



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DEL cDNA Y EXPRESIÓN DEL GEN
DE LA BETA-1,3-GLUCANASA (*GlucA*) DE MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MENDOZA REZA CITLALLI

CD.MX. 2021





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

VOCAL: Profesor: GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS

SECRETARIO: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

1er. SUPLENTE: Profesor: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

2° SUPLENTE: Profesor: MANUEL GUTIÉRREZ AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

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:

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María Manuela Nájera Martínez

SUSTENTANTE:

Citlalli Mendoza Reza

Agradecimientos

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

Citlalli Mendoza Reza recibió una beca (conclusión de estudios) y una beca (tesis) del proyecto DGAPA-PAPIIT IN213517 durante el desarrollo de este trabajo.

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico

AS: Ácido salicílico

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamientos Locales (Basic Local Alignment Search Tool)

cDNA: DNA complementario

CYA: Agar extracto de levadura Czapek

DCPA: Agar dicloro cloranfenicol peptona

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DS: Desviación estándar

ESN: Esfinganina

ETI: Inmunidad inducida por efectores

ETS: Susceptibilidad Activada por el Efector

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)

FB1: Fumonisina B1

FPLC: Cromatografía líquida de la proteína rápida (Fast Protein Liquid Chromatography)

GH: Glicosil hidrolasas

hpi: Horas después de la inoculación (Hours post inoculation)

HR: Respuesta hipersensible

kDa: Kilo Dalton

LB: Luria-Bertani

LCB: Base esfingoidea de cadena larga

LPS: lipopolisacárido

LRR: Repetición rica en leucina

MAPKs: Proteínas cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)

MDMV: Virus del mosaico y enanismo del maíz (Maize Dwarf Mosaic Virus)

NB: Dominio de unión a nucleótidos

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

pb: Pares de bases

PDA: Agar papa dextrosa

PGN: Peptidoglucano

pl: Punto isoeléctrico

PKC: Proteína cinasa C

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

PRs: Proteínas relacionadas a patogénesis

PSN: Fitoesfinganina

PTI: Inmunidad Inducida por PAMPs

RE: Retículo Endoplasmático

RLK: Cinasas similares a receptores

RNA: Ácido ribonucleico

SAGARPA: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, y Pesca y Alimentación

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

TAE: Tris-ácido acético-EDTA

TB: Terrific Broth

TMV: Virus del mosaico del tabaco

UV: Ultravioleta

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
A. Maíz	2
1. Producción de maíz en México	2
2. Generalidades de botánica del maíz	4
3. Estructura de la semilla de maíz	6
4. Fisiología de la germinación de maíz	8
5. Patógenos de maíz	10
B. <i>Fusarium verticillioides</i>	11
1. Taxonomía y características de <i>F. verticillioides</i>	11
2. Enfermedades que produce <i>F. verticillioides</i> en maíz	13
3. Producción de micotoxinas	15
C. Fumonisinias	17
1. Estructura y propiedades químicas	17
2. Mecanismos de acción de la fumonisinina B1	18
3. Blancos de la fumonisinina B1 en tejidos de maíz	20
4. Función de la fumonisinina B1 en la virulencia de <i>F. verticillioides</i>	23
D. Interacción <i>F. verticillioides</i> –maíz	24
1. Respuesta de defensa en maíz	24
2. Proteínas relacionadas a patogénesis	26
3. Quitinasas y β -1,3-glucanasas	28
4. Función de las β -1,3-glucanasas en la defensa contra hongos	31
E. Antecedentes inmediatos	33
1. Interacción fumonisinina B1- β -1,3-glucanasas	33
2. Purificación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz	35
III. Hipótesis	37
IV. Objetivos generales y particulares	37
V. Materiales y Métodos.	38
A. Material biológico: Cepa MY3 de <i>Fusarium verticillioides</i>	38
1. Crecimiento de la cepa MY3 de <i>F. verticillioides</i>	38
2. Conteo de conidios y preparación del inóculo	38

B. Material biológico: Embriones de maíz embebidos.....	39
1. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz.	40
2. Germinación de embriones de maíz con diferentes tratamientos.	40
C. Efecto de la infección de <i>F. verticillioides</i> y la presencia de FB1 sobre los niveles de transcrito de <i>ZmGlucA</i>	40
1. Extracción de RNA total.	40
2. Análisis electroforético del RNA total.	41
3. Calibración por densitometría.	42
4. Reacción RT-PCR.....	42
D. Amplificación del cDNA de <i>ZmGlucA</i> y clonación en pGEM [®] -T Easy.....	45
1. Amplificación de <i>ZmGlucA</i>	45
2. Ligación de <i>ZmGlucA</i> al vector pGEM [®] -T Easy.	46
3. Transformación de células competentes.....	47
4. Extracción de DNA plasmídico.....	49
E. Clonación direccional de <i>ZmGlucA</i> en pET28b (+).	51
1. Análisis bioinformático.	51
2. Amplificación de <i>ZmGlucA</i> con oligonucleótidos que contienen un sitio de restricción para <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i>	51
3. Ligación de <i>ZmGlucA</i> con sitios de restricción <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i> al vector pGEM [®] -T Easy.	52
4. Transformación de células competentes DH5 α	52
5. Extracción de DNA plasmídico y PCR confirmativo.	53
6. Ensayo de restricción del DNA plasmídico recombinante y del vector pET28b (+).	54
7. Ligación de <i>ZmGlucA</i> al vector pET28b (+).	55
8. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α con DNA plasmídico pET28b(+)/ <i>ZmGlucA</i> , extracción de DNA plasmídico y PCR confirmativo.....	55
9. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> BL21-RIL con DNA plasmídico pET28b(+)/ <i>ZmGlucA</i> para la sobreexpresión.....	56
F. Sobreexpresión de <i>ZmGlucA</i> recombinante.	56
1. Inducción de <i>ZmGlucA</i> recombinante con IPTG.	56
2. Lisis celular de <i>E. coli</i> BL21-RIL transformada.	57

3. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.	57
4. Electroforesis de proteínas.	58
5. Detección de la proteína recombinante por Western blot.	58
VI. Resultados	61
A. La expresión del gen <i>ZmGlucA</i> se induce por la infección de <i>Fusarium verticillioides</i> y la presencia de fumonisina B1 en embriones de maíz durante la germinación.....	61
B. Aislamiento del cDNA de <i>ZmGlucA</i> y clonación en pGEM [®] -T Easy.	64
1. Aislamiento del cDNA de <i>ZmGlucA</i>	64
2. Clonación de <i>ZmGlucA</i> en pGEM [®] -T Easy.	65
3. Análisis de la secuencia del gen <i>ZmGlucA</i>	65
C. Clonación direccional de <i>ZmGlucA</i> en pET28b (+).....	69
1. Clonación de la forma madura de <i>ZmGlucA</i> en pGEM [®] -T Easy.	69
2. Subclonación de la forma madura de <i>ZmGlucA</i> en pET28b (+).....	69
D. Sobreexpresión de <i>ZmGlucA</i> recombinante.	71
E. Identificación de la etiqueta 6X-His en la proteína recombinante mediante Western blot.	72
VII. Discusión	74
A. Patrón de expresión de <i>ZmGlucA</i> de embriones de maíz en respuesta a la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> y la presencia de fumonisina B1.	74
1. Papel de las β -1,3-glucanasas en la defensa de las plantas contra patógenos e isoformas básicas como blanco de la FB1.....	74
2. Inducción de <i>ZmGlucA</i> en embriones de maíz germinados infectados con <i>F. verticillioides</i> y en presencia de FB1.....	76
B. Clonación y obtención de la proteína recombinante.	78
1. Características de la secuencia de <i>ZmGlucA</i> y homología con otras β -1,3-glucanasas de maíz.	78
2. <i>ZmGlucA</i> recombinante se produce de forma abundante y corresponde a una glucanasa básica.	79
VIII. Conclusiones y perspectivas	81
IX. Bibliografía	82
X. Anexos	102
A. Anexos materiales y métodos.....	102

1. Preparación de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) 0.5X para la cepa MY3 de <i>F. verticillioides</i>	102
2. Preparación de medio de cultivo para embriones.	102
3. Componentes de la mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT).	103
4. Composición de la mezcla de reacción para la adenilación de los extremos 3' de los productos de PCR.	103
5. Fórmula para calcular la cantidad de inserto a ligar.	104
6. Preparación de células competentes.	104
7. Mapas de los vectores pGEM [®] -T Easy y pET28b (+).	105
8. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de las clonas recombinantes pGEM [®] -T Easy/ <i>ZmGlucA</i>	106
9. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de pET28b(+)/ <i>ZmGlucA</i>	106
10. Determinación de proteína por Bradford	107
11. Soluciones utilizadas en el Western blot.	107
B. Anexo Resultados.....	108
1. Calibración del RNA total.	108
2. Determinación de las condiciones de amplificación del gen de la β -1,3-glucanasa (<i>ZmGlucA</i>) de maíz y del gen de referencia (<i>ZmEF1α</i>), mediante RT-PCR punto final.	109
3. Electroferograma obtenido de la secuenciación de <i>ZmGlucA</i> clonado en pGEM [®] -T Easy.	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Volumen de la producción nacional de grano de maíz en el período 2012-2017, en miles de toneladas.	2
Figura 2. Balanza disponibilidad-consumo de maíz blanco y amarillo en México.	4
Figura 3. Ilustración de una planta de maíz madura que muestra sus principales órganos.	5
Figura 4. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal aumentado aproximadamente 30 veces.	7
Figura 5. Colonias de <i>F. verticillioides</i> (a) en PDA y DCPA, 7 días, 25°C; (b) fiálides con cadenas de microconidios, barra =50 µm; (c) fiálides, barra =10 µm; (d) macro y microconidios, barra = 10 µm.	13
Figura 6. Biosíntesis de fumonisinas. A. Estructura genómica del locus <i>FUM</i> en el cromosoma 1 de <i>F. verticillioides</i> . B. Ruta biosintética de las fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos de los genes del locus <i>FUM</i> .	16
Figura 7. Estructura química de las fumonisinas del grupo B.	17
Figura 8. Estructura química de la esfinganina.	18
Figura 9. Vías de señalización implicadas en la toxicidad inducida por la FB1.	19
Figura 10. Blancos moleculares de la fumonisina en células de maíz.	22
Figura 11. Modelo en zigzag del sistema inmune de la planta. Por sus siglas en inglés PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, Avr-R: proteína R que reconoce las proteínas Avr del patógeno, PTI: Inmunidad Activada por PAMPs, ETS: Susceptibilidad Activada por el Efector, ETI: Inmunidad Activada por Efector, HR: Respuesta de Hipersensibilidad.	26
Figura 12. Clasificación de las quitinasas según su modo de acción.	29
Figura 13. Fragmento de un polímero de glucano donde se observan enlaces β -1,3 y β -1,6 glucosídicos. Los enlaces β -1,3 se encuentran entre moléculas de glucosa adyacentes y los β -1,6 unen cadenas lineales de glucosas.	30
Figura 14. Clasificación de β -glucanasas según la posición de hidrólisis.	31
Figura 15. Actividad total de β -1,3-glucanasa en embriones de maíz en germinación embebidos en ausencia o presencia de FB1 20 µM, se determinó usando laminarina como sustrato. El asterisco indica una diferencia significativa entre el control y los embriones tratados con FB1 en cada punto de tiempo ($p \leq 0.05$).	34
Figura 16. Patrones de movilidad de isoformas de β -1,3-glucanasa de embriones de maíz embebidos durante 18 y 24 h en ausencia o presencia de FB1 20 µM, determinado por ensayos en gel nativos usando laminarina como sustrato.	34
Figura 17. Efecto <i>in vitro</i> de la FB1 sobre isoformas básicas de β -1,3-glucanasa de maíz. Actividad de β -1,3-glucanasa determinada en extractos de proteínas de embriones germinados 24 h, utilizando el ensayo en gel incubado con FB1 100 µM.	35

- Figura 18.** Cromatograma de intercambio catiónico en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. 36
- Figura 19.** Cámara de Neubauer. El conteo se realizó en cada cuadrante de las esquinas y se obtuvo el promedio de conidios. 39
- Figura 20.** Curva patrón de proteínas determinadas por Bradford. Se empleó BSA como estándar. 58
- Figura 21.** Embriones de maíz embebidos durante 30 h. Se incluye el control sin tratamiento, la aplicación de FB1 (20 μ M) y la inoculación con 50,000 conidios de *F. verticillioides*. 61
- Figura 22.** Evaluación de la integridad del RNA total en gel de agarosa al 2.5 %. El RNA total se aisló de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos, se cargó 1 μ g de cada muestra. C₀, 0 h Embriones secos; C Control; F Tratamiento con FB1 20 μ M; M Infección con *F. verticillioides*, incubados por 12, 24 y 30 h. 62
- Figura 23.** Niveles de transcritos de los genes β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) y *ZmEF1 α* . Los cDNAs se obtuvieron por RT-PCR a partir de RNA total aislado de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos e incubados a 12, 24 y 30 h, y se separaron en gel de agarosa al 2.5 %. Amplicón del gen de referencia *ZmEF1 α* 135 pb, Amplicón del gen β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) 189 pb. C₀, 0 h Embriones secos; C, Control; F, Tratamiento con FB1 20 μ M; M, Infección con la cepa MY3 de *F. verticillioides*. Los embriones control y con los diferentes tratamientos fueron incubados por 12, 24 y 30 h. 63
- Figura 24.** Análisis densitométrico del efecto de *Fusarium verticillioides* y FB1 sobre los niveles de expresión del transcrito de *ZmGlucA*. C₀, 0 h Embriones secos; C Control; F Tratamiento con FB1 20 μ M; M Infección con la cepa MY3 de *F. verticillioides*, incubados a 12, 24 y 30 h. Se muestra el promedio \pm DS de dos réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una. 64
- Figura 25.** Imagen de gel agarosa al 1.2% con banda resultante del PCR a partir del molde de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. Se utilizó una concentración de oligonucleótidos de 0.8 μ M, 30 ciclos, Desnaturalización inicial 98°C, 45 s; Desnaturalización 98°C, 20 s; Alineamiento 60°C, 30 s; Extensión 72°C, 30 s; Extensión final 72°C, 7 min. Tamaño del Amplicón 1,088 pb. 64
- Figura 26.** Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*.Tamaño del Amplicón 1,088 pb. 65
- Figura 27.** Alineamiento del gen de la β -1,3-glucanasa clonado, con la secuencia conocida del gen *ZmGlucA*. *Query* es la secuencia del gen clonado y *Sbjct* es la secuencia conocida del gen *ZmGlucA*. Los cuadros rojos muestran las diferencias entre ambas secuencias. 66
- Figura 28.** Secuencia del cDNA de *ZmGlucA* clonado. Tamaño de la secuencia: 1,084 pb. Las flechas rojas delimitan el cDNA correspondiente a la forma madura de la β -1,3-glucanasa, tiene un tamaño de 960 pb y codifica 320 residuos de aminoácidos. Región 3' UTR de 124 pb. 68
- Figura 29.** Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: 69

Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA* (Cβ2).
69

Figura 30. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA*, para verificar la presencia de *ZmGlucA* en colonias transformadas de *E. coli* DH5α. Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. 70

Figura 31. Patrón de digestión del DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA* con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. Gel de agarosa al 1.2%. Se muestra las banda resultantes del ensayo de restricción *ZmGlucA* 960 pb y pET28b(+) 5,369 pb. 71

Figura 32. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA*, para verificar la presencia del gen *ZmGlucA* en las colonias transformadas con pET28b(+)/*ZmGlucA* en la cepa *E. coli* BL21-RIL. Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA* (Cβ2). 71

Figura 33. Expresión de *ZmGlucA* recombinante en *Escherichia coli* BL21-RIL. Electroforesis en poliacrilamida- SDS (15%). Conc. de IPTG 1mM. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Ca y Cb son clonas transformadas con DNA plasmídico recombinante pET28b(+)/*ZmGlucA*. 72

Figura 34. Western blot para la detección de la proteína recombinante *ZmGlucA*. Los extractos celulares se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% y se cargaron aproximadamente 2-35 μg de proteína, el gel se transfirió a una membrana de PVDF. 73

Figura 35. Árbol filogenético basado en la alineación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las glucanasas putativas de maíz. Las secuencias de proteínas se alinearon con el software Clustal X y la estructura filogenética se construyó con el software Treeview. 79

Figura 1A. Mapa del vector de clonación pGEM[®]-T Easy. 105

Figura 2A. Mapa del vector de expresión pET28b (+). 106

Figura 1B. Barrido de ciclos para el gen β-1,3-glucanasa de maíz (*ZmGlucA*). La parte lineal se encuentra entre los ciclos 30 y 32. Temp. de alineamiento 60 °C y la concentración de oligonucleótidos en 0.6 μM. 110

Figura 2B. Barrido de ciclos para el gen *ZmEF1α*. La parte lineal se encuentra entre los 24 y 28 ciclos. La T de alineamiento es de 65 °C y la concentración de oligonucleótidos de 0.1 μM. 110

Figura 3B. Electroferograma obtenido del gen *ZmGlucA* clonado en en pGEM[®]-T Easy. 111

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales entidades federativas productoras de maíz en 2012 y 2017.	3
Tabla 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%).	8
Tabla 3. Principales patógenos de maíz.	10
Tabla 4. Taxonomía de <i>F. verticillioides</i> .	13
Tabla 5. Familias reconocidas y propuestas de proteínas relacionadas con la patogénesis.	27
Tabla 6. Péptidos correspondientes a una β -1,3-glucanasa de maíz (<i>E1AFV5</i> ; <i>ZmGlucA</i>).	36
Tabla 7. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para PCR utilizando el kit Go Taq [®] DNA Polimerasa (Promega).	43
Tabla 8. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados.	44
Tabla 9. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes <i>ZmGlucA</i> y <i>ZmEF1α</i> .	44
Tabla 10. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para PCR con el kit iProof [™] High-Fidelity PCR (BIO-RAD).	45
Tabla 11. Condiciones para la amplificación del cDNA de <i>ZmGlucA</i> con el kit iProof [™] High-Fidelity PCR de BIO-RAD.	46
Tabla 12. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA completo de <i>ZmGlucA</i> .	46
Tabla 13. Composición de la reacción de ligación.	47
Tabla 14. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos con sitios de restricción para <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i> utilizados para la amplificación de <i>ZmGlucA</i> .	51
Tabla 15. Condiciones para la amplificación del cDNA de <i>ZmGlucA</i> con el kit iProof [™] High-Fidelity PCR de BIO-RAD.	52
Tabla 16. Condiciones para la amplificación de <i>ZmGlucA</i> con oligonucleótidos que contienen sitios de restricción para <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i> , utilizando el kit Go Taq [®] DNA Polimerasa (Promega).	53
Tabla 17. Componentes del ensayo de Restricción.	54
Tabla 18. Composición de la reacción de ligación [<i>ZmGlucA</i> con sitios de restricción <i>NdeI</i> y <i>EcoRI</i> al vector pET28b (+)].	55
Tabla 19. Porcentaje de identidad de <i>ZmGlucA</i> clonada con β -1,3-glucanasas de plantas. Se utilizó la herramienta BLAST de NCBI.	67
Tabla 1A. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT).	103

Tabla 2A. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la adenilación del producto de PCR.	103
Tabla 3A. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de las clonas recombinantes pGEM [®] -T Easy/ <i>ZmGlucA</i> .	106
Tabla 4A. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de pET28b(+)/ <i>ZmGlucA</i> .	106
Tabla 5A. Componentes de la curva estándar de BSA 3 mg/mL y preparación de la muestra.	107
Tabla 6A. Composición de la solución de transferencia.	107
Tabla 7A. Composición de la solución de bloqueo.	108
Tabla 8A. Composición de la solución de lavado.	108
Tabla 1B. Valores de densitometría de las bandas de RNAr. El RNA total se aisló de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos. C ₀ , 0 h Embriones secos; C Control; F Presencia de 20 μM de FB1; M Infección con la cepa MY3 de <i>Fusarium verticillioides</i> , incubados a 12, 24 y 30 h. Se muestran los valores de dos replicas realizadas.	109

I. Resumen

El maíz es uno de los cereales más importantes cultivados en el mundo, especialmente en México donde tiene gran importancia económica, social y cultural. Su producción se ve limitada por la presencia del patógeno fúngico *Fusarium verticillioides* que tiene una alta incidencia en maíz y puede causar diversas enfermedades como la pudrición del tallo y la mazorca, además produce fumonisinas; un grupo de micotoxinas que constituyen un factor de virulencia del hongo. La fumonisin B1 (FB1) es la más abundante y ejerce su acción en tres blancos moleculares: la esfinganina N-acil transferasa, la ATPasa de protones de membrana plasmática y las β -1,3-glucanasas básicas. Las β -1,3-glucanasas son proteínas relacionadas a patogénesis de la familia 2 (PR-2) y juegan un papel importante en la respuesta de defensa de las plantas al inducirse después de la infección por patógenos fúngicos. El presente trabajo se realizó para estudiar el patrón de expresión de la β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) de embriones de maíz en respuesta a la infección por la cepa MY3 de *F. verticillioides* y la presencia de FB1. Se encontró que a las 24 y 30 horas el tratamiento con FB1 induce la expresión del gen *ZmGlucA* al igual que el tratamiento con la cepa MY3, lo que sugiere que *ZmGlucA* está involucrado en la defensa del huésped contra las invasiones de patógenos. Adicionalmente se clonó el cDNA correspondiente a *ZmGlucA* de un tamaño de 1,088 pb a partir de embriones de maíz, este fragmento contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 320 residuos de aminoácidos con un tamaño deducido de 34 kDa y un pI de 9.47, se realizó un análisis BLAST donde se encontró una alta identidad (98.17%) con una β -1,3-glucanasa básica de maíz notificada *ZmGns*. Se produjo la proteína recombinante en un sistema heterólogo de bacteria (*E. coli* BL21-RIL) y los resultados indican la presencia de una proteína abundante de aprox. 34 kDa.

