
- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F. y Weinert, J. "*Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed". *Mycotoxin Res* 33:167-182 (2017).
- Oren, L., S. Ezrati, D. Cohen, y A. Sharon. "Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate". *Appl Environ Microbiol* 69:1695-1701 (2003).
- Pitt, Ji. "Mycotoxins: Fumonisin" CSIRO Animal, Food and Health Sciences (2014).
- Pizarro, S., Ronco, A. y Gotteland, R. "β-glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?". *Rev Chil Nutr* 41(4):439-446 (2014).
- Punja, Zamir and Zhang, Ye-Yan. "Plant chitinases and their roles in resistance fungal diseases". *J Nematol* 25(4):526-540 (1993).

- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M. and Singh, G. "Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans". J Adv Pharm Technol Res 2(2): 94-103 (2011).
- Reid, L. et al. "Interaction of *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation". Phytopathology 89:1028-1037 (1999).
- Riveros Angarita, A. "Inducción de resistencia en plantas, Interacción: planta-patógeno". Universidad del Tolima Ibagué, Tolima Colombia. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura (2010).
- Rose, J.; Ham, K.; Darvill, A. and Albersheim, P. "Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens" Plant cell 14:1329-1345 (2002).
- Sambamurty "Textbook of plant pathology: pathogen and plant disease" I.K. International Pvt- Ltd. India (2006).
- Sánchez-Rangel, D., Plasencia, J. "The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi." Toxin Rev 29:73-86 (2010)
- Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S. & Plasencia, J. "Fumonisin B1, a toxin produced by *F. verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response." Planta 235, 965-78 (2012)
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A. & Plasencia, J. "Fumonisin production by *F. verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains." J Agric Food Chem 53, 8565-71 (2005)
- Shen-Quan, et al. "Direct detection of β -1,3-glucanase isoenzymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels." Anal Biochem 182:136-140 (1989).
- Suen, D. "Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style" J Biol Chem 278(44):43672-43681 (2003).
- Summerell, B. et al. "A utilitarian approach to *Fusarium* identification". Plant Dis 87(2):117-128 (2003).
- Theumer, M.; Mary, V.; Arias, S. y Rubinstein, H. "Mecanismos de toxicidad de fumonisina B1 en células animales y vegetales". Revista BioCiencias (2012).
- Thomas, B. et al. "Endo-1,3-1,4-beta-glucanase from coleoptiles of rice and maize: role in the regulation of plant growth" Int J Biol Macromol 27(2):145-149 (2000).

- Williams, et al. "Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *F. verticillioides* and growth in natural soils." J Agric Food Chem 54, 5694-700 (2006)
- Windels, C.E.; Burnes, P.M. and Kommedahl, T. "Five-year Preservation of *Fusarium* species on Silica gel and soil". The American Phytopathological Society, Vol. 78, No. 1, (1988)
- Withers, S. y Williams, S. "Glycoside hydrolases". www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases Última visita: 19.02.2018.
- Wu, S.; Kriz, A.; Widholm, J. "Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class I chitinase in maize". Plant Physiol 105:1097-1105 (1994).
- Yescas-Huerta, K. "TMA: Fumonisin, toxinas contaminantes de maíz, producidas por *Fusarium spp* Propiedades, incidencia y análisis" UNAM-Facultad de Química (2001).
- Zipfel, C. y Felix, G. "Plants and animals: a different taste for microbes?" Curr Opin Plant Biol 8:353-360 (2005).

X. Apéndice

A. Materiales y Métodos

1. Amortiguador de extracción de proteínas I

Reactivo	Concentración final
Acetato de sodio	0.05 M
Sacarosa	250 mM
β -mercaptoetanol	5 mM
EDTA	10 mM
PVP	1%
Glicerol	10%
Tableta de inhibidor de proteasas	1-2 por cada 50 mL

El amortiguador de extracción II, solo tiene acetato de sodio, EDTA e inhibidor de proteasas.

2. Gel de electroforesis

Se armó la cámara de electroforesis Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster). Primero se ajustaron al mismo nivel la placa de Aluminio, los separadores y el vidrio. En seguida se montó en el soporte para presionarlos y que no se movieran, para ahora sí fijarlos en la base.