II. Introducción

A. Maíz

1. Producción de maíz en México

En México el maíz es el cultivo más importante por su impacto económico, social y cultural. Con un consumo promedio per cápita al año de 194.4 kg de maíz blanco, especialmente en las tortillas, representa 20.9 % del gasto en Alimentos, Bebidas y Tabaco realizado por las familias mexicanas (SAGARPA, 2017).

Entre 2012 a 2017, la producción de grano de maíz en México fue en promedio de 23,420,000 toneladas con un aumento promedio anual de 4.7%, derivado del incremento en los rendimientos de la cosecha (Fig. 1; SAGARPA & SIAP, 2018).



Figura 1. Volumen de la producción nacional de grano de maíz en el período 2012-2017, en miles de toneladas (Tomado de SAGARPA & SIAP, 2018).

Entre los estados, Sinaloa, Jalisco y el Edo. de México son los responsables de aproximadamente el 44% del maíz en México (Tabla 1; SAGARPA & SIAP, 2018).

Tabla 1. Principales entidades federativas productoras de maíz en 2012 y 2017 (Tomado de SAGARPA & SIAP, 2018).

Rank	Entidad federativa	Volumen (toneladas)		Variación (%) 2012-2017
		2012	2017	
	Total nacional	22,069,254	27,762,481	25.8
1	Sinaloa	3,646,875	6,167,096	69.1
2	Jalisco	3,235,189	4,024,864	24.4
3	México	1,575,300	2,219,616	40.9
4	Michoacán	1,801,965	1,911,239	6.1
5	Guanajuato	1,217,706	1,642,835	34.9
6	Guerrero	1,304,133	1,357,557	4.1
7	Chiapas	1,404,680	1,296,940	-7.7
8	Veracruz	1,275,318	1,268,916	-0.5
9	Chihuahua	1,113,012	1,201,125	7.9
10	Puebla	1,002,278	1,027,726	2.5
	Resto	4,492,799	5,644,568	25.6

En México se cultiva mayoritariamente maíz blanco, que representa el 86.94% de la producción y se destina principalmente al consumo humano. Esa producción satisface la totalidad del consumo nacional. El maíz amarillo se destina a la industria o a la fabricación de alimentos balanceados para la producción pecuaria y satisface sólo 24% de los requerimientos nacionales por lo que se complementa con importaciones (Fig. 2; SAGARPA, 2017).

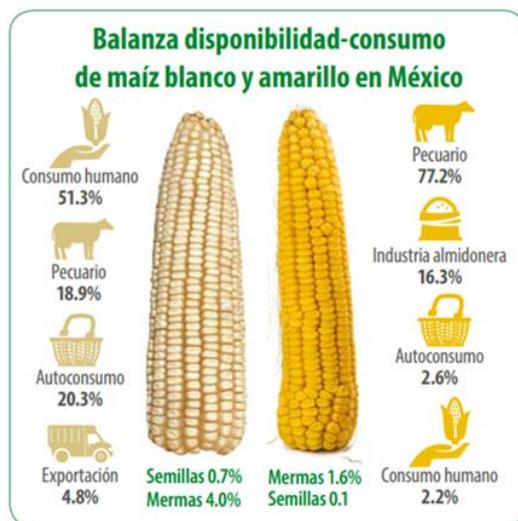


Figura 2. Balanza disponibilidad-consumo de maíz blanco y amarillo en México (Tomado y modificado de SAGARPA, 2017).

2. Generalidades de botánica del maíz

El origen del maíz se sitúa probablemente a lo largo del acantilado occidental de México Central o del Sur, a 500 km de la Ciudad de México entre los años 8,000 y 6000 a.C. El ecosistema que dio lugar al maíz era de invierno, seco estacional en alternancia con las lluvias de verano y en una región montañosa, de cuevas empinadas y sobre roca caliza (Wilkes & Goodman, 1995). El maíz es, junto con el trigo y el arroz, uno de los cereales más importantes del mundo, pues suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales. Además, es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen diferentes productos (FAO, 1993).

Botánicamente, el maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, y es la única especie cultivada de este género (Paliwal et al. 2001; FAO, 1993). La clasificación taxonómica completa se describe a continuación (Sánchez, 2014):

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta Cronquist (Takhtajan & Zimmermann, 1966).

Clase: Liliopsida.

Orden: Poales (Small, 1903).

Familia: Poaceae (Barnhart).

Subfamilia: Panicoideae.

Género: *Zea* (Linnaeus, 1753).

Especie: *Zea mays* (Linnaeus, 1753).

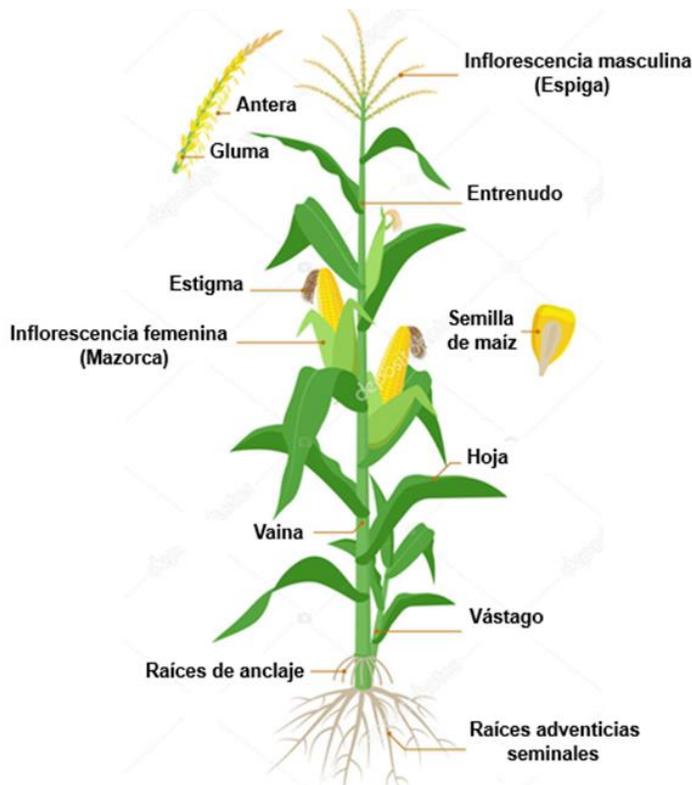


Figura 3. Ilustración de una planta de maíz madura que muestra sus principales órganos.

El maíz es una planta monocotiledónea de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud alcanzando alturas de uno a cinco metros, con pocos macollos o ramificaciones, y con nudos y entrenudos (Fig. 3). Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo; se encuentran abrazadas al tallo mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral, de tamaño y ancho variable (Jugenheimer, 1988).

Es una planta monoica de flores unisexuales, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina es terminal, se conoce como panícula (o espiga) consta de un eje central o raquis y ramas laterales; a lo largo del eje central se distribuyen los pares de espiguillas que contienen a las flores estaminadas donde se desarrollan los granos de polen. Las inflorescencias femeninas (mazorcas) se localizan en las yemas axilares de las hojas, son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote donde se insertan las

espiguillas con la flor pistilada, que se arreglan en hileras paralelas. Las flores pistiladas tienen un ovario único con un pedicelo unido al raquis, un estilo muy largo con propiedades estigmáticas donde germina el polen. En esta inflorescencia se forman alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en promedio de ocho a 24 hileras por mazorca; todo esto encerrado en numerosas brácteas o vainas de las hojas (totomoxtle). Por su arquitectura floral, el maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) propensa al cruzamiento, pues los granos de polen pueden viajar de 100 hasta 1000 metros transportados por el viento (Reyes, 1990; Jugenheimer, 1988).

El sistema radicular presenta una parte de raíces adventicias seminales que constituye cerca del 52% de la planta además de ser el principal sistema de fijación y absorción de la planta, mientras que el sistema nodular es el 48% de la masa total de raíces de la planta. La función de las raíces de anclaje es mantener la planta erecta para así evitar su caída (Kato et al. 2009; Paliwal et al. 2001; FAO, 1993).

3. Estructura de la semilla de maíz

La semilla de maíz se denomina en botánica cariósipide o cariopsis; las partes fundamentales de la semilla son el pericarpio, el endospermo, embrión y el pedicelo o pilorriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo) (Martínez & Jiménez, 2013; FAO, 1993).

El pericarpio constituye la parte externa del grano, y conforma entre un 5-6% del peso total de éste. Está dividido en cuatro capas celulares que son: 1) Epicarpio, 2) Mesocarpio, 3) Capa de células y 4) Capa de células tubulares (Fig. 4; Martínez & Jiménez, 2013).

El endospermo representa aproximadamente el 80-82% del total del peso del grano seco y constituye la reserva de almidón y proteína para la semilla durante la germinación. Está compuesto por tres tipos de células (Fig. 4): 1) Capa unicelular de aleurona 2) Endospermo córneo, formado por células de forma irregular y alargadas y 3) El endospermo harinoso que se localiza en la parte central del grano. Las proporciones relativas de endospermo córneo y harinoso varían entre los distintos genotipos de maíz (Martínez & Jiménez, 2013; FAO, 1993).

El embrión representa entre el 8 y el 12% del peso de la semilla; está conformado por el escutelo, que es el órgano de reserva constituido por carbohidratos y lípidos, el eje embrionario, conformado por la raíz primaria protegida por la coleorriza, y una plúmula, que posee de cinco a seis primordios de hojas (Fig. 4) (Martínez & Jiménez, 2013).

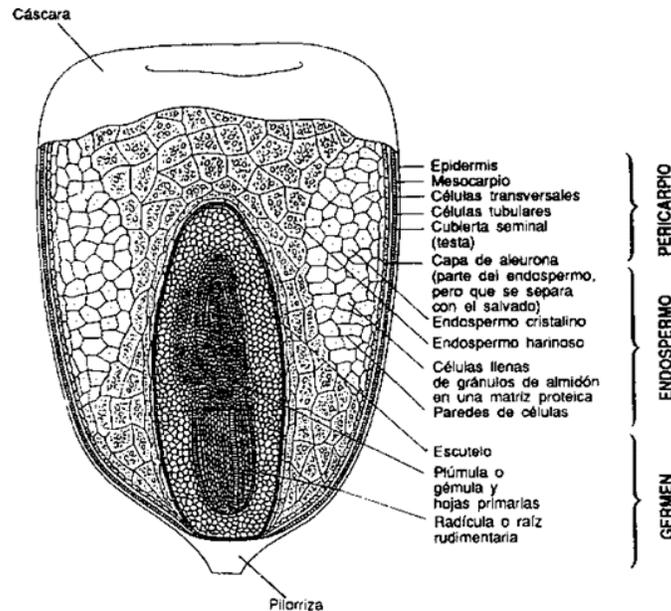


Figura 4. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal aumentado aproximadamente 30 veces (Tomado de FAO, 1993).

Como se muestra en la Tabla 2, las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. El pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0,1%) (Burge & Duensing, 1989). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), 8% de proteínas y un contenido de lípidos relativamente bajo. Por último, el embrión se caracteriza por un elevado contenido de lípidos (33%), y también contiene un nivel relativamente elevado de proteínas (cercano al 20%) y minerales (FAO, 1993).

Tabla 2. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%) (Tomado y modificado de Watson, 1987).

Componente químico	Pericarpio	Endospermo	Embrión
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Lípidos	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

4. Fisiología de la germinación de maíz

La semilla, formada por reproducción sexual, ocupa una posición crítica en el ciclo de vida de la planta. Tanto la composición de la semilla como su respuesta al medio ambiente determinan el inicio de la germinación y el aporte de nutrientes en las primeras etapas de crecimiento antes de que se convierta en un organismo autótrofo (Bewley & Black, 1994).

Esta transición de semilla a plántula es la etapa del ciclo de vida más susceptible al ambiente externo, por esto la germinación es un proceso clave. Comienza con la absorción de agua -imbibición- y termina con el inicio del alargamiento del eje embrionario, generalmente la radícula. Este proceso implica numerosos eventos físicos y bioquímicos, entre ellos, hidratación de proteínas, cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis macromolecular, alargamiento celular, activación de la actividad metabólica, transcripción génica, relajación de las paredes celulares embrionarias, reensamblaje y biogénesis de los orgánulos, entre otros. El resultado de todos estos

eventos es la transformación de un embrión deshidratado y en reposo a una plántula con un metabolismo vigoroso que culmina en el crecimiento, diferenciación y desarrollo (Sánchez-Linares et al. 2012; Bewley & Black, 1994).

Uno de los procesos fundamentales durante la germinación es la movilización de polímeros complejos como el almidón, las proteínas y los lípidos de los tejidos de almacenamiento como el endospermo o los cotiledones. En gran medida, la utilización y el transporte de las reservas están regulados por fitohormonas como el ácido giberélico y el ácido abscísico (Sánchez-Linares et al. 2012).

De los primeros cambios tras la imbibición, es la reanudación de la actividad respiratoria, que puede detectarse en cuestión de minutos. Después de un fuerte aumento inicial en el consumo de oxígeno, la tasa disminuye hasta que la radícula penetra en los alrededores. Los tejidos de la semilla seca madura contienen mitocondrias, y aunque estos organelos están pobremente diferenciados como consecuencia del secado de la maduración, contienen suficientes enzimas del ciclo de Krebs y oxidasas terminales para proporcionar cantidades adecuadas de ATP que sostienen el metabolismo durante varias horas después de la imbibición (Bewley & Black, 1994; Botha et al. 1992).

La actividad metabólica del embrión es moderada pero esencial durante las primeras horas de absorción de agua, ya que está dirigida a proporcionar la energía y los precursores para la síntesis de los componentes celulares y mantener la emergencia de la radícula, el sello distintivo de la germinación. Se ha descrito que la extensión de la radícula implica división celular y/o alargamiento celular, lo que exige la incorporación de moléculas que deben sintetizarse *de novo* y el transporte de nutrientes desde el exterior hacia las células del eje embrionario, este tráfico se lleva a cabo mediante transportadores de membrana dependientes de energía. El alargamiento celular es promovido por la relajación de la pared celular, que se ve facilitada por la acidificación del apoplasto (Sánchez-Linares et al. 2012).

En muchas semillas, el debilitamiento del tejido del endospermo, opuesto a la punta de la radícula, se facilita por el aumento en la actividad de hidrolasas de la pared celular. Entre éstas, se requieren endo- β -1,4-mananasa, así como hemicelulasas, pectinasas

y/o celulasas que actúan sobre la capa del endospermo permitiendo la protrusión de la radícula. Hasta la fecha se han identificado actividades de celulasa, poligalacturonasa, arabinosidasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa en la capa de endospermo de numerosas semillas (Downie, 2001).

5. Patógenos de maíz

Una de las limitantes en la producción de maíz lo constituyen las enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus. El clima húmedo y cálido bajo el que crece gran parte del maíz en los trópicos favorece el crecimiento y la dispersión de los patógenos causantes de las enfermedades. Algunas enfermedades del maíz son ubicuas y ocurren en casi todos los ambientes en los que se cultiva; éstas incluyen los tizones, las royas, las manchas de las hojas y del tallo, y la pudrición de la mazorca.

La Tabla 3 presenta a los principales patógenos de maíz y la enfermedad que causan, siendo los patógenos fúngicos los que tienen predominancia:

Tabla 3. Principales patógenos de maíz (Tomado y modificado de Paliwal et al. 2001).

Tipo de patógeno	Nombre	Enfermedad o enfermedades que causa
Oomiceto	Género <i>Pythium</i>	Tizones de plántula y pudrición de raíz
Hongo	Género <i>Fusarium</i>	Tizón de plántula, pudrición de raíz, del tallo, de la mazorca y de los granos
Hongo	Género <i>Cephalosporium</i>	Enfermedad de los haces vasculares negros y pudrición del tallo

Hongo	<i>Diplodia maydis</i>	Pudrición del tallo y de la mazorca
Hongo	<i>Gibberella zeae</i>	Pudrición del tallo y de la mazorca
Hongo	<i>Macrophomina phaseoli</i>	Pudrición carbonosa del tallo
Hongo	<i>Ustilago maydis</i>	Carbón común
Hongo	<i>Penicillium oxalicum</i> ,	Pudrición de la mazorca y grano durante el almacenamiento
Hongo	<i>Aspergillus spp.</i>	Pudrición de la mazorca y grano durante el almacenamiento
Bacteria	<i>Erwinia spp.</i>	Pudrición del tallo
Bacteria	<i>Pseudomonas spp</i>	Pudrición del tallo
Bacteria	<i>Xanthomonas stewartii</i>	Marchitamiento de Stewart
Virus	Virus del mosaico y enanismo del maíz (MDMV)	Mosaico y enanismo del maíz.

B. *Fusarium verticillioides*

1. Taxonomía y características de *F. verticillioides*

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg (syn. *F. moniliforme* Sheldon) es un ascomiceto perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que presenta tanto un estado anamorfo (reproducción asexual) y un estado teleomorfo (fase sexual). La forma teleomórfica corresponde a *Gibberella fujikuroi*, que incluye también a otras especies de *Fusarium*.

La forma sexual es muy rara en ambientes naturales y se requieren condiciones especiales para observarla *in vitro* (Pitt & Hocking, 2009; Deacon, 1997; Leslie, 1995).

En su estado anamorfo, *F. verticillioides* produce un alto número de microconidias, que son células ovaladas con la base plana, formada en cadenas largas a partir de fiálides relativamente largos (Fig. 5d). También genera macroconidias, aunque en menor cantidad, que son largas y delgadas, casi rectas, de paredes delgadas y con cinco o seis septos, con dos tipos de células: basales en forma de pie y apicales que son curvas (Fig. 5d). Este tipo de conidias se producen con estructuras que aparentan racimos denominados esporodoquios (Fig. 5 b/c) (de la Torre-Hernández et al. 2014; Pitt & Hocking, 2009).

Las características y la morfología de la colonia de *F. verticillioides* depende del medio de cultivo y varía entre cepas; por ejemplo, en agar papa dextrosa (PDA) el micelio es de color blanco a salmón pálido, forma pigmentos que van de gris hasta violeta (Fig. 5a) y en algunos cultivos ya envejecidos, la hifa del hongo produce melanina para conformar esclerocios que son de color azul oscuro a negro. Las colonias en agar extracto de levadura Czapek (CYA) generalmente cubren toda la placa Petri, el micelio puede ser color blanco, o en tonos de salmón pálido o violeta. En agar dicloran-cloranfenicol peptona (DCPA) las colonias son de altura baja, micelio color salmón, salmón pálido o blanco (Fig. 5a), (Pitt & Hocking, 2009; Leslie & Summerell, 2006).

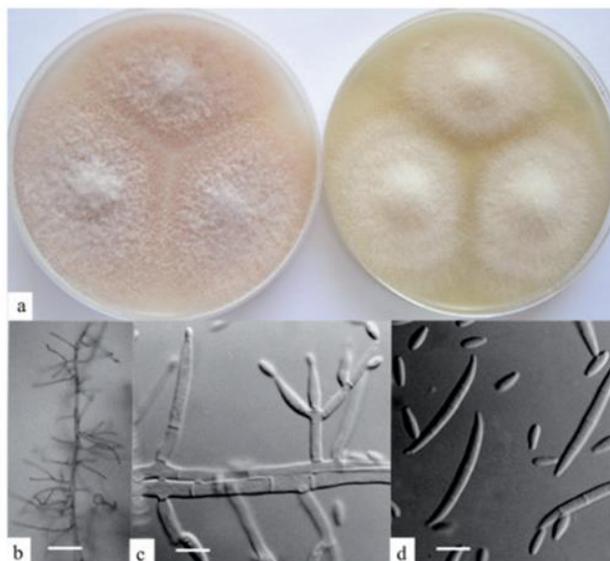


Figura 5. Colonias de *F. verticillioides* (a) en PDA y DCPA, 7 días, 25°C; (b) fiálides con cadenas de microconidios, barra =50 µm; (c) fiálides, barra =10 µm; (d) macro y microconidios, barra = 10 µm (Tomado de Pitt & Hocking, 2009).

F. verticillioides fue descrito por primera vez en 1877 por Saccardo quien lo llamó *Oospora verticillioides*. En 1904, John Sheldon lo nombró como *Fusarium moniliforme*, pero fue hasta 1976 que Nirenberg concluyó que esta especie debería llamarse *F. verticillioides*, que es el nombre que se utiliza actualmente para esta especie. La Tabla 4, muestra su descripción taxonómica completa:

Tabla 4. Taxonomía de *F. verticillioides* (Tomado y modificado de O'Donnel et al. 2013).

Taxonomía	
División	<i>Eumycota</i>
Orden	<i>Moniliales</i>
Subdivisión	<i>Deutoromycota</i>
Familia	<i>Tuberculareacea</i>
Clase	<i>Hyphomycetes</i>
Forma teleomórfica	<i>Gibberella fujikuroi</i>

2. Enfermedades que produce *F. verticillioides* en maíz

F. verticillioides es la especie toxigénica más común que se encuentra en los granos de maíz (Moretti, 2017) prácticamente en todo el mundo, y representa una seria amenaza económica para la producción y la calidad del maíz (Blacutt et al. 2018).

Esta especie es el principal patógeno de maíz, por su ubicuidad y capacidad de producir enfermedades en distintas etapas de desarrollo de la planta de maíz. Es un patógeno hemibiótrofo pues durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biótrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar

podrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. En esta fase se comporta como un patógeno necrótrofo, que tiene la capacidad de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevivir como saprofito en el rastrojo. El hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (Duncan & Howard, 2010; Desjardins et al. 1995; Kedera et al. 1994).

En seguida se describen las enfermedades que este patógeno provoca:

a) Pudrición de la raíz

Como el hongo sobrevive, ya sea en la semilla o en el suelo, se encuentra estratégicamente posicionado para infectar a la planta; es capaz de penetrar de forma directa el pericarpio y a las células de la epidermis de la raíz durante las etapas tempranas del establecimiento de la plántula. Si hay un exceso de humedad, entre 25 y 30 días, la raíz se debilita, se humedece y comienza a pudrirse. A partir de la infección inicial, el hongo puede acceder a la raíz principal y a otros tejidos de la plántula (Paliwal et al. 2001; Murillo & San Segundo, 1999).

b) Pudrición del tallo

F. verticillioides puede acceder al tallo a través de heridas mecánicas producidas por insectos. Además, especies del género *Ostrinia* spp., el gusano barrenador, actúan como vectores del hongo, ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos, o transportándolo a través de grandes distancias, como el gusano de la raíz (*Diabrotica* sp.) (Sobek & Munkvold 1999; Munkvold et al. 1997; Gilbertson et al. 1986). La pudrición del tallo causa un secado prematuro e incluso la ruptura de éste con la consecuente muerte de la planta. Esta enfermedad ocurre en todos los ambientes en que se cultiva el maíz: en climas fríos o cálidos, en tierras bajas, de media altitud o altas, en climas secos o húmedos (Paliwal et al. 2001).

c) Pudrición de la mazorca

F. verticillioides puede infectar a la mazorca a través del estigma cuando el inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia se depositan en este tejido que constituye una apertura natural. A partir de la infección inicial, el patógeno

puede acceder a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder alcanzar el grano, a través de la parte inferior del canal estilar (Duncan & Howard, 2010). El hongo también puede infectar la mazorca a través de heridas mecánicas por insectos. Además de los insectos descritos en la sección anterior, otros vectores descritos son el gusano elotero, los trips (tisanópteros) y los gorgojos (Munkvold & Desjardins, 1997; Gilbertson et al. 1986). En los granos se desarrolla un moho polvoso o algodonoso blanco-rosado, los granos infectados al final de la estación pueden tener o no, un moho visible y mostrar un rayado por debajo del pericarpio (Paliwal et al. 2001).

d) Tizón de plántulas

Las semillas de maíz, durante la germinación, pueden ser infectadas por *F. verticillioides*, que sobrevive como endófito debajo del pericarpio o en el suelo, causando su pudrición antes de germinar o el tizón de plántulas. Los síntomas pueden ocurrir antes o después de la emergencia, mostrando decoloración café de las plántulas o ligeramente descoloridas y amarillentas. Cuando el sistema radicular se ve afectado, los síntomas pueden variar de zonas cafés en las raíces y el coleóptilo, lo que conduce a una reducción del vigor de las plántulas o una decoloración negra que indica la pudrición total de la raíz (Oldenburg et al. 2017; Kim et al. 1984).

3. Producción de micotoxinas

Además de los daños causados por *F. verticillioides* en distintos tejidos durante el desarrollo de la planta de maíz, este patógeno tiene la capacidad de producir cantidades importantes de micotoxinas que contaminan los granos y deprecian el valor de éstos. Las micotoxinas son metabolitos secundarios que pueden acumularse en los alimentos y, causan daño a los animales y, potencialmente, a los humanos (Blacutt et al. 2018). Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas. Estas últimas son las más abundantes (Desjardins, 2006; Bacon et al. 1989, 1996; Rabie et al. 1982) y afectan a distintas especies. Su consumo causa leucoencefalomalacia en equinos y edema pulmonar en cerdos. Además, tiene actividad promotora de cáncer hepático en

ratas (Pitt & Hocking, 2009) y se ha establecido una asociación epidemiológica entre su consumo y la incidencia de cáncer de esófago humano (Shephard et al. 2007; Sydenham et al. 1990; Gelderblom et al. 1988) y defectos en el desarrollo del tubo neural en recién nacidos (Desjardins, 2006).

La capacidad de producir fumonisinas depende de un grupo de 17 genes agrupados en una región de 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y que forman el locus *FUM* (Figura 6). La síntesis de fumonisinas es variable entre las cepas de *F. verticillioides* y los intervalos pueden abarcar hasta tres órdenes de magnitud, también de factores ambientales, por ejemplo; pH (se favorece la producción a pH 4.5), disponibilidad de agua y nutrientes. Asimismo, hay genes fuera del locus *FUM* que participan, a distintos niveles, en las vías de señalización que conducen a la expresión de los genes de este locus, entre ellos *PAC1* y *AREA* (Picot et al. 2010; Kim & Woloshuk, 2008; Sagaram et al. 2006; Proctor et al. 1999, 2003; Seo et al. 2001).

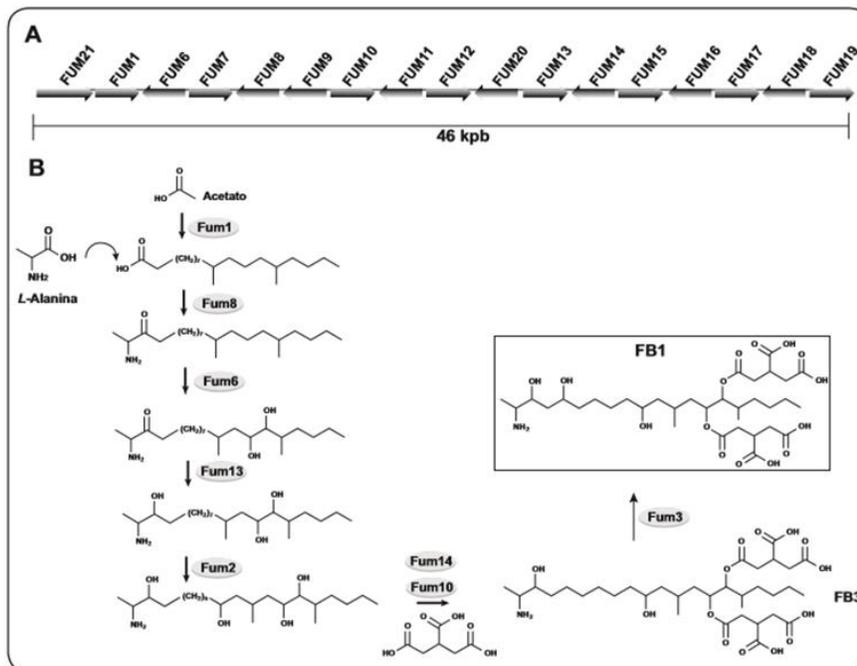


Figura 6. Biosíntesis de fumonisinas. A. Estructura genómica del locus *FUM* en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*. B. Ruta biosintética de las fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos de los genes del locus *FUM* (Tomado de de la Torre-Hernández et al. 2014).

C. Fumonisin

1. Estructura y propiedades químicas

Las fumonisinas son las micotoxinas predominantes en *F. verticillioides*; con una amplia diversidad estructural pues hay más de 60 moléculas distintas. Éstas se han clasificado en cuatro grupos, A, B, C y P (Musser & Plattner, 1997), dentro de los cuales las fumonisinas del grupo B (FB1, FB2, FB3) son las más abundantes, por su incidencia natural en maíz infectado con *F. verticillioides* (Blacutt et al. 2018). Las fumonisinas B están conformadas por un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un grupo amino en el C-2 y residuos de ácido tricarboxílico esterificados en C-14 y C-15 (Fig. 7). Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10.

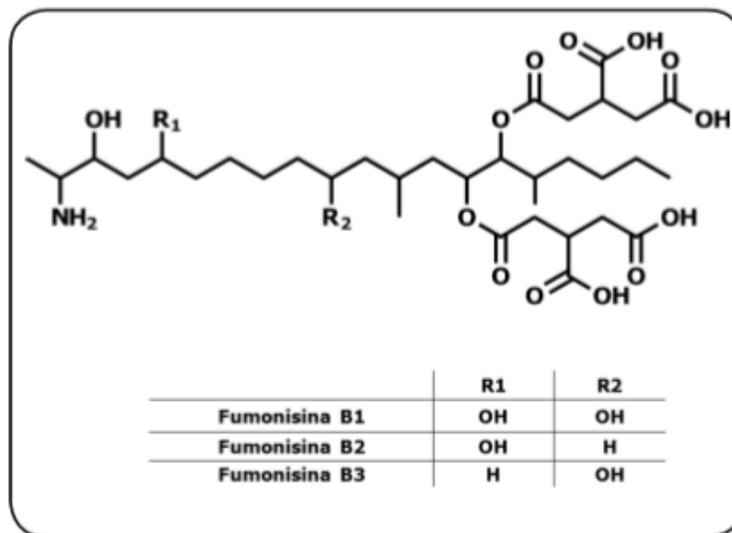


Figura 7. Estructura química de las fumonisinas del grupo B (Tomado de de la Torre-Hernández et al, 2014).

Dentro de esta familia predomina la fumonisina B1 (FB1), ya que conforma más del 75% del total de las fumonisinas, seguida de las fumonisinas B2 y B3 que son isómeros estructurales al diferir en la posición del sustituyente –OH (Proctor et al. 2006; Marín et al. 1995).

Las fumonisinas de los grupos A y C difieren de las del grupo B por la acetilación del grupo amino y la falta de un grupo metilo terminal C-1, respectivamente (Tamura et al.

2015; Proctor et al. 2008). Estos compuestos carecen de actividad biológica con respecto a las fumonisinas del grupo B.

2. Mecanismos de acción de la fumonisina B1

Las fumonisinas son análogos estructurales de la esfinganina, que es una base de cadena larga (LCB), intermediario en la síntesis de ceramida y otros esfingolípidos complejos (Fig. 8; Riley et al. 2001; Wang et al. 1991).

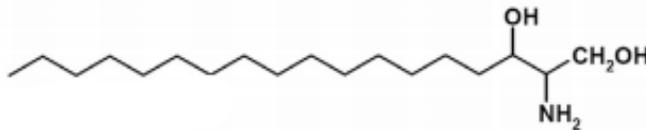


Figura 8. Estructura química de la esfinganina (Tomado de Arias et al. 2016).

La actividad biológica de la FB1 está dirigida al metabolismo de esfingolípidos pues inhibe a la enzima esfinganina N-acil transferasa, la cual cataliza la condensación entre una LCB y un ácido graso (en forma de Acil-CoA) para formar la ceramida, reacción que ocurre en el retículo endoplásmico (Wang et al. 1991). Las consecuencias de la inhibición incluyen la acumulación de esfinganina y otras LCBs, además de la reducción de los esfingolípidos complejos derivados de la ceramida. Debido a que la esfinganina y otras LCBs, como la esfingosina y fitoesfingosina, son mensajeros intracelulares, la elevación en sus niveles resulta en múltiples efectos en distintos tipos de células (Hla & Dannenberg, 2012; Ryland et al. 2011). En la línea celular LLC-PK1 derivada de riñón de cerdo ocurre la inhibición del crecimiento celular y la inducción de la muerte celular (Liu et al. 2019). La inhibición de la enzima esfinganina N-acil transferasa, después de la exposición a la fumonisina, ocurre en todas las especies de mamíferos, aves y peces probadas hasta la fecha y, también en plantas como el maíz (de la Torre-Hernández et al. 2010; Zitomer et al. 2010; Williams et al. 2007; Abbas et al. 1994). Estos efectos se describen con detalle más adelante.

Se han identificado múltiples mecanismos moleculares que están involucrados en la toxicidad inducida en células de mamífero por la FB1 (Fig. 9), que incluyen la acumulación de esfinganina libre intracelular debido a la perturbación del metabolismo

de los esfingolípidos, la inducción del estrés oxidativo, la activación del estrés del Retículo Endoplasmático (RE) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la modulación de la autofagia, y la alteración de la metilación del DNA (Liu et al. 2019). También en embriones de maíz se ha observado la inducción del estrés oxidativo, el desbalance o perturbación en el metabolismo de esfingolípidos lo cual modifica la fluidez membranal (Gutiérrez-Nájera et al. 2020).

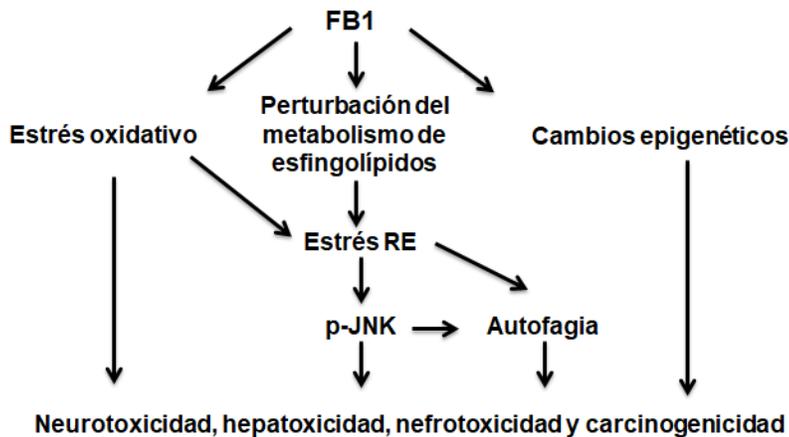


Figura 9. Vías de señalización implicadas en la toxicidad inducida por la FB1. La interrupción del metabolismo de los esfingolípidos y la inducción del estrés oxidativo desempeñan un papel en la toxicidad inducida por el FB1 a través del desencadenamiento de las vías de señalización río abajo, de la respuesta al estrés del RE, p-JNK y la respuesta autofágica. Los cambios epigenéticos también pueden contribuir a los efectos tóxicos de FB1. Estos hallazgos proporcionan la base teórica para desarrollar un enfoque efectivo para manejar los efectos adversos de salud inducidos por la FB1. (Tomado y modificado de Liu et al. 2019).

El desbalance entre los niveles de LCBs y de los esfingolípidos complejos activa varias vías de señalización como la activación del estrés de RE, la proteína cinasa C (PKC) y MAPKs, lo que conduce a un crecimiento y diferenciación celular alterados, a la inducción de la muerte celular, autofagia y peroxidación lipídica. La proteína cinasa C (PKC) tiene un papel central en la transducción de señales y se sugirió que el efecto de FB1 sobre la activación de PKC está involucrado en la mitogénesis y/o apoptosis inducida por FB1 en la línea celular LLC-PK1 (Müller et al. 2012; Soriano et al. 2005;

Yeung et al. 1996). Las perturbaciones en la función del RE debido al aumento de la síntesis de proteínas o a la acumulación de proteínas mal plegadas conducen a una condición denominada estrés RE. La inducción de estrés RE por FB1 se encontró en múltiples sitios de órganos, incluidos hígado, riñón y colon, y éstos contribuyen a la autofagia y citotoxicidad, en las células de mono MARC-145 (Kim et al. 2018; Singh & Kang, 2017; Yin et al. 2016). El estrés oxidativo se caracteriza por la producción excesiva de radicales libres de oxidación y/o la disminución de la capacidad antioxidante. Se ha demostrado en astrocitos primarios de rata y células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) que el estrés oxidativo contribuye a muchas condiciones patológicas, incluidas las toxicidades inducidas por ciertos tipos de micotoxinas (Wang et al. 2016; Mobio et al. 2000; Abel & Gelderblom, 1998).

3. Blancos de la fumonisina B1 en tejidos de maíz

En maíz, la FB1 tiene tres blancos moleculares: la esfinganina N-acil transferasa, la ATPasa de protones de membrana plasmática y las β -1,3-glucanasas básicas (Fig. 10). En seguida se describe la función de cada enzima y el mecanismo de acción de la FB1;

a) Esfinganina N-acil transferasa

En células vegetales, los esfingolípidos son componentes importantes de las células, ya que constituyen el 40% de los lípidos de la membrana plasmática donde influyen en la integridad y la permeabilidad iónica, también están involucrados en el tráfico de las endomembranas y en la formación de balsas lipídicas. Además de sus funciones estructurales, las LCBs participan como mediadores de procesos celulares, por ejemplo, la muerte celular programada, la respuesta hipersensible inducida por patógenos (HR) y la transducción de señales dependientes del ácido abscísico (ABA) (Yang et al. 2013; Cacas et al. 2012; Aubert et al. 2011; Chao et al. 2011; Simon-Plas et al. 2011; Tjellstrom et al. 2010; Sperling et al. 2005). La esfinganina N-acil transferasa de plantas también es sensible a la acción de la FB1, la cual a una concentración 10 μ M, provoca el incremento de hasta seis veces en los niveles de BCL principalmente esfinganina (ESN) y fitoesfingosina (PSN). Esta elevación se asocia con la degradación del DNA genómico, la muerte del tejido y la producción de ácido salicílico (AS). Es así que tanto la FB1 como la ESN y el AS inducen la activación de

una nucleasa en tejidos de maíz, que puede ser la responsable de la degradación del DNA genómico durante los eventos de muerte celular (Fig. 10) (de la Torre-Hernández et al. 2010).

b) ATPasa de H⁺ de membrana plasmática

Esta es una enzima membranal que transporta protones del citoplasma al apoplasto; hidroliza ATP para energizar este transporte (Fig. 10). Su función es fundamental para mantener un potencial membranal negativo y un gradiente transmembranal de pH, el que se requiere para la elongación del tejido y otros procesos fisiológicos. Además, participa en la respuesta de defensa de las plantas contra microorganismos (Elmore & Coaker, 2011).

In vitro, la FB1 inhibe la actividad de la ATPasa de H⁺, aislada de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz con 24 horas de germinación. Esta inhibición se puede asociar con la disminución *in vivo* de la elongación radicular del 44% y 47% a 10 y 40 µM de FB1, respectivamente, y con la reducción de hasta el 78% en la acidificación del medio. La inhibición de esta enzima podría contribuir a acortar la elongación de la raíz y el tallo, observada en plantas infectadas con *F. verticillioides* o tratadas con FB1 (Gutiérrez-Nájera et al. 2020; Gutiérrez et al. 2005).

c) β-1,3-glucanasas

Las β-1,3-glucanasas son enzimas con actividad hidrolítica que actúan sobre polímeros de glucano, un polisacárido estructural de la pared celular fúngica. Entre los productos de la hidrólisis, están los oligosacáridos que actúan como elicitores que son percibidos por receptores membranales y amplifican la señalización en la respuesta de defensa. Estas enzimas pertenecen a la familia de proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) pues se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Ferreira et al. 2007; Leubner-Metzger & Meins, 1999).

La FB1 modula la actividad de tres β -1,3-glucanasas de maíz mediante dos mecanismos independientes (Fig. 10). Experimentos *in vitro* demuestran que la FB1 disminuye la actividad de dos β -1,3-glucanasas básicas presentes en extractos proteicos de embriones de maíz germinados durante 24 horas. Por otro lado, cuando se añade la FB1 a los embriones durante la germinación, ésta aumenta la actividad de una β -1,3- glucanasa ácida, probablemente a través de la inducción de la vía del ácido salicílico (AS) (Sánchez-Rangel et al. 2012).