Se preparó primero el gel separador y se cargaron 3-4 mL si los separadores eran de 0.75 mm; si eran de 1.5 mm, se cargaban de 6 a 7 mL. Se dejó gelificar aprox. 20 min. En seguida se preparó el gel apilador y se cargaron 2-2.5 mL si los separadores eran de 0.75 mm; si eran de 1.5 mm, se cargaban de 4 a 5 mL. Se colocó el peine una vez añadido el gel apilador. Se dejó gelificar aprox. 20 min.

Una vez gelificado el gel separador, se desmontó el soporte de la base y después el vidrio del soporte. Se quitó el peine y se pasó a la cámara de corrimiento. Se sostuvo el vidrio con unas pinzas y se añadió amortiguador de electrodos 1x a la cámara de corrimiento.

3. Gel separador (Acrilamida 12%)

Componente	Cantidad
Amortiguador gel separador pH=8.8	2.5 mL
Acrilamida 30%	4.0 mL
PSA 10%	100 μ L
TEMED	4.0 μ L
Agua cbp 10mL	3.4 mL

4. Gel apilador

Componente	Cantidad
Amortiguador gel apilador pH=6.8	1.5 mL
Acrilamida 30%	1.0 mL
PSA 10%	50 μ L
TEMED	4.0 μ L
Agua cbp 6 ml	3.4 mL

5. Gel separador (Acrilamida 10%)

Componente	Cantidad
Amortiguador gel separador pH=8.8	2.5 mL
Acrilamida 30%	3.333 mL
PSA 10%	200 μ L
TEMED	8.0 μ L
Agua cbp 10mL	4.0 mL

6. Componentes cuantificación de proteína por Bradford

Muestra	BSA (μ g)	Volumen BSA (a partir de 3 μ g/ μ L)	Agua (μ L)	Reactivo de Bradford (μ L)	Amortiguador de extracción (I o II)
Blanco 1			1000		
Blanco 2			800	200	
Blanco 3			799	200	1 μ L
1	3	1	799	200	
2	6	2	798	200	
3	9	3	797	200	
4	12	4	796	200	
5	15	5	795	200	
6	18	6	794	200	
Muestra	x	1 μ L del extracto	799	200	

7. Componentes del amortiguador de carga desnaturizante y nativo

Componentes	1 M Tris-HCl pH=6.8	10% SDS	Glicerol	β -mercaptoetanol	1% azul de bromofenol	Agua
Cantidad Desnaturalizante (2x)	1 mL	4 mL	2 mL	2.5 mL	500 μ L	cbp 10.0 mL

Nativo (2x)	1 mL	----	2 mL	----	500 µL	cbp 10.0 mL
-------------	------	------	------	------	--------	-------------------

Los desnaturalizantes tienen 1% o 2% de SDS, dependiendo el protocolo.

8. Componentes del amortiguador de electrodos

Componentes		Tris	SDS	Glicina	Agua
Cantidad	Desnaturalizante (10x)	15.41 g	5 g	144 g	cbp 500.0 mL
	Nativo (10x)	15.41 g	----	144 g	cbp 500.0 mL

Diluir 10 veces (1x) el amortiguador el día de uso y mantener frío.

9. Componentes del amortiguador del gel separador y amortiguador del gel separador para gel nativo

Componentes		Tris	SDS	pH	Agua
Canti-dad	Desnaturalizante (2x)	11.82 g	0.2 g	Ajustar con HCl a 8.8	cbp 50.0 mL
	Nativo (2x)	11.82 g	----	Ajustar con HCl a 8.8	cbp 50.0 mL

10. Componentes del amortiguador del gel apilador y amortiguador del gel apilador para gel nativo

Componentes		Tris	SDS	pH	Agua
Cantidad	Carga (2x)	3.94 g	0.2 g	Ajustar con HCl a 6.8	cbp 50.0mL
	Nativo (2x)	3.94 g	----	Ajustar con HCl a 6.8	cbp 50.0 mL

11. Solución fijadora/desteñidora

Mezclar 500 ml de metanol, 100 ml de ácido acético y 400 ml de agua desionizada.

Almacenar en frasco a temperatura ambiente.

12. Solución teñidora

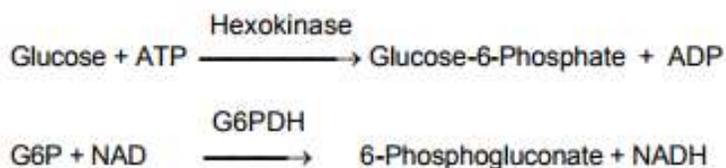
Componente	Cantidad
Metanol	1500 mL
Agua desionizada	1500 mL
Ácido acético	800 mL
Azul de Coomassie (Brilliant Blue G250)	6 g

13. Medio Czapek modificado

Componente	Cantidad
Sacarosa	1 g
Nitrato de sodio	0.2 g
Sulfato de magnesio	0.05 g
Cloruro de potasio	0.005 g
Extracto de levadura	0.05 g
Amortiguador de acetatos 0.05M pH=6.0	Cbp 100.0 mL

14. Fundamento de la actividad espectrofotométrica de la actividad de β -glucanasas.

La acción enzimática del reactivo de glucosa produce glucosa 6-fosfato con un aumento en la formación de NADH detectada a $\lambda=340$ nm.



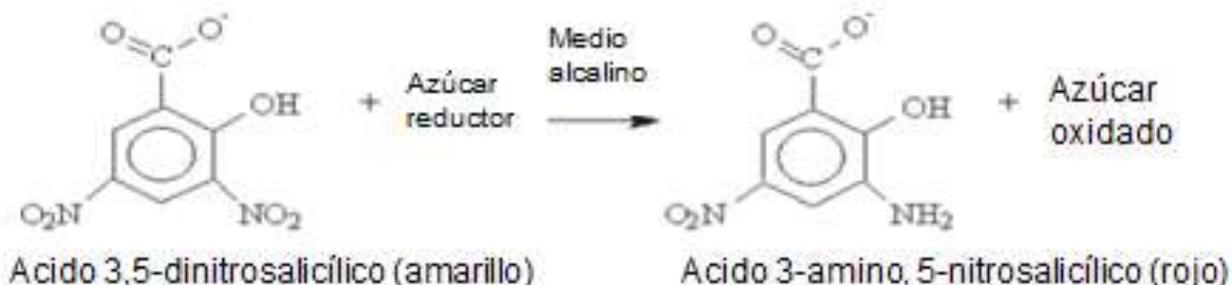
15. Reactivo DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico, por sus siglas en inglés)

Pesar 100 mg de DNS, adicionar 2mL de NaOH 2 M +4.66 mL de solución de TSP* + 3.32 mL de agua. Almacenar no más de 10 días en refrigeración y protegido de la luz.

*Solución de TSP: disolver 30 g de tartrato de sodio y potasio en 50.0 mL de agua. Añadir lentamente en agitación. Conservar en refrigeración, si se vuelve a usar, agitar en baño María para disolver los cristales formados.

16. Fundamento de la medición de azúcares reductores con DNS

Es una reacción colorimétrica entre los azúcares reductores que reducen al DNS, que se revela en solución alcalina produciendo ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico (Ver figura). Se lee la absorbancia a $\lambda=540$ nm.