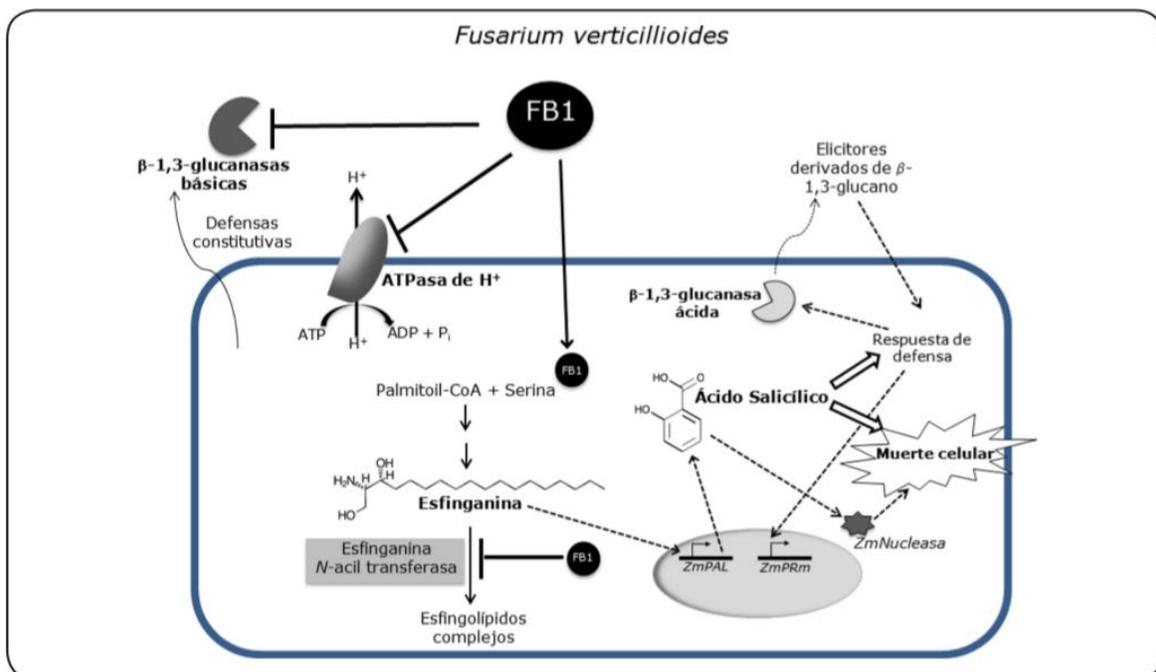


Figura 10. Blancos moleculares de la fumonisina en células de maíz. La inhibición en la esfinganina N-acil transferasa causa acumulación de BCL que activa la vía del SA. El SA induce a su vez la actividad de una isoforma ácida de β -1,3-glucanasa. También el SA induce la actividad de nucleasas que contribuyen a la degradación del DNA genómico y muerte celular. Finalmente, la FB1 inhibe la actividad de las isoformas básicas de β -1,3 glucanasas en el espacio extracelular facilitando la colonización. Las flechas sólidas: indican activación, inducción o acumulación de compuestos o transcritos, mientras que las flechas no continuas representan interacciones hipotéticas. (Tomado y modificado de de la Torre-Hernández et al. 2014).

4. Función de la fumonisina B1 en la virulencia de *F. verticillioides*

La FB1 funciona como factor de virulencia de *F. verticillioides* en su interacción con plántulas de maíz para causar el tizón de éstas. Un factor de virulencia es una molécula producida por un patógeno, el cual incrementa su capacidad para causar enfermedad al interferir con funciones específicas de la célula hospedera y, entonces, promueve la colonización del microorganismo en el tejido vegetal. Las pruebas que sustentan su papel en la virulencia son: 1) evidencias bioquímicas del efecto fitotóxico de la fumonisina en células y tejidos de maíz, y 2) evidencias genéticas que describen el fenotipo de cepas de *F. verticillioides*; estas últimas tienen una limitada o nula capacidad de producir fumonisina (de la Torre-Hernández et al. 2014).

Sobre las evidencias bioquímicas que prueban el efecto fitotóxico de la FB1 en distintos tejidos de maíz y diversas etapas del cultivo, incluyen: que en cultivos de callos de maíz, una dosis de FB1 13 μ M causa la reducción del 50% en su crecimiento (van Asch et al. 1992), y hasta 75% de inhibición en la elongación radicular de semillas de maíz durante la germinación (Doehlert et al. 1994).

Algunas de las evidencias genéticas, donde se utilizaron cepas que varían en su producción de la toxina y variantes incapaces de sintetizarla, se encontró que, en ensayos en plántulas de maíz, sólo las cepas productoras de fumonisina son virulentas y aquellas que no sintetizan la toxina son incapaces de infectar a las plantas (Desjardins et al. 1995). Asimismo, la transformación con el locus completo *FUM* de la especie *Fusarium musae* (la cual no infecta el maíz y no produce fumonisina) que no lo contiene en su genoma, genera una cepa productora de FB1 capaz de colonizar plántulas de maíz, causando todos los síntomas de la infección: lesiones necróticas, atrofia y blanqueamiento del tejido (Glenn et al. 2008). Esta serie de evidencias presentadas apoyan la función de la FB1 en la virulencia y su contribución en la colonización de plántulas de maíz.

D. Interacción *F. verticillioides*–maíz

1. Respuesta de defensa en maíz

Las plantas están expuestas a lo largo de todo su desarrollo a la infección por múltiples patógenos (Jones & Takemoto, 2004) y han evolucionado mecanismos de defensa constitutivos e inducibles. Los mecanismos de defensa constitutiva o preformada se pueden dividir en físicos (por ejemplo, la cutícula, depósitos de lignina, tricomas, pared celular, etc.) y químicos (fitoanticipinas) que son compuestos tóxicos, por ejemplo las benzoxazinoides (BXs) producidas en maíz (de Bruijn et al. 2018; Madriz, 2002).

Los mecanismos inducibles se activan cuando el microorganismo patógeno es reconocido por la célula vegetal e inician cascadas de señalización que finalizan en expresión génica, producción de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, proteínas relacionadas a patogénesis (PRs), fitoalexinas, fitohormonas (ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno), compuestos fenólicos, reforzamiento de la pared celular (lignificación), entre otros (Sels et al. 2008; Collinge et al. 1994; Bowles, 1990).

La activación del sistema inmune y el desencadenamiento de los mecanismos de defensa inducidos se deben a la capacidad de las células de plantas de reconocer la presencia de microorganismos patógenos a través de dos clases de receptores: a) los primeros reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (MAMPs o PAMPs), y b) los segundos a efectores producidos por patógenos que actúan como factores de virulencia (Jones & Dangl, 2006).

a. Reconocimiento de PAMPs

Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) anclados a membrana que responden (al unirse directamente) a PAMPs. Éstas son moléculas presentes tanto en microorganismos patógenos como no patógenos. Entre los PAMPs bacterianos están el lipopolisacárido (LPS), flagelina y peptidoglucano (PGN). En hongos, éstos incluyen al ergosterol, así como oligosacáridos de los componentes de la pared celular; quitina y β -glucano (Zipfel & Felix, 2005). Las PRR comprenden cinasas similares a receptores (RLK) que contienen dominios con repeticiones ricas en leucina (LRR), como el receptor de flagelina FLS2, y el receptor para el factor de elongación bacteriano EF-Tu

llamado EFR. Las proteínas unidas a membrana con dominios LysM de unión a peptidoglucano (por ejemplo, CEBiP y CERK1) representan proteínas de unión para el PAMP fúngico, la quitina. El reconocimiento de PAMPs por PRR evoca el desarrollo de una respuesta de Inmunidad Inducida por PAMPs (PTI) (Fig. 11), a través de cascadas de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), lo que resulta en la activación transcripcional de los genes de defensa (Panstruga et al. 2009).

b. Reconocimiento de efectores

El segundo nivel de reconocimiento está compuesto por las proteínas de resistencia llamadas proteínas R (producto del gen *R*) definen una clase de receptores intracelulares y también sensores en la membrana plasmática. Estas proteínas se caracterizan por poseer dominios de unión a nucleótidos (NB) y repeticiones ricas en leucina (LRR). Las proteínas R detectan de forma directa o indirecta a efectores de patógenos que inicialmente se conocieron como productos de genes de avirulencia (*Avr*). A esta respuesta se le llama inmunidad inducida por efectores (ETI) (Fig. 11). La respuesta inmune incluye la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la activación de genes de defensa, que generalmente conduce a la muerte programada de la célula huésped en los sitios de intento de invasión (Panstruga et al. 2009; Jones & Dangl, 2006).

La relación entre la PTI y la ETI del sistema inmune de las plantas está representada en modelo de "zigzag" (Fig. 11) (Jones & Dangl, 2006).

En la fase 1, los PAMPs son reconocidos por los PRRs, lo que resulta en una inmunidad activada por PAMPs (PTI) que puede detener la colonización. En la fase 2, los patógenos exitosos producen efectores que contribuyen a su virulencia pues interfieren con la PTI, dando como resultado una susceptibilidad activada por el efector (ETS). La planta evoluciona y ahora sus células son capaces de reconocer, a través de la proteína R, al efector (fase 3), que activa la inmunidad activada por el efector (ETI), una versión amplificada de PTI que a menudo pasa un umbral para la inducción de una respuesta hipersensible (HR) que generalmente conlleva a muerte celular programada. En la fase 4, la presión selectiva impulsa a los patógenos a evitar la ETI ya sea

eliminando o diversificando el gen efector reconocido, o adquiriendo efectores adicionales que suprimen la ETI.

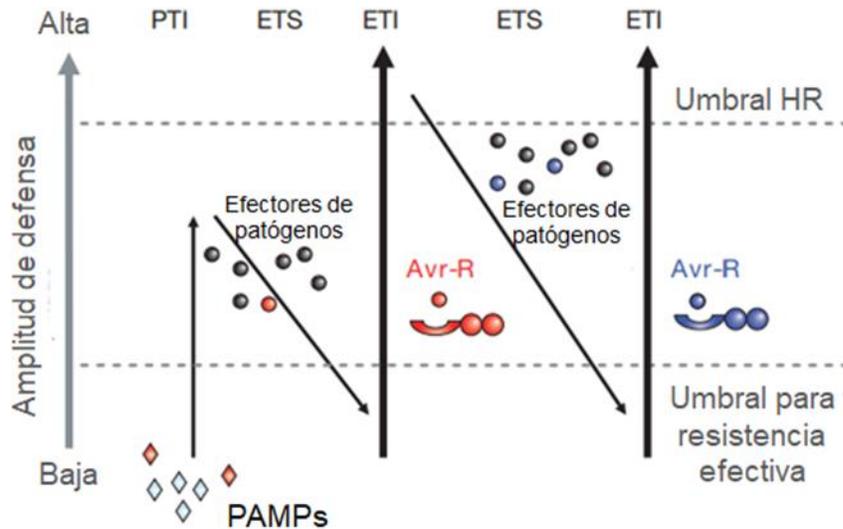


Figura 11. Modelo en zigzag del sistema inmune de la planta. Por sus siglas en inglés PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos, Avr-R: proteína R que reconoce las proteínas Avr del patógeno, PTI: Inmunidad Activada por PAMPs, ETS: Susceptibilidad Activada por el Efector, ETI: Inmunidad Activada por Efector, HR: Respuesta de Hipersensibilidad. (Tomado de Jones & Dangl, 2006).

2. Proteínas relacionadas a patogénesis

Entre las proteínas de defensa que se inducen más frecuentemente posterior a la infección de la planta por patógenos y percepción de PAMPs, se encuentran la familia de proteínas conocidas como proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) (Stintzi et al. 1993; Linthorst, 1991; Bowles, 1990; Bol et al. 1990; Dixon & Lamb, 1990). Estas proteínas se caracterizaron por su patrón de expresión en la interacción con patógenos, sin embargo, también se inducen por distintos tipos de estrés abiótico, como el frío, la sequía, la salinidad, metales pesados, entre otros (Midoro et al. 2001). Algunos PRs son fuertemente inducidos por tratamientos con fitohormonas como el ácido salicílico y etileno (Stintzi et al. 1993).

A pesar de sus diversas funciones, las proteínas PRs muestran propiedades fisicoquímicas comunes, muy características, que ayudan en su detección y

aislamiento: 1) son estables a pH bajo; 2) son resistentes a la acción de enzimas proteolíticas de origen endógeno, pero también exógeno; 3) son monómeros (con algunas excepciones) de masa molecular baja; 4) se localizan en compartimentos como la vacuola, la pared celular y/o el apoplasto (Stintzi et al. 1993). La mayoría de las proteínas PRs ácidas se encuentran en los espacios intercelulares, mientras que las proteínas PRs básicas se encuentran predominantemente en vacuola (Van Loon & Van Strien, 1999; Niki et al. 1998; Legrand et al. 1987). Se acumulan localmente en los tejidos infectados y circundantes, y también en tejidos remotos no infectados y se sintetizan en partes específicas de la planta como raíz, tallo, hojas, frutas, semillas, etc. (Delaney, 1997; Ryals, 1996).

Las proteínas PRs fueron inicialmente identificadas en hojas de tabaco durante la respuesta de hipersensibilidad a la infección por el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Van Loon & Van Kammen, 1970). Se han identificado actualmente 19 clases diferentes de proteínas PRs (Tabla 5) (Arora et al. 2019) que se clasifican en función de la masa molecular, el punto isoeléctrico y la actividad biológica.

Tabla 5. Familias reconocidas y propuestas de proteínas relacionadas con la patogénesis (Tomado y modificado de Arora et al. 2019; Ebrahim et al. 2011; Fuentes-Silva et al. 2006).

Familia	“Miembro tipo”	Masa molecular(kDa)	Clasificación/propiedades
PR-1	Tobacco PR-1a	15-17	Antifúngica Unión a ergosterol
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	Proteína similar a la taumatina

PR-6	Tomato Inhibitor I	6-13	Inhibidor de proteasas
PR-7	Tomato P _{69g}	69	Endoproteinasa
PR-8	Cucumber chitinase	28	Quitinasa/lisozima tipo III
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	39-40	Peroxidasa formadora de lignina
PR-10	Parsley "PRI"	17-18	Ribonucleasas-like, proteínas homólogas a Bet v 1
PR-11	Tobacco class V chitinase	41-43	Quitinasa clase V
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	NtPRp27
PR-18	Sunflower	-	Oxidasa de carbohidratos
PR-19	Scots Pine	-	Péptido antimicrobiano

3. Quitinasas y β -1,3-glucanasas

Las quitinasas y β -1,3-glucanasas son PRs que actúan en la respuesta de defensa contra hongos fitopatógenos.

a) Quitinasas

La quitina es el segundo polisacárido más abundante, ubicuo y renovable en la naturaleza, después de la celulosa (Shahidi & Abuzaytoun, 2005; Frederiksen et al. 2013), químicamente es un homopolímero lineal insoluble de residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β -1,4. Está presente en artrópodos, nemátodos, moluscos, insectos, hongos, algas y protozoarios (Flach et al. 1992).

La degradación biológica de la quitina se manifiesta en gran medida por la acción catalítica de las enzimas hidrolíticas; las quitinasas (EC 3.2.1.14) que pertenecen a las familias 18, 19 y 20 de glicosil hidrolasas (GH) (Subbanna et al. 2018). Estas enzimas catalizan la ruptura de un enlace glicosídico entre C1 y C4 (Guan et al. 2009; White et al. 1997).

En base a la utilización del sustrato y los productos catalíticos, las quitinasas se clasificaron como exo- o endo- (Fig. 12) (Frederiksen et al. 2013).

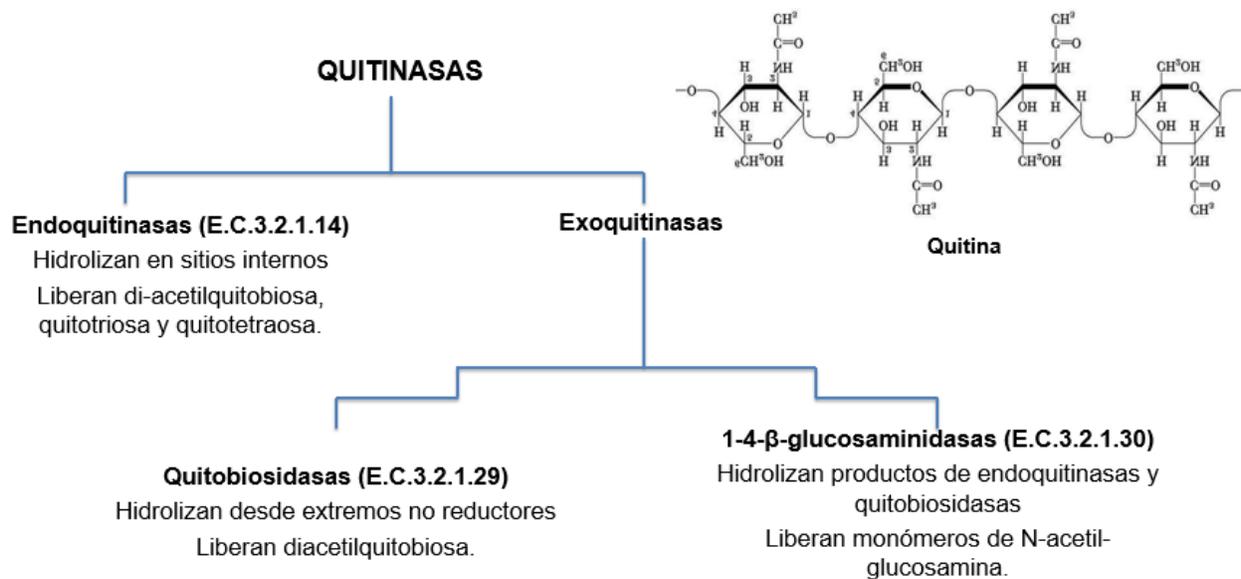


Figura 12. Clasificación de las quitinasas según su modo de acción (Tomado y modificado de Subbanna et al. 2018).

b) β-1,3-glucanasas

Los glucanos son polímeros de glucosa (polisacáridos) que pueden estar unidos de distintas formas según la configuración anomérica de las unidades de glucosa para generar α-glucanos, β-glucanos y α, β-glucanos. Asimismo, los enlaces glicosídicos pueden ser 1,3-, 1,4- o 1,6-glucanos para obtener una serie de polímeros muy compleja (Synytsya & Novak, 2013, 2014).

Los β -glucanos se encuentran en las paredes celulares de bacterias, hongos, levaduras, algas, líquenes y plantas. El β -glucano que se encuentra en la pared fúngica contiene enlaces glucosídicos β -1,3 y β -1,6 (Fig. 13) (Rahar et al. 2011).

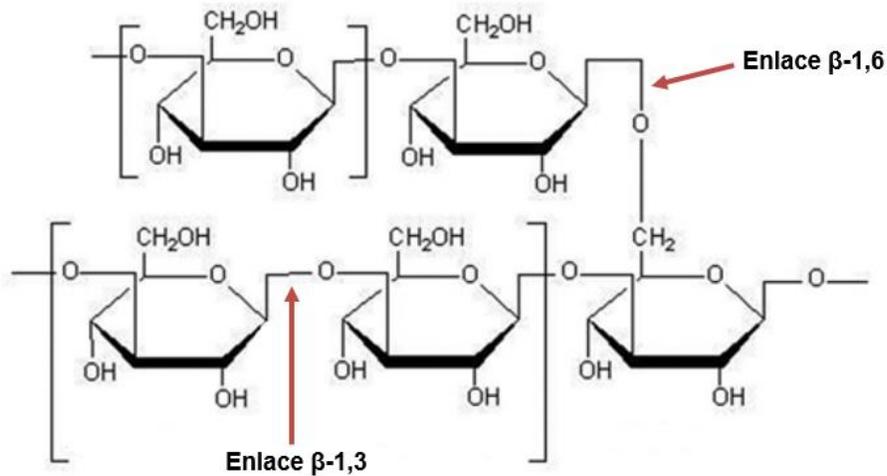


Figura 13. Fragmento de un polímero de glucano donde se observan enlaces β -1,3 y β -1,6 glucosídicos. Los enlaces β -1,3 se encuentran entre moléculas de glucosa adyacentes y los β -1,6 unen cadenas lineales de glucosas (Tomado y modificado de Rahar, 2011).

Las β -1,3-glucanasas son glicosil hidrolasas de la familia 17, hidrolizan enlaces β -1,3-glucosídicos de los β -1,3-glucanos estructurales y están ampliamente distribuidas en plantas, hongos, bacterias, levaduras, actinomicetos e insectos (Kusaykin et al. 2017; Kobayashi et al. 2016; Pan et al. 1989; Boller, 1985).

Según la posición de hidrólisis, las β -1,3-glucanasas se dividen en categorías tipo endo- (E.C. 3.2.1.39) y tipo exo- (E.C 3.2.1.58). Las endo- β -1,3-glucanasas hidrolizan enlaces internos del polisacárido liberando oligómeros de glucosa y las exo- β -1,3-glucanasas hidrolizan los polímeros de β -1,3-glucano desde el extremo no reductor, liberando monómeros de glucosa (Fig. 14) (Wu et al. 2018).

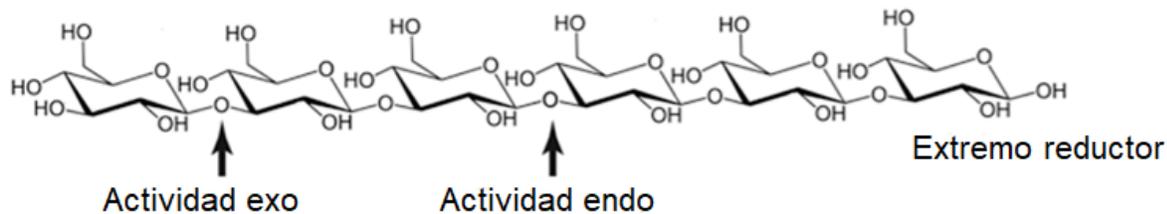


Figura 14. Clasificación de β -glucanasas según la posición de hidrólisis (Tomado y modificado de Roncero & Vázquez de Aldana, 2019).