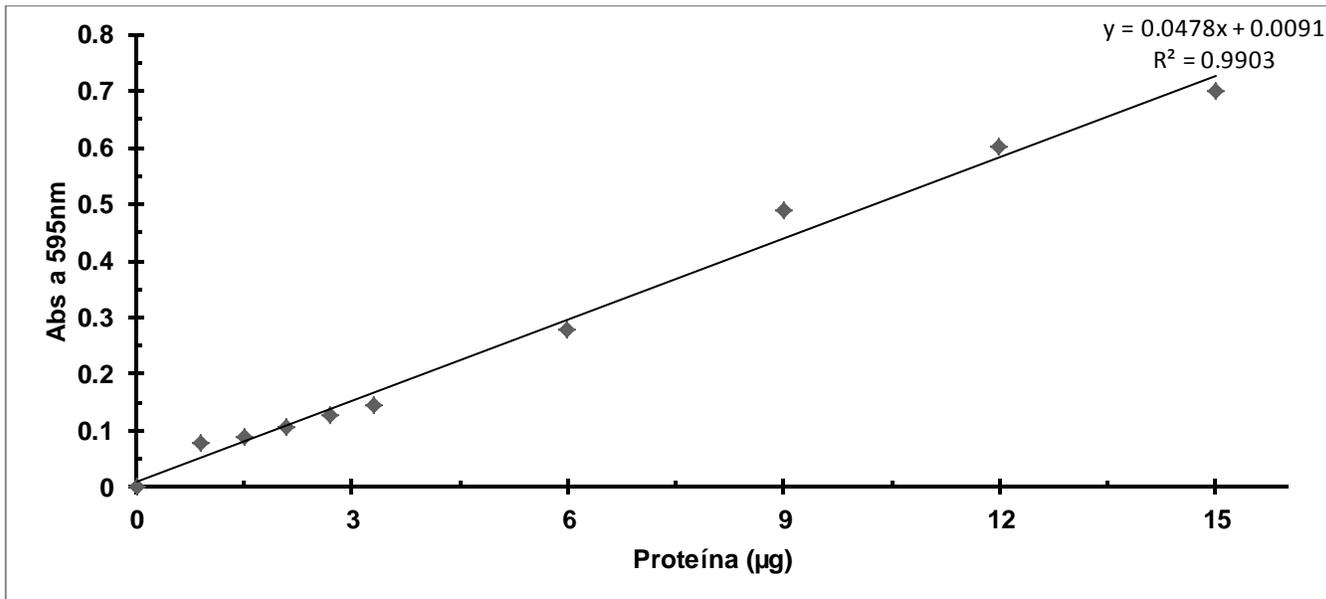


17. Curva patrón de glucosa

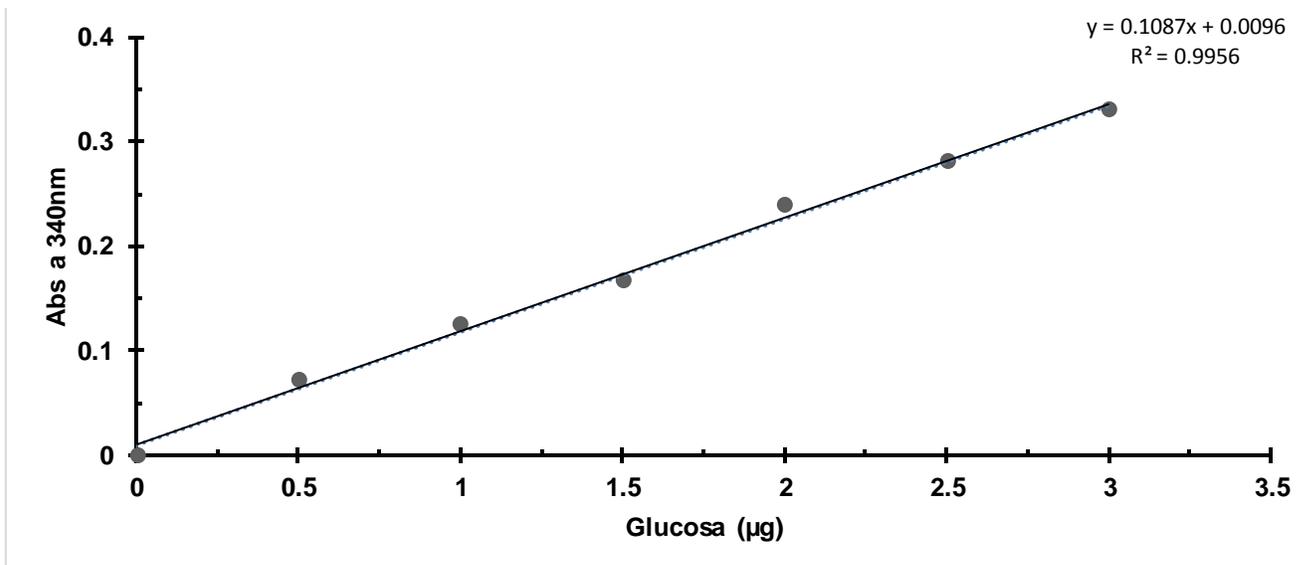
Muestra	Cantidad de glucosa	Estándar 1µg/µL Glucosa (µL)	Agua (µL)
Blanco curva	0	0	50
1	3	3	47
2	6	6	44
3	9	9	41
4	12	12	38
5	15	15	35
6	18	18	32

B. Resultados adicionales

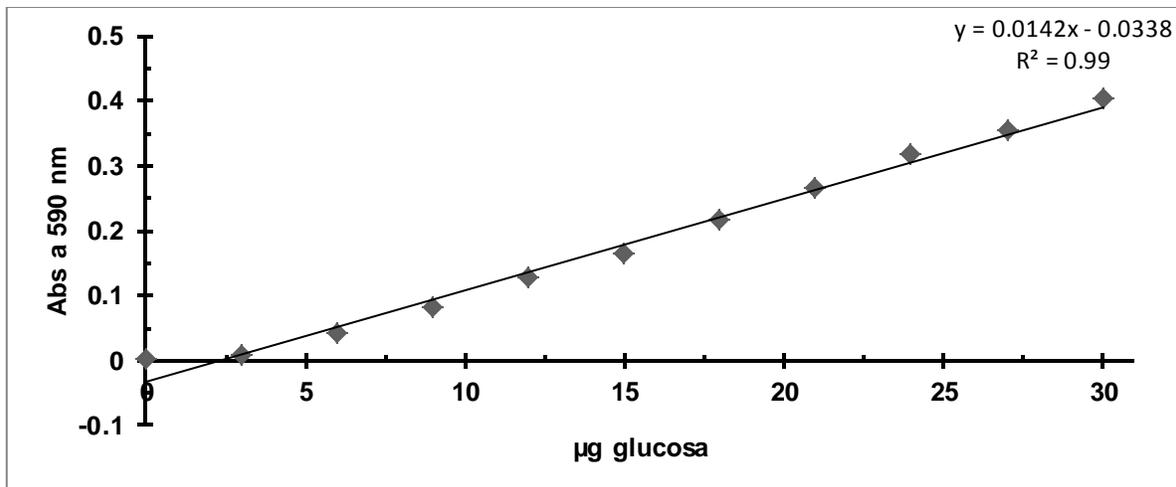
1. Curva patrón de proteínas determinadas por la técnica de Bradford. Se empleó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.



2. Curva de glucosa determinada con el método enzimático (Glucose assay reagent /SIGMA)



3. Curva de glucosa determinada con ácido dinitro-salicílico (DNS).



4. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

El gel de otras fracciones de exclusión molecular donde los primeros carriles corresponden a la fracción 56 de intercambio iónico, que en la réplica biológica dio más actividad y por ello se inyectó a columna de exclusión molecular, donde se presenta muy bajos niveles de proteína en el rango de P.M. entre 50 y 75 kDa (Ilustración 1), así mismo los carriles verdes son a partir de la fracción 59 de intercambio iónico con el mismo intervalo de bandas (Ilustración 1).