Las β -1,3-glucanasas de plantas existen como isoformas estructurales múltiples que difieren en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y patrón de regulación. La información de secuencia más detallada para estas isoformas está disponible en cDNA y clonas de DNA genómico de tabaco (Meins et al. 1992; Ward et al. 1991; Payne et al. 1990). Según la identidad de la secuencia de aminoácidos, las diversas β -1,3-glucanasas del género *Nicotiana* se han clasificado en cuatro clases estructurales:

- Las β -1,3-glucanasas de clase I, del subgrupo de PR-2e, son proteínas básicas localizadas en vacuola celular, con un péptido señal hidrofóbico N-terminal y una extensión C-terminal. Tienen una masa molecular de 33-34 kDa (Xie et al. 2014; Sticher et al. 1992; Keefe et al. 1990; Van den Bulcke et al. 1989).
- Las β -1,3-glucanasas de clase II (subgrupo PR-2a, 2b y 2c) y clase III (subgrupo PR-2d) son proteínas ácidas sin la extensión C-terminal presente en las enzimas de clase I, se secretan en el espacio extracelular y varían en tamaño aproximadamente desde 34 a 36 kDa (Van Loon et al. 1994; Beffa et al. 1993; Stintzi et al. 1993; Meins et al. 1992).
- Las β -1,3-glucanasas de clase IV (proteína tipo PR) se expresan en anteras de tabaco, tienen un péptido señal en el extremo N-terminal lo que sugiere que la proteína puede ser secretada, la forma madura es una proteína ácida de 35 kDa (Leubner- Metzger & Meins, 1999; Bucciaglia & Smith, 1994).

4. Función de las β -1,3-glucanasas en la defensa contra hongos

Las β -1,3-glucanasas son proteínas relacionadas a patogénesis de la familia 2 (PR-2), juegan un papel importante en la respuesta de defensa de las plantas al inducirse

después de la infección por patógenos fúngicos. Tienen una función en la defensa contra los hongos pues hidrolizan las paredes celulares fúngicas, lo que en consecuencia causa lisis celular. Además, también tienen un efecto indirecto sobre la defensa de las plantas al causar la formación de oligosacáridos, que inducen la producción de otras proteínas PR o compuestos antifúngicos de bajo peso molecular, como las fitoalexinas (Klarzynski et al. 2000; Ham et al. 1991; Keen & Yoshikawa, 1983). Las β -1,3-glucanasas también están implicadas en diversos procesos fisiológicos y de desarrollo en la planta no infectada, incluida la división celular (Fulcher et al. 1976; Waterkeyn, 1967), la regulación de la señalización de plasmodesmos (Doxey et al. 2007), la germinación de polen, el crecimiento de tubos (Meikle et al. 1991; Roggen & Stanley 1969), la fertilización (Ori et al. 1990; Lotan et al. 1989), la embriogénesis (Helleboid et al. 1998; Dong & Dunstan 1997), la maduración de frutos (Hinton & Pressey, 1980) y la germinación de semillas (Leubner-Metzger et al. 1995; Vögeli-Lange et al. 1994).

Existen evidencias que prueban el papel de las β -1,3-glucanasas en la defensa contra hongos:

-Actividad antifúngica *in vitro*

El tratamiento con β -1,3-glucanasa inhibe el crecimiento de hongos *in vitro*; por ejemplo, isoformas básicas de β -1,3-glucanasas de tomate retardan el crecimiento de *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* y *Phytophthora infestans* (Anfoka & Buchenauer, 1997; Lawrence et al. 1996). También las isoformas básicas de tabaco son efectivas para inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* (Sela-Buurlage et al. 1993).

-Inducción de β -1,3-glucanasas

En el tabaco las β -1,3-glucanasas se inducen después de la infección con *Phytophthora infestans* (Kauffmann et al. 1987; Legrand et al. 1987) y en tomate por la infección de *Cladosporium fulvum* (Joosten & de Wit, 1989). En trigo la infección por *Fusarium culmorum* causa la inducción de dos isoformas básicas de β -1,3-glucanasa (PR2), mientras que varias isoformas ácidas se acumulan

constitutivamente (Caruso et al. 1999). En semillas de maíz en germinación se inducen isoformas básicas de β -1,3-glucanasa en respuesta a la infección por *Fusarium verticillioides* (Cordero et al. 1994).

-Liberación de elicitores fúngicos

La acción de las β -1,3-glucanasas sobre la pared celular fúngica libera oligosacáridos que difunden, son reconocidos por receptores tipo RLK, que median la respuesta de defensa y la acumulación de fitoalexinas (Okinaka et al. 1995; Sharp et al. 1984).

-Sobreexpresión de β -1,3-glucanasas; relacionado a mayor resistencia a los hongos patógenos.

Las plantas de tabaco transgénicas que expresan a la β -1,3-glucanasa de soya muestran síntomas reducidos cuando se infectan con *Alternaria alternata* o los oomicetos *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* y *Peronospora tabacina* (Lusso & Kuc, 1996; Yoshikawa et al. 1993).

E. Antecedentes inmediatos

1. Interacción fumonisina B1- β -1,3-glucanasas.

Como se había descrito en la sección I.C.3.c, uno de los blancos de la fumonisina B1 son las isoformas básicas de β -1,3-glucanasas de maíz. En embriones de maíz germinando en presencia de fumonisina B1 (20 μ M), ésta tiene un efecto dual sobre la actividad total de la β -1,3-glucanasa, pues en los tiempos de germinación temprana (18 h) ocurre una reducción del 50% de la actividad, mientras que hay un aumento de 30 y 40% en la actividad a las 24 y 30 h, respectivamente (Fig. 15) (Sánchez-Rangel et al. 2012).

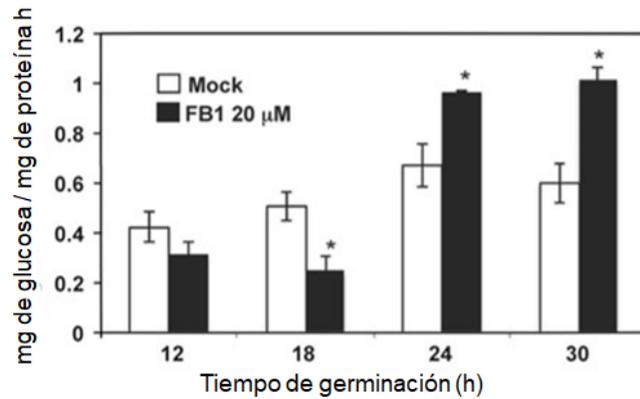


Figura 15. Actividad total de β -1,3-glucanasa en embriones de maíz en germinación embebidos en ausencia o presencia de FB1 20 μ M, se determinó usando laminarina como sustrato. El asterisco indica una diferencia significativa entre el control y los embriones tratados con FB1 en cada punto de tiempo ($p \leq 0.05$) (Tomado y modificado de Sánchez-Rangel et al. 2012).

Este efecto dual se debe a que al menos tres isoformas principales de β -1,3-glucanasa están activas durante la germinación. Cuando los embriones de maíz se germinan en presencia de FB1, la isoforma ácida (isoforma I) aumenta a las 24 h, y las dos isoformas básicas (isoformas II y III) se reducen (Fig. 16).

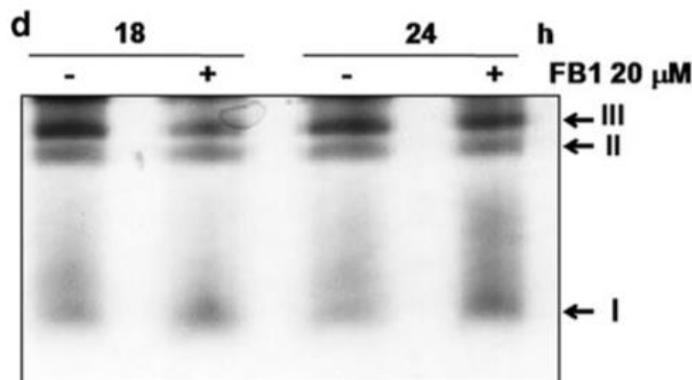


Figura 16. Patrones de movilidad de isoformas de β -1,3-glucanasa de embriones de maíz embebidos durante 18 y 24 h en ausencia o presencia de FB1 20 μ M, determinado por ensayos en gel nativos usando laminarina como sustrato (Tomado y modificado de Sánchez-Rangel et al. 2012).

Estos datos son consistentes con la interacción directa de la FB1 con las β -1,3-glucanasas básicas como se demostró en ensayos de actividad en gel en donde se muestra que la incubación con una concentración 100 μ M de la toxina causa una pérdida total de la actividad de estas isoformas mientras que no hay cambios detectables en la isoforma ácida (Fig. 17).

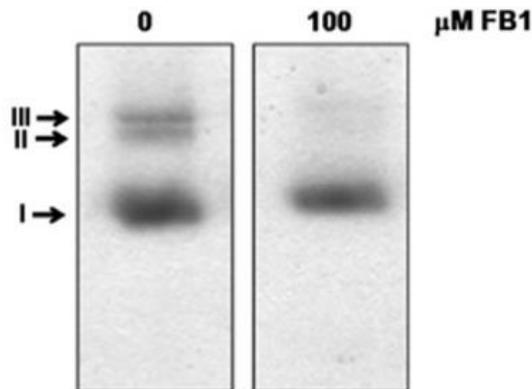


Figura 17. Efecto *in vitro* de la FB1 sobre isoformas básicas de β -1,3-glucanasa de maíz. Actividad de β -1,3-glucanasa determinada en extractos de proteínas de embriones germinados 24 h, utilizando el ensayo en gel incubado con FB1 100 μ M (Tomado y modificado de Sánchez-Rangel et al. 2012).

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

Dado que el genoma de maíz codifica al menos unas 12 β -1,3-glucanasas, la siguiente pregunta fue definir cuáles de estas enzimas participan en la interacción con *F. verticillioides* y la fumonisina B1. Para responder esto, se prepararon extractos proteicos de embriones de maíz germinados por 24 h y a partir de cromatografía de intercambio catiónico por FPLC se obtuvieron fracciones con actividad de β -1,3-glucanasa. La Fig. 18, presenta el cromatograma correspondiente a esta purificación, que muestra que las primeras fracciones (1-28) son aquellas no retenidas por la columna, mientras que las retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl, que corresponden a las fracciones (28-86) y son proteínas básicas (Ramos-Villegas, 2018).

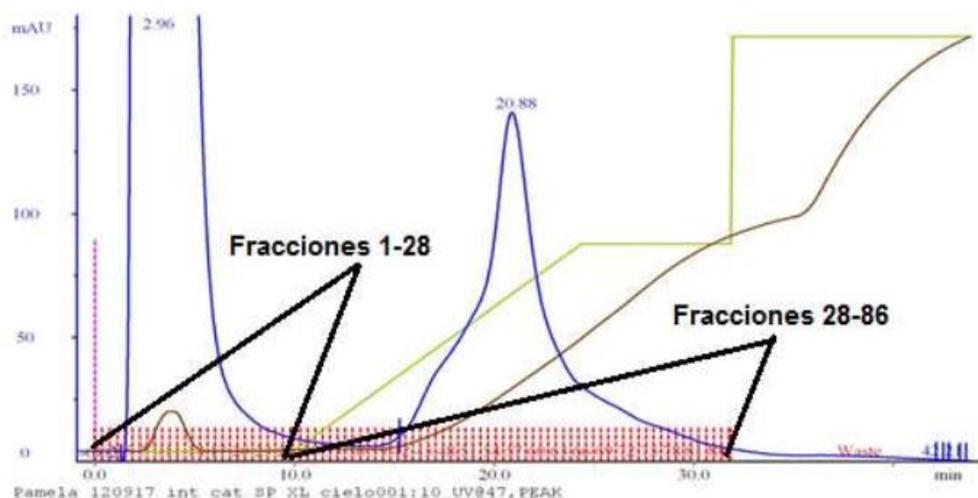


Figura 18. Cromatograma de intercambio catiónico en la separación de β -1,3-glucanasas de embriones de maíz. La muestra se encontraba a un pH=5.0 y se eluyó con un gradiente de NaCl. Las líneas rojas muestran el número de fracción, la línea azul la lectura del detector a 280 nm para detectar a las proteínas, la línea café es la conductancia de la fracción, la línea verde es el gradiente de NaCl (0–1 M) y la línea rosa la inyección de la muestra (Tomado de Ramos-Villegas, 2018).

A partir de fracciones en las que se detectó actividad de β -1,3-glucanasa, se realizó un análisis proteómico y se identificaron tres péptidos (Tabla 6) correspondientes a una β -1,3-glucanasa (*E1AFV5*; *ZmGlucA*), con una masa molecular predicha de 35.954 kDa y un pI de 9.38, consistente con el método de purificación y que corresponde a una isoforma básica.

Tabla 6. Péptidos correspondientes a una β -1,3-glucanasa de maíz (*E1AFV5*; *ZmGlucA*).

Secuencia del péptido
SASFADSWVQSNVRPYYPVAVGIK
DNGNGLNYNNLFDAMVDAVVALEK
NSGIALILDTGNGGGVLGQLAR

ZmGlucA corresponde a un cDNA de glucanasa específico de semilla (número de acceso al GenBank HM641756) de un tamaño de 1,261 pb.

III. Hipótesis

Las β -1,3-glucanasas son proteínas relacionadas a patogénesis (PRs), por lo que se inducirá la expresión del gen *ZmGlucA* en embriones de maíz en respuesta a la infección por *Fusarium verticillioides* y la presencia de su principal micotoxina; la fumonisina B1 (FB1).

IV. Objetivos generales y particulares

Objetivos generales:

1. Estudiar el patrón de expresión del gen *ZmGlucA* en embriones de maíz en respuesta a la infección por *Fusarium verticillioides* y la presencia de fumonisina B1 durante las primeras horas de germinación.
2. Aislar el cDNA completo de *ZmGlucA*, clonarlo en un vector de expresión y determinar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína en *Escherichia coli*.

Objetivos particulares:

- Extraer el RNA total de los embriones de maíz germinados en presencia de FB1 e infectados por *F. verticillioides*.
- Obtener el cDNA del gen de la β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) de maíz.
- Establecer las condiciones de amplificación del gen de la β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) de maíz, mediante RT-PCR punto final.
- Comparar los niveles de transcrito del β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) en embriones control y tratados con FB1 e infectados por *F. verticillioides* durante la germinación.
- Clonar el gen *ZmGlucA* en el vector pGEM[®]-T Easy y subclonar en el vector pET28b (+).

- Producir la proteína recombinante de la β -1,3-glucanasa de maíz.
- Identificar a la proteína recombinante que tiene una etiqueta 6X-His mediante Western blot.

V. Materiales y Métodos.

A. Material biológico: Cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*.

Se utilizó la cepa de *F. verticillioides* MY3, aislada de mazorcas de maíz colectados en el Valle del Yaqui, Sonora, México (Sánchez-Rangel et al. 2005).

1. Crecimiento de la cepa MY3 de *F. verticillioides*.

La cepa MY3 de *F. verticillioides*, almacenada en sustrato de turba de musgo / vermiculita a -20°C, se esparció sobre cajas Petri con medio PDA (Anexo) y se incubó a 28°C, bajo luz fluorescente (para favorecer la conidiación), durante 8-10 días. A partir de éste se tomó un cubo de aprox. 1 cm³ y se resembró en medio PDA y se incubó bajo las mismas condiciones por 7 días para colectar los conidios.

2. Conteo de conidios y preparación del inóculo.

Al cultivo de 7 días de la cepa MY3 de *F. verticillioides*, se le agregó 10 mL de agua estéril y se dejó en agitación a temperatura ambiente, 150 rpm y durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de agitación se recolectó el líquido con punta estéril, se colocó en microtubos estériles de 2 mL, se centrifugaron a 13,400 rpm en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf, por 15 min y se lavó el botón una vez con agua estéril (1.5 mL), se centrifugó de nuevo a 13,400 rpm por 5 min. El botón se resuspendió en 200 μ L de agua estéril y a partir de esta suspensión se hicieron diluciones para contar en el hemocitómetro (Galeana- Sánchez et al. 2014). Para el conteo de conidios se usó una cámara de Neubauer (Fig. 19) y en el microscopio óptico enfocado con el objetivo de 40X se contaron los conidios de los cuatro cuadrantes de las esquinas (I, II, III y IV).

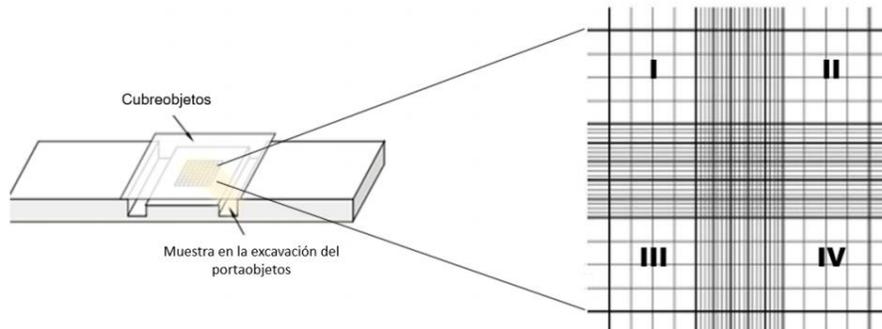


Figura 19. Cámara de Neubauer. El conteo se realizó en cada cuadrante de las esquinas y se obtuvo el promedio de conidios (Martínez-Fraca, 2019).

Para calcular la concentración de conidios se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{Conidios} / \mu\text{L}] = C \times \text{F.D.} \times 10$$

Donde:

C= promedio de conidios de los 4 cuadrantes.

F.D.= factor de dilución empleado.

Después de determinar la concentración de conidios, se preparó una suspensión con una concentración de 5,000 conidios/ μL (5×10^6 conidios/mL).

B. Material biológico: Embriones de maíz embebidos.

Genotipo de maíz

Semilla de maíz raza “Chalqueño” obtenido en el mercado de Chalco, Edo. de México.

1. Obtención, desinfección y germinación de embriones de maíz.

Se utilizaron semillas de maíz raza “Chalqueño”, los embriones de maíz se obtuvieron mediante la disección manual de la semilla seca usando una navaja, eliminando el endospermo y cuidando la integridad del embrión; los embriones colectados se mantuvieron en refrigeración a 4°C. Se desinfectaron con 100 mL de solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y se agitaron por 2 min. Se realizaron cuatro lavados con agua estéril por 2 min cada vez y con agitación vigorosa, después se secaron entre dos servitoallas estériles, bajo campana (Galeana-Sánchez, 2014).

2. Germinación de embriones de maíz con diferentes tratamientos.

Para la germinación de los embriones control, se distribuyeron 14 embriones de maíz desinfectados en cada caja Petri con agar 0.9% (anexo), por triplicado. Para el tratamiento con *F. verticillioides*, se sembraron los embriones como se indica arriba y cada embrión se inóculo en la superficie con 10 µL de una suspensión de conidios del hongo a una concentración de 5000 conidios/µL. Para el tratamiento con fumonisina B1, se sembraron los embriones en cajas con agar 0.9% suplementado con FB1 20 µM (anexo). Las cajas se incubaron a 28°C bajo luz fluorescente y se tomaron muestras de 7 embriones cada una, a las 12, 24 y 30 h. Estas muestras se pesaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

C. Efecto de la infección de *F. verticillioides* y la presencia de FB1 sobre los niveles de transcrito de *ZmGlucA*.

1. Extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA, los 7 embriones que conformaron cada muestra se colocaron en un mortero estéril y se congelaron con nitrógeno líquido. Se añadió Trizol™ (Invitrogen) en proporción 3:1 (vol/masa tejido) y se pulverizó con un pistilo hasta obtener una suspensión homogénea, se continuó con adición de nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA. La suspensión se incubó a temperatura ambiente por 5 min, se transfirió a microtubos y se centrifugó a 13,400 rpm durante 15 min y a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril, al cual se le agregó 200 µL de

una mezcla de FCI (Fenol-Cloroformo-Isoamílico 25:24:1), se agitó por inversión durante 15 segundos y cada tubo se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C.

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

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

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

2. Análisis electroforético del RNA total.

La integridad del RNA total se evaluó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa (2.5%). Se utilizó como amortiguador de corrida 500 mL de solución de TAE 1X. Se prepararon las muestras adicionando 1 µg de RNA (previamente cuantificado) y 2 µL de amortiguador de carga. El gel se corrió por 45 min a 85 V y después se colocó en un transiluminador UV y fue digitalizado en un sistema ChemiDoc™ MP para su análisis por densitometría.

3. Calibración por densitometría.

El ajuste o calibración por densitometría se realiza con el objetivo de partir de una cantidad similar de RNA total en una reacción de RT. Mediante el software ImageJ se realizó el análisis densitométrico de las dos bandas de RNA ribosomal (18S y 28S), resuelto en un gel de agarosa donde fue cargado 1 µg de cada muestra. Se toma como criterio que la diferencia entre los valores de densitometría de las bandas de RNAr no fuer

n mayores a un 15%. En caso de diferencias mayores entre muestras, se ajustó el volumen a cargar y se repitió el análisis densitométrico hasta minimizar dicha diferencia.

4. Reacción RT-PCR.

4.1. Síntesis de cDNA.

A partir de 1 µg de RNA se sintetizó cDNA por la reacción con la transcriptasa reversa (kit ImProm-II, Promega). El RNA se mezcló con 1 µL de Oligo dT (500 µg/mL, secuencia: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3') y H₂O-DEPC hasta un volumen final de 10 µL, la mezcla se mantuvo a 70°C por 5 min y posteriormente a 4°C por 5 min. A la mezcla de reacción (anexo) llevada a un volumen de 15 µL, se le adicionó 10 µL del RNA molde y se incubó a temperatura ambiente por 5 min y luego a 42°C, durante una hora. Después de este periodo, el tubo se colocó a 70°C por 15 min para inactivar a la transcriptasa reversa y el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.2. PCR para estimar los niveles de transcrito de *ZmGlucA*.