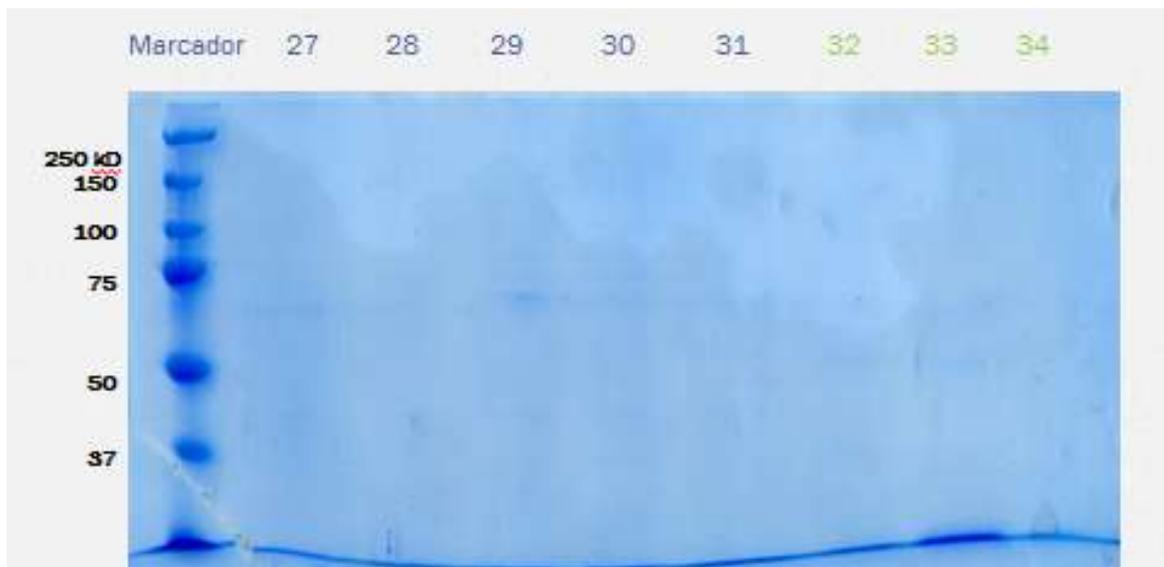


Ilustración 1 Análisis de las fracciones retenidas en la cromatografía de exclusión molecular por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas de las fracciones 27-31 provienen de la fracción 56 de intercambio iónico y las proteínas de las fracciones 32-34 provienen de la fracción 59 de intercambio iónico. Se separaron en un gel de poliacrilamida (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.

A partir de juntar varias fracciones consecutivas, se hicieron experimentos y así mismo el gel desnaturalizante, donde vemos un patrón de 7-9 bandas en el pool I y de 6-8 bandas en el pool II (Ilustración 2). En el pool I hay bandas entre 37-100kDa y en el pool II son menor de 37kDa y máximo 75kDa. En ambos la banda más intensa está en 50kDa (Ilustración 2).



Ilustración 2 Análisis de las fracciones retenidas en la cromatografía de intercambio iónico por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas de las fracciones se separaron en un gel de poliacrilamida (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. En el pool I se juntaron las fracciones 45-48 de intercambio iónico y en el pool II las fracciones 58-61 igualmente de intercambio iónico. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.

Las fracciones no retenidas en la columna de intercambio iónico también se estudiaron y su separación por SDS-PAGE se presenta en la Ilustración 3. Estas proteínas son abundantes y están en un rango de P.M. entre 20 y 75 kDa.

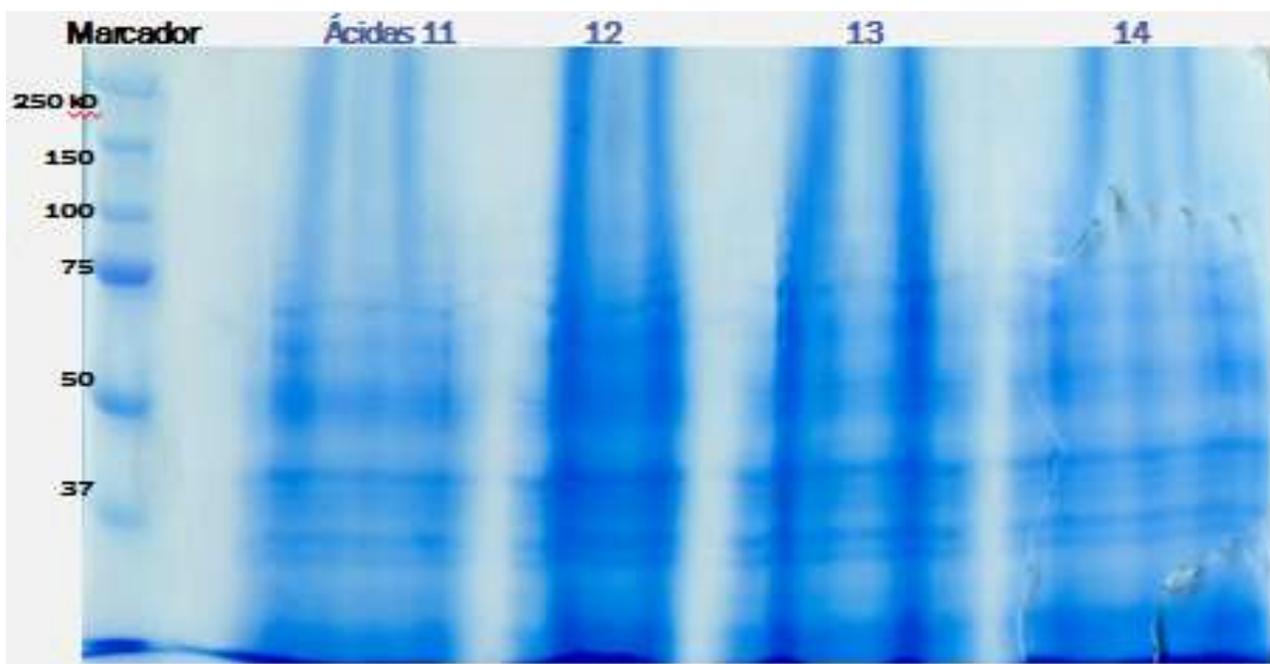


Ilustración 3 Análisis de las fracciones retenidas en la cromatografía de intercambio iónico por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas de las fracciones se separaron en un gel de poliacrilamida (12%) y fue teñido con azul de Coomassie. Las fracciones provienen de intercambio iónico y se catalogan como ácidos por no retenerse en la columna a pH=5.0. En el carril 1 se cargaron los marcadores de P.M.

5. Ensayos de renaturalización de geles para ensayo de actividad en gel

Para conocer el peso molecular de las bandas teñidas en el ensayo de actividad en gel, se corrió el extracto de proteínas en geles desnaturizantes y se probaron varios protocolos para la renaturalización de las proteínas. Sin embargo, con ninguna de las aproximaciones ensayadas se tuvo éxito para renaturalizar la actividad de glucanasa al no observar bandas en el revelado de actividad (ilustración 4). Se tiñeron los geles con Coomassie para corroborar que se tuvieran proteínas en los carriles (ilustración 5) y se hizo el ensayo en condiciones nativas para corroborar que aún tuvieran actividad (ilustración 6), con lo que se concluye que las glucanasas son muy sensibles a la desnaturización por SDS.