Se tomaron 3 µL de cDNA y se mezclaron con 2 µL de H₂O estéril, se mantuvo la mezcla en hielo (4°C) mientras se preparó la mezcla de reacción. Se utilizó el kit Go Taq[®] DNA Polimerasa (Promega). La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para PCR utilizando el kit Go Taq[®] DNA Polimerasa (Promega).

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer 5x Green Promega	4 μ L	1x
dNTPs (10 mM)	0.4 μ L	0.2 mM
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	0.6 μ L	0.6 μ M
Oligonucleótido antisentido (10 μ M)	0.6 μ L	0.6 μ M
Taq Polimerasa(1.2 U/ μ L)	0.25 μ L	0.02 U
H ₂ O estéril	9.15 μ L	c.b.p. 15 μ L
Volumen final	15 μ L	

Una vez preparada la mezcla de reacción se combinaron los 15 μ L de ésta con los 5 μ L de cDNA-H₂O, se agitó en el vórtex, se centrifugó brevemente en una microfuga y se colocó en el termociclador. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700 y se establecieron las condiciones de amplificación para cada gen de estudio haciendo un barrido de ciclos. Se amplificaron los transcritos para *ZmGlucA* y *ZmEF1 α* , las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla 8, se utilizó una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C por 5 min y una temperatura de elongación final de 72°C por 7 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (2.5% en TAE 1X), teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ L). Se empleó el sistema ChemiDoc[™] MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 8. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados.

Gen	Temp. desnat./tiempo	Temp. alineamiento /tiempo	Temp. elongación/ tiempo	Concentración de oligonucleótidos	No. de ciclos
<i>ZmGlucA</i>	94°C/1 min	60°C/1 min	72°C/1 min	0.6 µM	30
<i>ZmEF1α</i>	94°C/1 min	65°C/1 min	72°C/1 min	0.1 µM	26

4.3. Análisis de los amplicones de cDNA por densitometría.

El tamaño de los amplicones se obtuvo a partir de la búsqueda de las secuencias de cada gen en la base de datos NCBI. Los oligonucleótidos se diseñaron con ayuda del software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir de las secuencias de cDNA de cada uno de los genes (Tabla 9). El área de la densidad de las bandas de los amplicones se cuantificó mediante el software ImageJ.

Tabla 9. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes *ZmGlucA* y *ZmEF1α*.

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>ZmGlucA</i>	Fw 5'- GGAGAAGAAGACTTCGGCCTC-3'	189
	Rv 5'- AGTTAATTGCACCGCTCCTC-3'	
<i>ZmEF1α</i>	Fw 5'- TGGGCCCTACTGGTCTTACTACTGA-3'	135
	Rv 5'- ACATACCCACGCTTCAGATCCT-3'	

D. Amplificación del cDNA de *ZmGlucA* y clonación en pGEM[®]-T Easy.

1. Amplificación de *ZmGlucA*.

Para la amplificación del cDNA de *ZmGlucA*, se utilizó como molde el cDNA obtenido a partir del RNA total de una de las muestras de embriones infectados con la cepa MY3 de *F. verticillioides*.

Se tomaron 3 μL de cDNA y se mezclaron con 2 μL de H₂O estéril, se mantuvo la mezcla en hielo (4°C) mientras se preparó la mezcla de reacción. Se utilizó la DNA polimerasa de alta fidelidad iProof[™] High-Fidelity PCR (BIO-RAD). La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 10:

Tabla 10. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para PCR con el kit iProof[™] High-Fidelity PCR (BIO-RAD).

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer iProof (5X)	4 μL	1x
dNTPs (10 mM)	0.4 μL	0.2 mM
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.8 μL	0.8 μM
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.8 μL	0.8 μM
DNA polimerasa iProof (2 U/ μL)	0.4 μL	0.04 U
H ₂ O estéril	8.6 μL	c.b.p. 15 μL
Volumen final	15 μL	

Una vez preparada la mezcla de reacción, se combinaron los 15 μL de ésta con los 5 μL de cDNA-H₂O. Las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla 11, con una desnaturalización inicial a 98°C por 45 s y una elongación final a 72°C por 7 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1.2% en TAE 1X como amortiguador de corrida, teñido con bromuro de etidio

(0.5 µg/µL). Se empleó el sistema ChemiDoc™ MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 11. Condiciones para la amplificación del cDNA de *ZmGlucA* con el kit iProof™ High-Fidelity PCR de BIO-RAD.

Gen	Temp. desnat./Tiempo	Temp. alineamiento/Tiempo	Temp. elongación/Tiempo	Concentración de oligonucleótidos	No. De ciclos
<i>ZmGlucA</i>	98°C/20 s.	60°C/30 s.	72°C/30 s.	0.8 µM	30

Los oligonucleótidos se diseñaron con ayuda del software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir de la secuencia de cDNA (Tabla 12).

Tabla 12. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA completo de *ZmGlucA*.

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>ZmGlucA</i>	Sentido 5'- ACGTTTGCCTCCATTCTAC-3'	1,088
	Antisentido 5'- AGTTAATTGCACCGCTCCTC-3'	

2. Ligación de *ZmGlucA* al vector pGEM®-T Easy.

El amplicón *ZmGlucA* se purificó usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El DNA purificado se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000.

Para la adenilación del DNA purificado, necesaria para la clonación en el vector pGEM®-T Easy, se preparó una mezcla de reacción a un volumen final de 50 µL con la DNA polimerasa y dATP (anexo) en hielo (4°C) y se incubó a 72°C durante 20 min en el

termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700. Para calcular la cantidad de inserto a ligar, se utilizó la fórmula indicada en el anexo, donde se escogió una relación molar 3:1 (inserto: vector).

El cDNA purificado-adenilado y el vector pGEM[®]-T Easy, se mezclaron en presencia de la DNA ligasa y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Los componentes de la reacción se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Composición de la reacción de ligación.

Componentes de reacción	Volumen
Buffer 2x Rapid Ligation, T4 DNA Ligasa	5 µL
Vector pGEM[®]-T Easy (50 ng)	1 µL
Producto de PCR (55 ng)	3 µL (varía dependiendo la concentración)
T4 DNA ligasa (3 Weiss units/µL)	1 µL
H₂O libre de nucleasas	c.b.p. 10 µL

La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se utilizó para transformar células competentes (preparación de células competentes en el anexo).

3. Transformación de células competentes.

La transformación de las células competentes con los productos de la reacción de ligación se llevó a cabo utilizando el protocolo de transformación de pGEM[®]-T Easy Vector Systems de Promega, con algunas modificaciones:

1. Se prepararon 3 cajas Petri con LB/ampicilina/IPTG/X-Gal, por cada reacción de ligación; a 15 mL de medio LB con agar (peptona al 1% p/v; extracto de levadura

al 0.5% p/v; NaCl 170 Mm; agar al 1% p/v), se le agregó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, 100 µL de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactósido) 100 mM y 30 µL del sustrato cromogénico X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-Indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/mL disuelto en DMFA (N,N'-dimetil-formamida).

2. Se descongeló en hielo un tubo de células competentes *E. coli* DH5α (100 µL) por 5 min.
3. Se centrifugaron los tubos que contenían la reacción de ligación, para colectar el contenido al fondo. Se añadió 5 µL de la reacción de ligación al tubo de células competentes y se mezcló suavemente con la punta de la pipeta.
4. Las células se incubaron en hielo por 20 min.
5. Se les dio un choque térmico a 42°C por 50 s, en este paso es importante no mover ni sacudir las muestras.
6. Inmediatamente se devolvieron los tubos con la muestra al hielo por 2 min.
7. Se les añadió 800 µL de medio SOC recién preparado (640 µL de LB, 160 µL de Glucosa 0.1 M).
8. Se incubaron por 2 h, a 37°C y con agitación a 160 rpm.
9. Se centrifugaron los tubos con la muestra a 6,000 rpm, por 2 min y a 4°C en la centrifuga MiniSpin® Eppendorf. Después se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 400 µL de caldo LB (peptona al 1% p/v; extracto de levadura al 0.5% p/v; NaCl 170 mM).
10. Se dispersaron diferentes volúmenes de células transformadas (50 µL, 100 µL y 250 µL) en las cajas Petri con LB/ampicilina/IPTG/X-Gal.
11. Una vez que el líquido se absorbió en el agar, las cajas se invirtieron y se dejaron incubando toda la noche (16-24 h) a 37°C, para permitir el crecimiento de las colonias.

12. Después de ese tiempo se colocaron a 4°C, para permitir el desarrollo del color azul en las colonias de clonas no recombinantes.

Las colonias que se mantuvieron blancas (clonas recombinantes putativas) se inocularon en 5 mL de medio Terrific Broth o TB (Triptona al 1.18% p/v, Extracto de levadura al 2.36% p/v, K₂HPO₄ 54 mM, KH₂PO₄ 16 Mm y glicerol al 0.4% v/v) con ampicilina (100 µg/mL) y se inocularon con agitación a 37°C durante toda la noche. Este cultivo bacteriano se utilizó para hacer extracción de DNA plasmídico.

4. Extracción de DNA plasmídico.

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo, con algunas modificaciones, utilizando el protocolo indicado en (Sambrook et al. 1989):

1. Se centrifugó 1,400 µL de un cultivo bacteriano crecido la noche anterior en caldo TB con ampicilina (100 mg/mL) en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf, durante 1 min, a velocidad máxima (13,400 rpm) y a 4°C. Se eliminó el sobrenadante.
2. Cuando el botón celular fue muy pequeño se añadió de nuevo 1,400 µL de un cultivo bacteriano, se centrifugó durante 1 min, a velocidad máxima (13,400 rpm), a 4°C y se eliminó el sobrenadante.
3. El botón bacteriano se resuspendió en 200 µL de amortiguador GTE frío (glucosa 50 mM, Tris 25 mM pH 8.0, Na₂EDTA.2H₂O 10 mM pH 8.0) pipeteando de arriba abajo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
4. Se agregaron 300 µL de solución de lisis alcalina (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) recién preparada y se mezcló invirtiendo suavemente el tubo unas 6 veces.
5. Se agregó 300 µL de acetato de potasio 3 M, pH 4.8. Se mezcló por inversión unas 8 veces y se incubó en hielo durante 5 min.
6. Se centrifugó a 13,400 rpm por 5 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf. El sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril.

7. Al sobrenadante se le adicionó un volumen igual de isopropanol frío para precipitar el DNA, el tubo se mezcló por inversión. Se incubó a -20°C por lo menos durante 20 min. Pasando el tiempo de incubación se centrifugó a 13,400 rpm por 5 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf.
8. Se eliminó el sobrenadante y el botón de DNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf.
9. Se eliminó el sobrenadante y el disolvente residual se eliminó por evaporación durante 10 min.
10. El botón de DNA seco se disolvió en 30 μL de agua estéril y se guardó a -20°C hasta su uso.

Se realizó un PCR confirmativo utilizando como molde el DNA que se obtuvo de cada una de las colonias putativas recombinantes. Se preparó la mezcla de reacción utilizando el kit Go Taq[®] DNA Polimerasa Promega, siguiendo el protocolo descrito en la sección C.4.2. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos a 58°C como temperatura de alineamiento y concentración de oligonucleótidos de 0.8 μM . Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (1.2% en TAE 1X), teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se empleó el sistema ChemiDoc[™] MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Una vez que se tuvo la certeza de tener clonado a *ZmGlucA*, se extrajo el DNA plasmídico recombinante con el kit PureYield[™] Plasmid Miniprep System, siguiendo el protocolo de purificación por centrifugación para volúmenes grandes de cultivo indicado por el fabricante (Promega). Se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000 y se mandó a secuenciar el DNA de 4 clonas; con los oligonucleótidos Sp6 y T7 a la empresa Laragen (www.laragen.com; secuencia en anexo).

E. Clonación direccional de *ZmGlucA* en pET28b (+).

1. Análisis bioinformático.

Una vez que se confirmó la secuencia de *ZmGlucA*, se analizó con el programa Restriction Mapper (<http://restrictionmapper.org/>) con la finalidad de conocer que enzimas de restricción digieren la secuencia del gen. En función de estos resultados se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación y clonación direccional en pET28b (+). También se realizó un análisis BLAST en la página de NCBI con el propósito de conocer que tan significativas son las coincidencias que encuentra entre nuestra secuencia y las que se le parecen en la base de datos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2. Amplificación de *ZmGlucA* con oligonucleótidos que contienen un sitio de restricción para *NdeI* y *EcoRI*.

A partir de la secuencia del gen *ZmGlucA* se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), los sitios de restricción para *NdeI* y *EcoRI*, fueron adicionados a los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente, como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Secuencias y tamaño de oligonucleótidos con sitios de restricción para *NdeI* y *EcoRI* utilizados para la amplificación de *ZmGlucA*.

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>ZmGlucA</i>	5'- GATTC <u>CATATG</u> ACGTTTGCGTCCATTCCT -3' <i>NdeI</i>	960
	5' -CCG <u>GAATTC</u> GTTGAACCGGATCGGGTA -3' <i>EcoRI</i>	

Para la amplificación se utilizó como molde 100 ng de DNA plasmídico recombinante (pGEM-T Easy/*ZmGlucA*). Para preparar la mezcla de reacción se utilizó el kit iProof™ High-Fidelity PCR de BIO-RAD y se preparó como se describe en la sección D.1. Una

vez preparada la mezcla de reacción se combinaron los 15 µL de ésta con los 5 µL de DNA-H₂O. Las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla 15. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µL). Se empleó el sistema ChemiDoc™ MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 15. Condiciones para la amplificación del cDNA de *ZmGlucA* con el kit iProof™ High-Fidelity PCR de BIO-RAD.

Gen	Temp. desnat./Tiempo	Temp. alineamiento/Tiempo	Temp. elongación /Tiempo	Concentración de oligonucleótidos	No. De ciclos
<i>ZmGlucA</i>	98°C/20 s	60°C/30 s	72°C/30 s	0.8 µM	5
	98°C/20 s	62°C/30 s	72°C/30 s	0.8 µM	25

3. Ligación de *ZmGlucA* con sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* al vector pGEM®-T Easy.

El DNA a clonar se purificó usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El DNA purificado se cuantificó en el Thermo Scientific NanoDrop 2000.

Para la adenilación del DNA purificado, se preparó una mezcla de reacción (anexo) en un volumen final de 20 µL y se incubó a 72°C durante 20 min en el termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700.

Con el cDNA purificado-adenilado y el vector pGEM®-T Easy, se llevó a cabo una reacción de ligación en un volumen final de 20 µL siguiendo el protocolo indicado en la sección D.2. La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se utilizó para transformar células competentes.

4. Transformación de células competentes DH5α.

Para la transformación de células competentes DH5α se siguió el protocolo indicado en la sección D.3. Se utilizaron 10 µL de la reacción de ligación. Las clonas recombinantes

putativas se inocularon en 5 mL de medio Terrific Broth o TB (Tryptona al 1.18% p/v, Extracto de levadura al 2.36% p/v, K₂HPO₄ 54 mM, KH₂PO₄ 16 mM y glicerol al 0.4% v/v) con ampicilina (100 µg/mL) y se inocularon con agitación a 37°C durante toda la noche.

5. Extracción de DNA plasmídico y PCR confirmativo.

Para la extracción de DNA plasmídico se siguió el protocolo descrito en la sección D.4.

Se realizó un PCR confirmativo utilizando como molde el DNA que se obtuvo de cada una de las colonias putativas recombinantes. Se preparó la mezcla de reacción utilizando el kit Go Taq[®] DNA Polimerasa Promega, siguiendo el protocolo descrito en la sección C.4.2. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 16 y se utilizaron los oligonucleótidos que contienen sitio de restricción para *NdeI* y *EcoRI* cuya secuencia se encuentra en la sección E.2. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µL). Se empleó el sistema ChemiDoc[™] MP para observar y documentar los productos de amplificación.

Tabla 16. Condiciones para la amplificación de *ZmGlucA* con oligonucleótidos que contienen sitios de restricción para *NdeI* y *EcoRI*, utilizando el kit Go Taq[®] DNA Polimerasa (Promega).

Gen	Temp. desnat./Tiempo	Temp. alineamiento /Tiempo	Temp. elongación/ Tiempo	Concentración de oligonucleótidos	No. De ciclos
<i>ZmGlucA</i>	94°C/1 min	56°C/1 min	72°C/2 min	0.8 µM	5
	94°C/1 min	58°C/1 min	72°C/2 min	0.8 µM	25

6. Ensayo de restricción del DNA plasmídico recombinante y del vector pET28b (+).

Se seleccionaron las clonas recombinantes que amplificaron a *ZmGlucA*, se cultivaron en medio TB con ampicilina (100 µg/mL) y se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Este cultivo se utilizó para extraer el DNA plasmídico recombinante con el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System, siguiendo el protocolo de purificación por centrifugación para volúmenes grandes de cultivo indicado por el fabricante (Promega). El DNA se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000.

Se utilizaron 250 ng de DNA plasmídico recombinante para digerir con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* y generar extremos cohesivos. Se añadió en un microtubo de 1.5 mL el volumen necesario de la muestra para tener 250 ng de DNA y el agua estéril c.b.p. un volumen final de 20 µL. Se incubó a 90°C durante 5 min y en hielo (4°C) durante 5 min. Se agregó 2 µL del amortiguador Buffer D 10X (Promega) y 0.5 µL de cada enzima (Tabla 17). La muestra se incubó a 37°C durante 1 hora.

Tabla 17. Componentes del ensayo de Restricción.

Componentes de la reacción	Volumen
DNA (250 ng)	µL (varía dependiendo la concentración)
Buffer D 10X (Promega)	2 µL
<i>NdeI</i> 10 U/ mL (Promega)	0.5 µL
<i>EcoRI</i> 12 U/ mL (Promega)	0.5 µL
H ₂ O libre de nucleasas	c.b.p. 20 µL

Se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa (1.2% en TAE 1X), teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µL). Se visualizó el vector pGEM®-T Easy y el gen *ZmGlucA* bajo luz UV, se purificó la banda usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up y se cuantificó en el Thermo Scientific NanoDrop 2000.

También se realizó un ensayo de restricción al vector pET28b (+) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Después se visualizó y se purificó tomando la banda del gel y por último se cuantificó.

7. Ligación de *ZmGlucA* al vector pET28b (+).

Con *ZmGlucA* y el vector pET28b (+), previamente digeridos con *NdeI* y *EcoRI*, se llevó a cabo una reacción de ligación. Se calculó la cantidad del inserto a ligar utilizando la fórmula descrita en el anexo. Los componentes de la reacción se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Composición de la reacción de ligación [*ZmGlucA* con sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* al vector pET28b (+)].

Componentes de reacción	Volumen
Buffer 2x Rapid Ligation, T4 DNA Ligasa	5 µL
Vector pET28b (+) (50 ng)	3.7 µL
Producto de PCR (27.17 ng)	1.2 µL
T4 DNA ligasa (3 Weiss units/µL)	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	c.b.p. 10 µL

La reacción se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se utilizó para transformar células competentes.

8. Transformación de células competentes *E. coli* DH5α con DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA*, extracción de DNA plasmídico y PCR confirmativo.

Para la transformación de células competentes DH5α se siguió el protocolo indicado en la sección D.3. Se utilizaron 5 µL de la reacción de ligación.

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el cultivo bacteriano crecido la noche anterior en medio TB con kanamicina (100 µg/mL) y se siguió el protocolo descrito en la sección D.4.

Se realizó un PCR confirmativo utilizando como molde el DNA que se obtuvo de cada una de las colonias putativas recombinantes y se siguió el protocolo descrito en la sección E.5., utilizando las mismas condiciones de amplificación. Los productos de

amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1.2% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/µL).

También se realizó un ensayo de restricción al DNA plasmídico recombinante con *NdeI* y *EcoRI* siguiendo el protocolo descrito en la sección E.6. Una vez que se tuvo la certeza de tener clonado a *ZmGlucA* en este vector, se extrajo el DNA plasmídico recombinante con el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System. Se cuantificó espectrofotométricamente en el Thermo Scientific NanoDrop 2000 y se mandó a secuenciar, con la finalidad de corroborar que la secuencia se encontrara en marco, con los oligonucleótidos T7- promotor y T7- terminador (secuencia en anexo).

9. Transformación de células competentes *E. coli* BL21-RIL con DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA* para la sobreexpresión.

Para la transformación de células competentes BL21-RIL se siguió el protocolo indicado en la sección D.3. Se utilizaron 50 ng de DNA plasmídico recombinante (pET28b(+)/*ZmGlucA*).

Las clonas recombinantes putativas se inocularon en medio TB suplementado con kanamicina (100 µg/mL) y se inocularon con agitación a 37°C durante toda la noche. A estos cultivos se les extrajo el DNA plasmídico siguiendo el protocolo descrito en la sección D.4. Se realizó un PCR confirmativo donde se siguió el protocolo descrito en la sección E.5. utilizando las mismas condiciones de amplificación.

F. Sobreexpresión de *ZmGlucA* recombinante.

1. Inducción de *ZmGlucA* recombinante con IPTG.

Para la inducción de la proteína se utilizaron dos clonas recombinantes (Clona A y B) y un control negativo que solo contenía el vector pET28b (+). Estas clonas y el control negativo y sus duplicados (a los cuales no se les añadió IPTG), se inocularon en 15 mL de medio LB (peptona al 1% p/v; extracto de levadura al 0.5% p/v; NaCl 170 mM), suplementado con kanamicina (100 µg/mL), en matraces Erlenmeyer de 25 mL con tapón de rosca, se incubaron a 37°C, con agitación (250 rpm), durante aproximadamente 4.5 h, hasta que el cultivo alcanzará una densidad óptica, medida a 600 nm, de 0.5-0.7.

Se indujo la síntesis de la proteína recombinante, una vez que los cultivos alcanzaran la densidad óptica deseada, con la adición de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactósido) 1 mM y se continuó con la incubación a 37°C y agitación (250 rpm), por 4 h más. Al concluir este tiempo, se centrifugaron 5 mL de cada uno de los cultivos a 13,400 rpm por 1 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf. Los botones celulares se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

2. Lisis celular de *E. coli* BL21-RIL transformada.

A los botones celulares se les agregó 300 μ L de solución PBS 1X pH=7.3 (NaCl 1.37 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) y se resuspendieron con pipeteo. Se centrifugaron a 13,400 rpm por 1 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 750 μ L de solución inhibidora de proteasas Complete™ disueltas en PBS 1X, pH=7.3. La suspensión celular se sometió a sonicación en 4 ciclos: 1 min, 40 s a 130 watts de potencia en pulsos de 20%, con pulsos de 20 s y descansos de 20 s entre cada bloque de pulsos. El sonicador usado fue el Ultrasonic Processor Wattage (Sonics Materials, Modelo VC-505). Las muestras se centrifugaron a 13,400 rpm por 5 min a 4°C en la centrifuga MiniSpin[®] Eppendorf y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo estéril.

3. Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Se elaboró una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) como se indica en el anexo (Bradford, 1976). Para cada punto de la curva patrón se hicieron triplicados y para las muestras duplicados. Se ocuparon 5 μ L de cada una de las muestras y se utilizó como blanco de la muestra el amortiguador de lisis. La cantidad de proteína se obtuvo interpolando la absorbancia de las muestras con el de la curva patrón, la lectura de la absorbancia se realizó a 595 nm, en placas de ELISA de 96 pozos. En la figura 20 se muestra la curva típica obtenida.

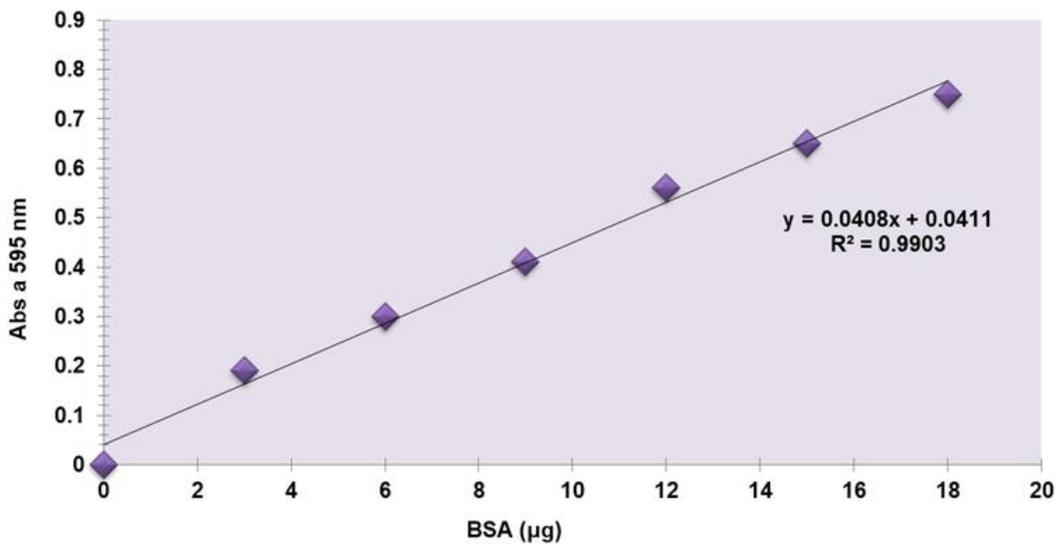


Figura 20. Curva patrón de proteínas determinadas por Bradford. Se empleó BSA como estándar.

4. Electroforesis de proteínas.

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 14% y de cada una de las muestras se cargó aproximadamente 2-35 µg de proteína mezclada con amortiguador de carga (25 µL muestra, 5 µL amortiguador de carga). Antes de cargar las muestras se calentaron a 90°C durante 5 min. El gel se corrió en amortiguador de electrodos durante 2.5 h a 90 V. Una vez terminado el corrimiento electroforético, al gel se le agregó solución fijadora y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital constante. Después del tiempo de incubación se eliminó la solución fijadora, se agregó la solución teñidora (azul de Coomassie) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación orbital constante y por último se destiñó con la solución desteñidora. Se empleó el sistema ChemiDoc™ MP para documentar al gel.

5. Detección de la proteína recombinante por Western blot.

Para el Western blot se realizó una electroforesis de proteínas como se describió en la sección anterior. Una vez terminado el corrimiento electroforético, se realizó la transferencia del gel a una membrana.

5.1. Transferencia del gel.

En un equipo de transferencia SD10 Semi Dry Mini (Cleaver Scientific Ltf), se colocaron en el siguiente orden:

- a) Seis tiras de papel Whatmann 3MM humedecidos en solución de transferencia (anexo).
- b) Membrana de PVDF (Immobilon™-P, poro de 0.45 µm, MILIPORE), previamente lavada por 30 segundos con metanol absoluto y después varias veces con agua estéril, y colocada en la solución de transferencia hasta su uso.
- c) El gel que estaba contenido en la solución de transferencia.
- d) Seis tiras de papel Whatmann 3MM humedecidos en la solución de transferencia.

La transferencia se llevó a cabo a 10 V por cada gel de 7.5 x 4.0 cm por 45 min.

5.2. Bloqueo e incubación de la membrana con el primer y segundo anticuerpo.

La membrana se incubó con 20 mL de la solución de bloqueo (anexo) durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Inmediatamente después la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal His-probe (G-18) marca Sigma, obtenido de conejo, a una dilución 1:5000, en la solución de bloqueo recién preparada, se incubó toda la noche a 4°C y con agitación leve. Después de la incubación con el primer anticuerpo la membrana se trató de la siguiente forma:

Se lavó 3 veces con 20 mL de la solución de lavado (anexo), durante 10 min cada vez. Se incubó con el segundo anticuerpo contra las cadenas pesada y ligera de la IgG de conejo y conjugado a la peroxidasa de rábano (Anti-rabbit IgG-conjugado a la HRP), diluido 1:10000, en la solución de bloqueo recién preparada y se incubó una hora, a temperatura ambiente y con agitación leve. Terminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con 20 mL de la solución de lavado, durante 10 min cada vez.

5.3. Detección de las proteínas inmunoreactivas.

Para la detección de señales, la membrana se incubó durante 2 min, en una mezcla de volúmenes iguales de los reactivos (1 y 2) del equipo de detección por

quimioluminiscencia ECL™ (Amersham). Las imágenes de las membranas fueron documentadas por el equipo ChemiDoc™ MP.

VI. Resultados

A. La expresión del gen *ZmGlucA* se induce por la infección de *Fusarium verticillioides* y la presencia de fumonisina B1 en embriones de maíz durante la germinación.

Para estudiar el patrón de expresión de *ZmGlucA* se embebieron embriones de maíz en presencia de la FB1 o inoculados con *F. verticillioides*; si bien los embriones sí germinaron, se observó la reducción del tamaño de la radícula de ambos tratamientos comparados con el control (Fig. 21). En los embriones infectados con *F. verticillioides*, se observó la presencia del micelio algodonoso blanco-rosado en la superficie y en la radícula a las 30 h.



Figura 21. Embriones de maíz embebidos durante 30 h. Se incluye el control sin tratamiento, la aplicación de FB1 (20 μ M) y la inoculación con 50,000 conidios de *F. verticillioides*.

Se extrajo RNA total de las muestras a tres tiempos de imbibición (12, 24 y 30 h), así como de embriones secos. Se evaluó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5% (Fig. 22) y se observaron bandas intensas y bien

definidas correspondientes a los RNAr 28S y 18S, indicador de la integridad del RNA extraído.

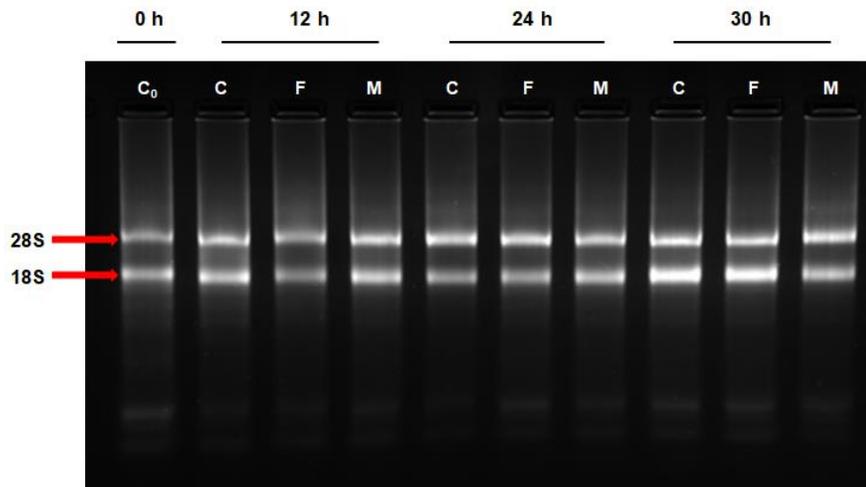


Figura 22. Evaluación de la integridad del RNA total en gel de agarosa al 2.5 %. El RNA total se aisló de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos, se cargó 1 μ g de cada muestra. C₀, 0 h Embriones secos; C Control; F Tratamiento con FB1 20 μ M; M Infección con *F. verticillioides*, incubados por 12, 24 y 30 h.

Se realizó la calibración por densitometría del RNA, esto con el objetivo de partir de una cantidad similar de RNA total en una reacción de RT. Se hizo el análisis densitométrico de las dos bandas de RNAr (18 y 28 S) resuelto en un gel de agarosa donde fue cargado 1 μ g de cada muestra (anexo, Tabla 1B). A partir de las muestras cuantificadas de RNA total se sintetizó el cDNA.

Para evaluar los niveles de transcrito del gen *ZmGlucA* se realizó RT-PCR semicuantitativo, donde se empleó al gen *ZmEF1 α* como control de referencia, debido a que este gen se expresa de forma constitutiva (Berberich et al. 1995). Las condiciones de amplificación para el gen β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) y el gen *ZmEF1 α* fueron determinadas mediante un barrido de ciclos (anexo, Fig. 1B y 2B).

Se estudiaron los niveles de transcritos en embriones secos y a tres tiempos de imbibición. La Fig. 23 muestra un gel representativo del ensayo para estudiar los niveles de transcrito, y la Fig. 24 el análisis densitométrico de la intensidad de las bandas. Se

puede ver que el gen de referencia utilizado (*ZmEF1 α*) presentó una expresión constante pues los niveles no variaron durante la germinación ni en respuesta a los tratamientos, por lo tanto, resultó ser un buen control interno. También se observa que el gen *ZmGlucA* no se expresó en embriones secos pero sí a lo largo de la germinación. Desde las 24 h, los tratamientos con FB1 y la cepa MY3 de *F. verticillioides* indujeron la expresión del gen de la β -1,3-glucanasa.

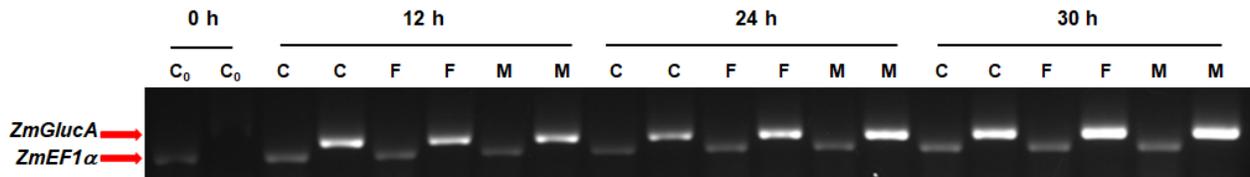


Figura 23. Niveles de transcritos de los genes β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) y *ZmEF1 α* . Los cDNAs se obtuvieron por RT-PCR a partir de RNA total aislado de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos e incubados a 12, 24 y 30 h, y se separaron en gel de agarosa al 2.5 %. Amplicón del gen de referencia *ZmEF1 α* 135 pb, Amplicón del gen β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) 189 pb. C₀, 0 h Embriones secos; C, Control; F, Tratamiento con FB1 20 μ M; M, Infección con la cepa MY3 de *F. verticillioides*.

A las 12 h no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero a las 24 h, tanto la FB1 como la infección por *F. verticillioides* causaron un incremento del 36% y 43% respectivamente, comparado al control y a las 30 h esta inducción fue del 44% y 52%.

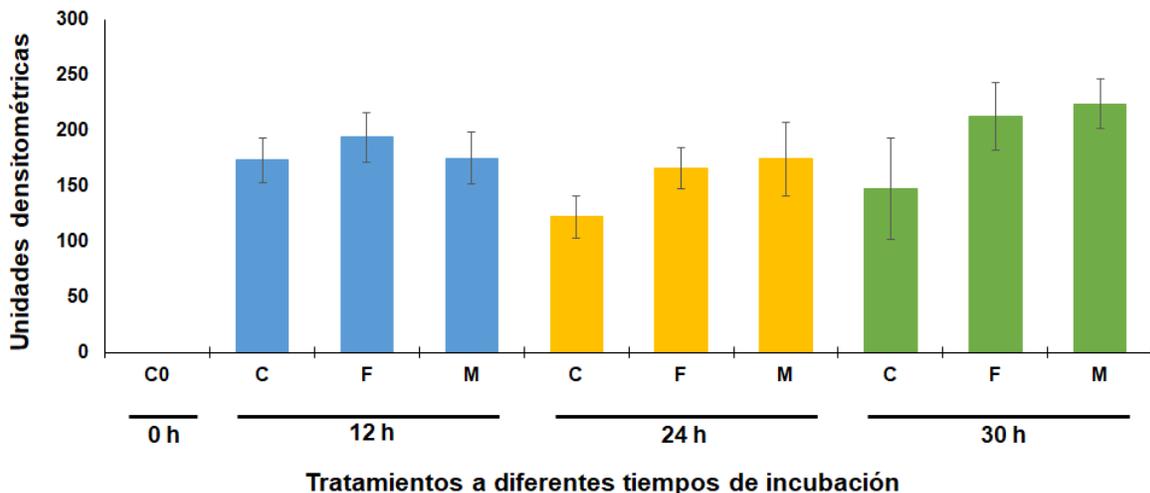


Figura 24. Análisis densitométrico del efecto de *Fusarium verticillioides* y FB1 sobre los niveles de expresión del transcrito de *ZmGlucA*. C₀, 0 h Embriones secos; C Control; F Tratamiento con FB1 20 µM; M Infección con la cepa MY3 de *F. verticillioides*, incubados a 12, 24 y 30 h. Se muestra el promedio ± DS de dos réplicas biológicas con dos réplicas técnicas cada una.

B. Aislamiento del cDNA de *ZmGlucA* y clonación en pGEM[®]-T Easy.

1. Aislamiento del cDNA de *ZmGlucA*.

Nos basamos en la secuencia del cDNA de *ZmGlucA* (Número de acceso al GenBank: HM641756.1) que tiene una longitud de 1261 pb, y regiones 5'-UTR y 3'-UTR de 34 pb y 207 pb, respectivamente, con un marco de lectura abierto de 1,020 pb. Se amplificó mediante PCR el fragmento a clonar de 1,088 pb (Fig. 25), que excluye la región 5'-UTR, la secuencia correspondiente al péptido señal, y parte de la región 3'-UTR. Se probaron diferentes concentraciones de oligonucleótidos (0.6 µM y 0.8 µM) con resultados positivos.

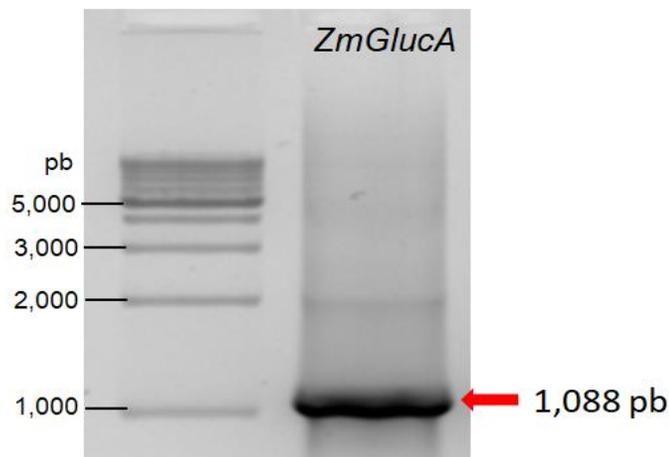


Figura 25. Imagen de gel agarosa al 1.2% con banda resultante del PCR a partir del molde de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. Se utilizó una concentración de oligonucleótidos de 0.8 µM, 30 ciclos, Desnaturalización inicial 98°C, 45 s; Desnaturalización 98°C, 20 s; Alineamiento 60°C, 30 s; Extensión 72°C, 30 s; Extensión final 72°C, 7 min. Tamaño del Amplicón 1,088 pb.

2. Clonación de *ZmGlucA* en pGEM[®]-T Easy.

Una vez aislado el cDNA de *ZmGlucA*, se ligó al vector pGEM[®]-T Easy y el producto de la reacción de ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Se hizo una selección fenotípica a partir del DNA plasmídico de colonias blancas, y un PCR confirmativo para verificar la presencia del plásmido recombinante (Fig. 26). Se eligieron 4 de las colonias blancas (C β 1, C β 2, C β 3 y C β 4) para secuenciar su DNA con los oligonucleótidos Sp6 y T7.

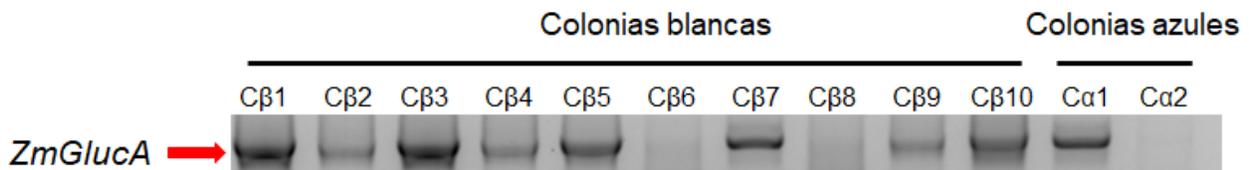


Figura 26. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. Tamaño del Amplicón 1,088 pb.

3. Análisis de la secuencia del gen *ZmGlucA*.

Los resultados de la secuencia fueron idénticos para las cuatro clonas (Anexo: electroferograma, Fig. 3B) y la Fig. 27 muestra el cDNA de *ZmGlucA* de un tamaño de 1,084 pb, este fragmento contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 320 residuos de aminoácidos con un peso molecular deducido de 34 kDa y un pI de 9.47, ambos calculados con el programa SnapGene Viewer.