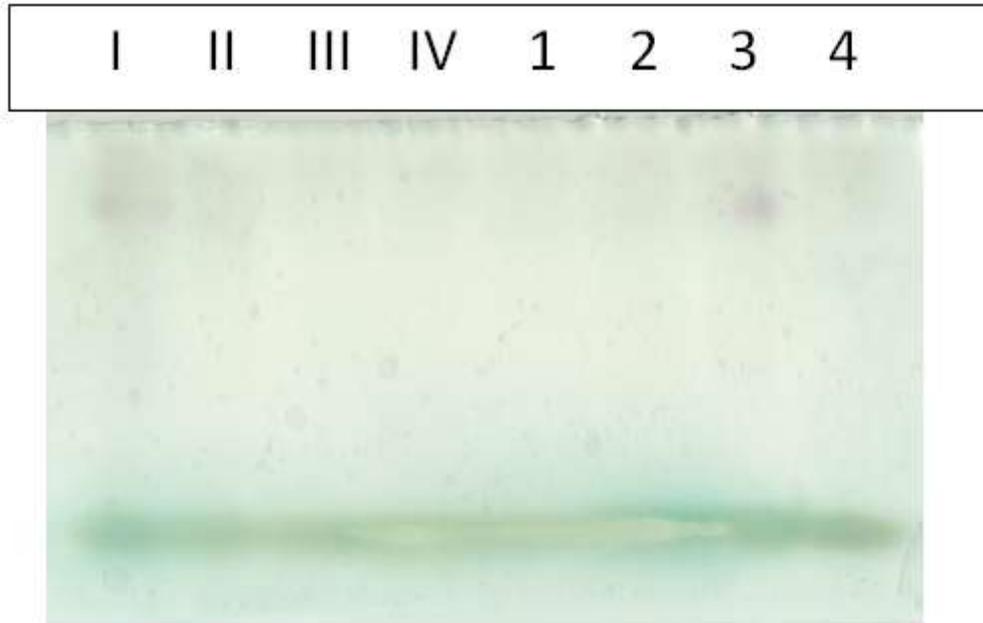


Ilustración 4 Revelado de la actividad en gel en condiciones semidesnaturalizantes y/o renaturalizantes. En todos los protocolos se obtuvieron geles sin bandas. Se cargaron 200 μg de proteína en cada carril de las diferentes muestras de extracto crudo de proteína a partir de embriones de maíz.

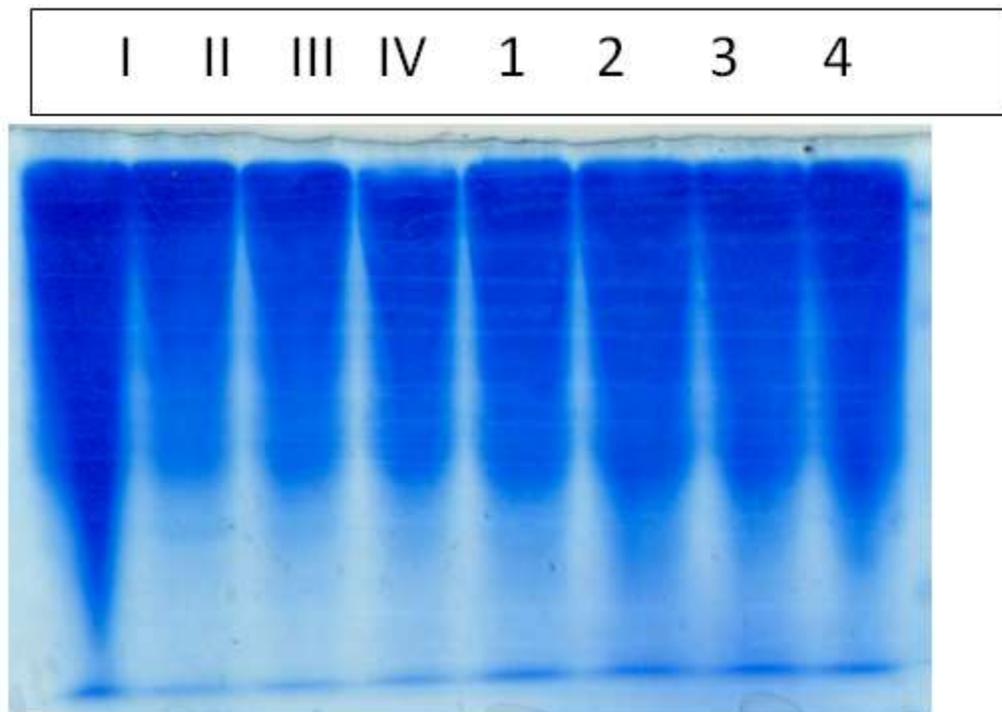


Ilustración 5 Tinción de Coomassie de geles en condiciones semidesnaturalizantes y/o renaturalizantes. Se cargaron 200 μg de proteína en cada carril de las diferentes muestras de extracto crudo de proteína a partir de embriones de maíz.



Ilustración 6 Ensayo de actividad en condiciones nativas. Se cargaron 200 μg de proteína en cada carril de las diferentes muestras de extracto crudo de proteína a partir de embriones de maíz.

En los geles de las ilustraciones 4-6, los carriles se cargaron con 200 μg de proteína a partir de las muestras de acuerdo a la siguiente tabla:

Carril	Muestra
I	
II	Réplicas biológicas de embriones de maíz incubados 24h a 29°C con luz del 8.marzo.2017
III	
IV	
1	
2	Réplicas biológicas de embriones de maíz incubados 24h a 29°C con luz del 2.febrero.2017
3	
4	