Se hizo un alineamiento del gen de la β -1,3-glucanasa clonado, utilizando la secuencia de cDNA de 1,084 pb, con la secuencia conocida del gen *ZmGlucA* (Número de acceso al GenBank: HM641756.1). El porcentaje de identidad es del 99.45% lo que sugiere que se trata del mismo gen. Las diferencias a nivel de DNA son 6 nucleótidos en la región 3'-UTR por lo que a nivel de proteína el porcentaje de identidad es del 100% (Fig. 27).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1973 bits(1068)	0.0	1082/1088(99%)	4/1088(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACGTTTGCGTCCATTCTACAACCGTGCACTCCATCGGCGTCTGCTACGGCACGCTGGGC	60		
Sbjct 92	ACGTTTGCGTCCATTCTACAACCGTGCACTCCATCGGCGTCTGCTACGGCACGCTGGGC	151		
Query 61	AACAACCTGCCGTCCAGCAGCGACGTGGTGCAGCTCTACAGGTCCAAGGGCATCAAAGGC	120		
Sbjct 152	AACAACCTGCCGTCCAGCAGCGACGTGGTGCAGCTCTACAGGTCCAAGGGCATCAAAGGC	211		
Query 121	ATGCGCATCTACTCCCCGACGCGCAAAGCCCTCGCCGCCCTGCGCAACTCCGGCATCGCG	180		
Sbjct 212	ATGCGCATCTACTCCCCGACGCGCAAAGCCCTCGCCGCCCTGCGCAACTCCGGCATCGCG	271		
Query 181	CTCATCTCGACACCGGCAACGGCGGGCGGCTCCTGGGCCAGCTCGCCAGGAGCGCCTCG	240		
Sbjct 272	CTCATCTCGACACCGGCAACGGCGGGCGGCTCCTGGGCCAGCTCGCCAGGAGCGCCTCG	331		
Query 241	TTCGCGGACTCGTGGGTGCAGAGCAACGTGCGGCCCTACTACCCCGCCGTCGGCATCAAG	300		
Sbjct 332	TTCGCGGACTCGTGGGTGCAGAGCAACGTGCGGCCCTACTACCCCGCCGTCGGCATCAAG	391		
Query 301	TACGTCGCGGTGGGCAACGAGGTGCAGGGCGACGACACGCGCAGCCTCTCCCGGCGATG	360		
Sbjct 392	TACGTCGCGGTGGGCAACGAGGTGCAGGGCGACGACACGCGCAGCCTCTCCCGGCGATG	451		
Query 361	CGCAACCTGGACGCCGCCCTGGCGCGCGCCGGCTTCCCGGGCATCAAAGTCTCCACGTCG	420		
Sbjct 452	CGCAACCTGGACGCCGCCCTGGCGCGCGCCGGCTTCCCGGGCATCAAAGTCTCCACGTCG	511		
Query 421	GTGCGCTTCGACGTGGTGCAGCAACTCGTTCGCCCTCCAGCGGCTCTTCGCGCAGGGC	480		
Sbjct 512	GTGCGCTTCGACGTGGTGCAGCAACTCGTTCGCCCTCCAGCGGCTCTTCGCGCAGGGC	571		
Query 481	TACATGGCGGACGTCGCGCGCTACCTGGCCGGCACCGGCGCGCCGCTGCTCGCCAACGTG	540		
Sbjct 572	TACATGGCGGACGTCGCGCGCTACCTGGCCGGCACCGGCGCGCCGCTGCTCGCCAACGTG	631		
Query 541	TACCCCTACTTCGCGTACCGGACAACCCGCGCGACATCAGCCTGGGCTACGCCACGTTTC	600		
Sbjct 632	TACCCCTACTTCGCGTACCGGACAACCCGCGCGACATCAGCCTGGGCTACGCCACGTTTC	691		
Query 601	CAGCCGGGACACCGTCAAGGACAACGGCAACGGCCTCAACTACAACAACCTGTTTCGAC	660		
Sbjct 692	CAGCCGGGACACCGTCAAGGACAACGGCAACGGCCTCAACTACAACAACCTGTTTCGAC	751		
Query 661	GCCATGGTGGACGCCGTCGTCGCGCGCTCGAGAAAGGCCGGCGCGCCCAACGTCAGGGTC	720		
Sbjct 752	GCCATGGTGGACGCCGTCGTCGCGCGCTCGAGAAAGGCCGGCGCGCCCAACGTCAGGGTC	811		
Query 721	GTCGTGTCGAGAGCGGCTGGCCCTCGGCCGGCGGCTTCGGGGCCAGCGTCGACAACGCG	780		
Sbjct 812	GTCGTGTCGAGAGCGGCTGGCCCTCGGCCGGCGGCTTCGGGGCCAGCGTCGACAACGCG	871		
Query 781	CGGAAATACAACAGGGACTCATCGACCACGTCGGCCGGCACGCCCAAGAGGACCGGGC	840		
Sbjct 872	CGGAAATACAACAGGGACTCATCGACCACGTCGGCCGGCACGCCCAAGAGGACCGGGC	931		
Query 841	CCGCTGGAGACCTTCGCTTCGCCATGTTCAACGAGAACCAGAAGGGCGGCGATCCCACG	900		
Sbjct 932	CCGCTGGAGACCTTCGCTTCGCCATGTTCAACGAGAACCAGAAGGGCGGCGATCCCACG	991		
Query 901	GAGAAGAACTTCGGCCTTCTACGGCAACAAGCAGCCCGTGTACCCGATCCGGTTCAAC	960		
Sbjct 992	GAGAAGAACTTCGGCCTTCTACGGCAACAAGCAGCCCGTGTACCCGATCCGGTTCAAC	1051		
Query 961	TAATTAAGAGTGGCGGATCGGAGGAATAATACATCTTCATCAATCAATTAACCTAATAAT	1020		
Sbjct 1052	TAATTAAGAGTGGCGGATCGGAGGAATAATACATCTTCATCAATCAATTAACCTAATAAT	1111		
Query 1021	ATGCTACATGAATAAGCTGCTGCGTGCATGTCGCGGACTTGTGGAGGACCTTTGTC	1076		
Sbjct 1112	ATGCTACATGAATAAGCTGCTGCGTGCATGTCGCGGACTTGTGGAGGACCTTTGTC	1171		
Query 1077	AATTAAC 1084			
Sbjct 1172	AATTAAC 1179			

Figura 27. Alineamiento del gen de la β -1,3-glucanasa clonado, con la secuencia conocida del gen *ZmGlucA*. Query es la secuencia del gen clonado y Sbjct es la secuencia conocida del gen *ZmGlucA*. Los cuadros rojos muestran las diferencias entre ambas secuencias.

Se realizó un análisis BLAST, utilizando la secuencia de cDNA de 1,084 pb de *ZmGlucA*, que mostró que hay al menos 7 secuencias de DNA disponibles en GenBank que mostraron diversas identidades con el gen clonado (Tabla 19). El gen clonado comparte una alta identidad de 99.45% con un cDNA específico de semilla correspondiente al gen *GlucA* (HM641756.1), dos clonas genómicas de este gen (NM_001146860.2, XM_020549540.1) y de 98.17% con *ZmGns* correspondiente a una isoforma básica de β -1,3-glucanasa (HM021761.1; 17 nucleótidos diferentes a nivel DNA y 2 diferencias de aminoácidos a nivel de proteína). Es probable que sean el mismo gen/proteína y las pequeñas diferencias entre estas secuencias se debe a polimorfismos entre los distintos genotipos de maíz.

ZmGlucA también comparte una alta identidad con las glucano endo-1,3- β -glucosidasas GII de sorgo (XM_002459032.2), *Panicum hallii* (XM_025960325.1) y *Setaria Italica* (XM_004971176.4).

Tabla 19. Porcentaje de identidad de *ZmGlucA* clonada con β -1,3-glucanasas de plantas. Se utilizó la herramienta BLAST de NCBI.

Número de acceso	Porcentaje de identidad con <i>GlucA</i> (%)		Cereal
	Secuencia nucleótidos	Secuencia aminoácidos	
NM_001146860.2	99.45	100	<i>Zea mays</i>
<u>HM641756.1</u>	99.45	100	<i>Zea mays</i>
XM_020549540.1	99.44	100	<i>Zea mays</i>
HM021761.1	98.17	99.38	<i>Zea mays</i>
XM_002459032.2	87.90	86.56	<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo)
XM_025960325.1	86.0	84.28	<i>Panicum hallii</i> (Hall's panicgrass)
XM_004971176.4	86.0	82.08	<i>Setaria Italica</i> (moha)

Con los resultados de la secuencia de *ZmGlucA* se diseñaron oligonucleótidos específicos con sitios de corte para *NdeI* y *EcoRI* para la amplificación de un fragmento

de 960 pb que corresponde al cDNA de la forma madura de la β -1,3-glucanasa para la subclonación en pET28b (+) (Fig. 28).

```

1  ACGTTTGCCTCCATTCTACAACCGTGCACTCCATCGGCGTCTGCTACGGCACGCTGGGC
21  N N L P S S S D V V Q L Y R S K G I K G
61  AACAACTGCCGTCCAGCAGCGACGTGGTGAGCTTACAGGTCCAAGGGCATCAAAGGC
41  M R I Y S P D A K A L A A L R N S G I A
121 ATGCGCATCTACTCCCCGACGCCAAAGCCCTCGCGCCCTGCGCAACTCCGGCATCGCG
61  L I L D T G N G G G V L G Q L A R S A S
181 CTCATCCTCGACACCGGCAACGGCGGGCGTCTGGGCCAGCTCGCCAGGAGCGCTCG
81  F A D S W V Q S N V R P Y Y P A V G I K
241 TTCGCGGACTCGTGGGTGCAGAGCAACGTGCGGCCCTACTACCCCGCCGTCGGCATCAAG
101 Y V A V G N E V Q G D D T R S L L P A M
301 TACGTCGCGGTGGGCAACGAGGTGCAGGGCGACGACACGCGCAGCTCCTCCCGGCGATG
121 R N L D A A L A R A G F P G I K C S T S
361 CGCAACTGGACGCCGCCCTGGCGCGCGCCGGCTTCCCGGGCATCAAGTGCTCCACGTGC
141 V R F D V V A N S F P P S S G S F A Q G
421 GTGCGCTTCGACGTGGTCGCAACTCGTTCGCCCTCCAGCGGCTCCTTCGCGCAGGGC
161 Y M A D V A R Y L A G T G A P L L A N V
481 TACATGGCGGACGTGCGCGCTACTGGCCGGCACCGGCGCGCCGCTGCTCGCCAACGTG
181 Y P Y F A Y R D N P R D I S L G Y A T F
541 TACCTTACTTCGCGTACCGGGACAACCCGCGGACATCAGCTGGGCTACGCCACGTT
201 Q P G T T V R D N G N G L N Y N N L F D
601 CAGCCGGGCACCACCGTCAGGGACAACGGCAACGGCCTCAACTACAACAACCTGTTTCGAC
221 A M V D A V V A A L E K A G A P N V R V
661 GCCATGGTGGACGCCGTCTGCGCGGCTCGAGAAGGCCGGCGGCCCAACGTCAAGGTC
241 V V S E S G W P S A G G F G A S V D N A
721 GTCGTGTCCGAGAGCGGCTGGCCCTCGGCCGGCGGCTTCCGGGGCCAGCGTCGACAACGGC
261 R K Y N Q G L I D H V G R G T P K R T G
781 CGGAAATACAACCAGGGACTCATCGACCAGCTCGGCCGCGGCACGCCCAAGAGGACCGGC
281 P L E T F V F A M F N E N Q K G G D P T
841 CCGCTGGAGACCTTCGTCTTCGCCATGTTCAACGAGAACCAGAAGGGCGGCGATCCCACG
301 E K N F G L F Y G N K Q P V Y P I R F N
901 GAGAAGAATTCGGCCTCTTCTACGGCAACAAGCAGCCCGTGTACCCGATCCGGTTCAAC
321 * L R V A D R R N N T S S S I N * P N N
961 TAA TTAAGAGTGGCGGATCGGAGGAATAATACATCTTCATCAATCAATTAACCTAATAAT
341 M L H E * A A A C M W P D L W R S F A I
1021 ATGCTACATGAATAAGCTGCTGCGTGCATGTGGCCGGACTTGTGGAGGAGCTTTGCAATT
361 N
1081 AACT

```

Figura 28. Secuencia del cDNA de *ZmGlucA* clonado. Tamaño de la secuencia: 1,084 pb. Las flechas rojas delimitan el cDNA correspondiente a la forma madura de la β -1,3-glucanasa, tiene un tamaño de 960 pb y codifica 320 residuos de aminoácidos. Región 3' UTR de 124 pb.

C. Clonación direccional de *ZmGlucA* en pET28b (+).

1. Clonación de la forma madura de *ZmGlucA* en pGEM[®]-T Easy.

La forma madura de 960 pb de la secuencia de β -1,3-glucanasa se amplificó a partir del cDNA de *ZmGlucA* clonado en pGEM[®]-T Easy, utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción para *NdeI* y *EcoRI*. Una vez amplificado se ligó al vector pGEM[®]-T Easy y se realizó un PCR confirmativo para verificar la transformación de las colonias seleccionadas de *E. coli* DH5 α (Fig. 29). Para el PCR confirmativo se eligieron también colonias azules como un control negativo, sin embargo, amplificaron a *ZmGlucA* esto puede ser debido a que la inserción del cDNA no abatió la actividad de β -galactosidasa.

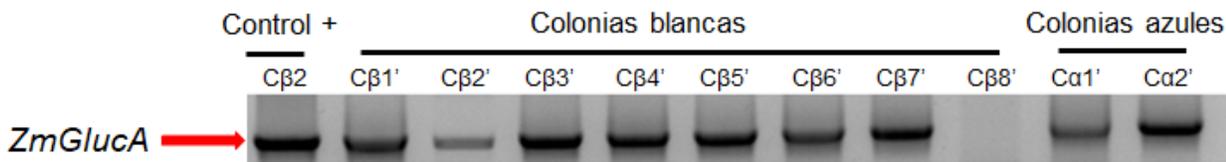


Figura 29. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*. Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA* (Cβ2).

2. Subclonación de la forma madura de *ZmGlucA* en pET28b (+).

El cDNA de la forma madura de la β -1,3-glucanasa clonado en pGEM[®]-T Easy se digirió con *NdeI* y *EcoRI* y se ligó en los sitios correspondientes de pET28b (+). Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α y de las clonas transformantes se verificó la presencia de *ZmGlucA* por PCR (Fig. 30).

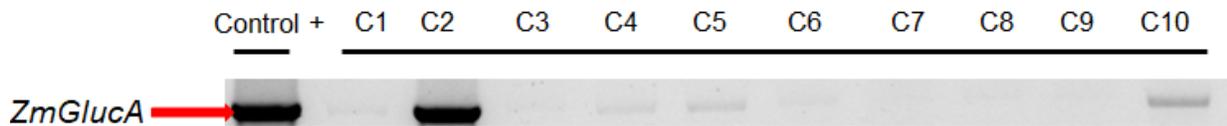


Figura 30. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA*, para verificar la presencia de *ZmGlucA* en colonias transformadas de *E. coli* DH5 α . Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*.

Se eligió a la clona 2 (C2) que amplificó a *ZmGlucA*, para extraer el DNA plasmídico recombinante y corroborar la recombinación entre *ZmGlucA* y pET28b(+) mediante un ensayo de restricción utilizando las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. El resultado de este ensayo se muestra en la Fig. 31 donde se observa una banda de 5,369 pb que corresponde al vector pET28b(+), una banda muy tenue arriba de ésta que podría ser un topoisómero del vector y una banda de 960 pb que corresponde al inserto (*ZmGlucA*). Se extrajo el DNA plasmídico recombinante de esta clona y se mandó a secuenciar con los oligonucleótidos T7- promotor y T7- terminador, los resultados mostraron que la secuencia se encuentra en marco.

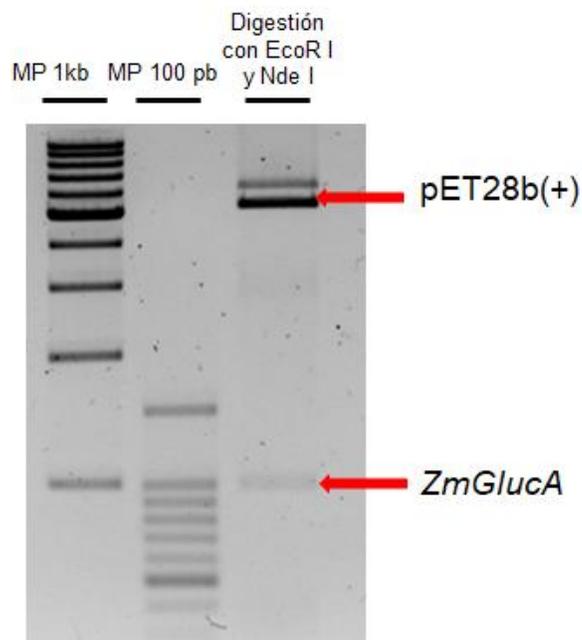


Figura 31. Patrón de digestión del DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA* con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. Gel de agarosa al 1.2%. Se muestra las banda resultantes del ensayo de restricción *ZmGlucA* 960 pb y pET28b(+) 5,369 pb.

Se utilizó el DNA plasmídico recombinante de la clona 2, para transformar células competentes de *E. coli* BL21-RIL para la expresión del gen heterólogo y se realizó un PCR para verificar la recombinación de las colonias transformadas (Fig. 32). Las clonas Ca y Cb se eligieron para sobreexpresar a la proteína recombinante.

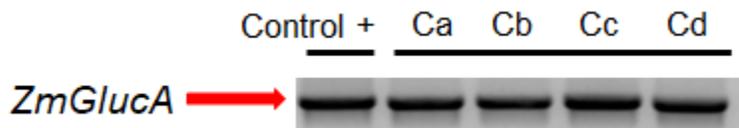


Figura 32. Imagen de gel agarosa al 1.2% con bandas resultantes del PCR a partir de DNA plasmídico pET28b(+)/*ZmGlucA*, para verificar la presencia del gen *ZmGlucA* en las colonias transformadas con pET28b(+)/*ZmGlucA* en la cepa *E. coli* BL21-RIL. Tamaño del Amplicón 960 pb. Control +: Clona recombinante transformada con DNA plasmídico pGEM-T Easy/*ZmGlucA* (Cβ2).

D. Sobreexpresión de *ZmGlucA* recombinante.

Para la inducción de la proteína se utilizaron dos clonas recombinantes (Clona a y b) y un control negativo que sólo contenía el vector pET28b(+), que fueron transformadas en *E. coli* BL21-RIL. Las clonas se crecieron en medio LB con kanamicina a 37°C, una vez que alcanzaron la densidad óptica ($\approx 0.5 - 0.7$) se les adicionó IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactósido 1 mM) y se continuó con la incubación a 37°C y agitación (250 rpm), por 4 horas.

Se lisaron las células mediante sonicación y al extracto obtenido se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford. Se realizó una electroforesis en

poliacrilamida- SDS (15%) y se cargaron aproximadamente entre 2 y 35 μ g de proteína pues hubo mucha variación en la concentración entre las muestras.

La comparación entre los extractos de células de *E. coli* BL21-RIL inducidos y no inducidos reveló la presencia de una proteína abundante de aproximadamente 34 kDa y que no se detectó en los controles negativos, pET28b(+) y pET28b(+) inducido. (Fig. 33).

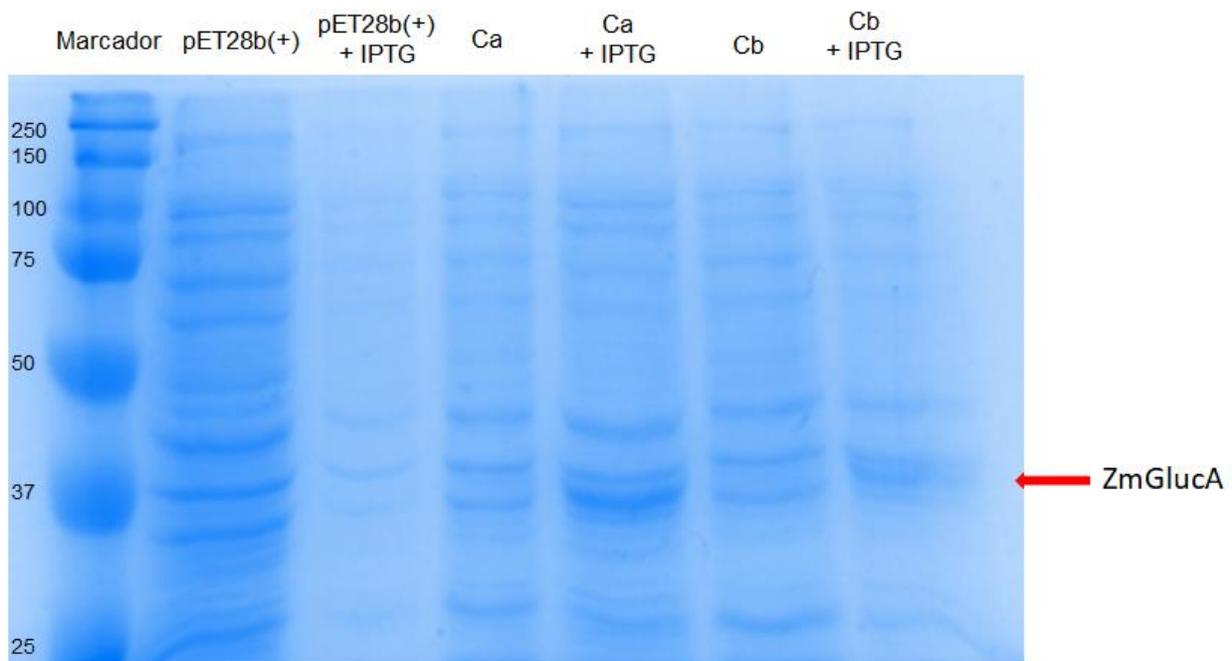


Figura 33. Expresión de ZmGlucA recombinante en *Escherichia coli* BL21-RIL. Electroforesis en poliacrilamida- SDS (15%). Conc. de IPTG 1mM. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Ca y Cb son clonas transformadas con DNA plasmídico recombinante pET28b(+)/ZmGlucA.

E. Identificación de la etiqueta 6X-His en la proteína recombinante mediante Western blot.

Se realizó la identificación de la proteína recombinante que tiene una etiqueta 6X-His mediante Western blot, donde la membrana se incubó con el anticuerpo policlonal His-probe (G-18) que reconoce la secuencia 6X-His en el extremo carboxilo, y

con el segundo anticuerpo Anti-rabbit IgG-conjugado a la HRP, que se une al primer anticuerpo.

La Fig. 34 muestra la presencia de una banda en los extractos de células de *E. coli* BL21-RIL inducidos (Ca y Cb inducidos), que tienen un tamaño aproximado de 34 kDa que corresponde con el tamaño de la β -1,3-glucanasa clonada y que no se encuentra en los controles negativos pET28b(+) y pET28b(+) inducido. También se observa esa misma banda pero de menor intensidad en las muestras de los extractos de células de *E. coli* BL21-RIL sin inducir (Ca y Cb), esto fue debido a un error técnico ya que se cargó el máximo volumen (25 μ L) de las muestras Ca y Cb inducidos en los geles de poliacrilamida-SDS y se pasó parte del volumen de éstas al carril de al lado.

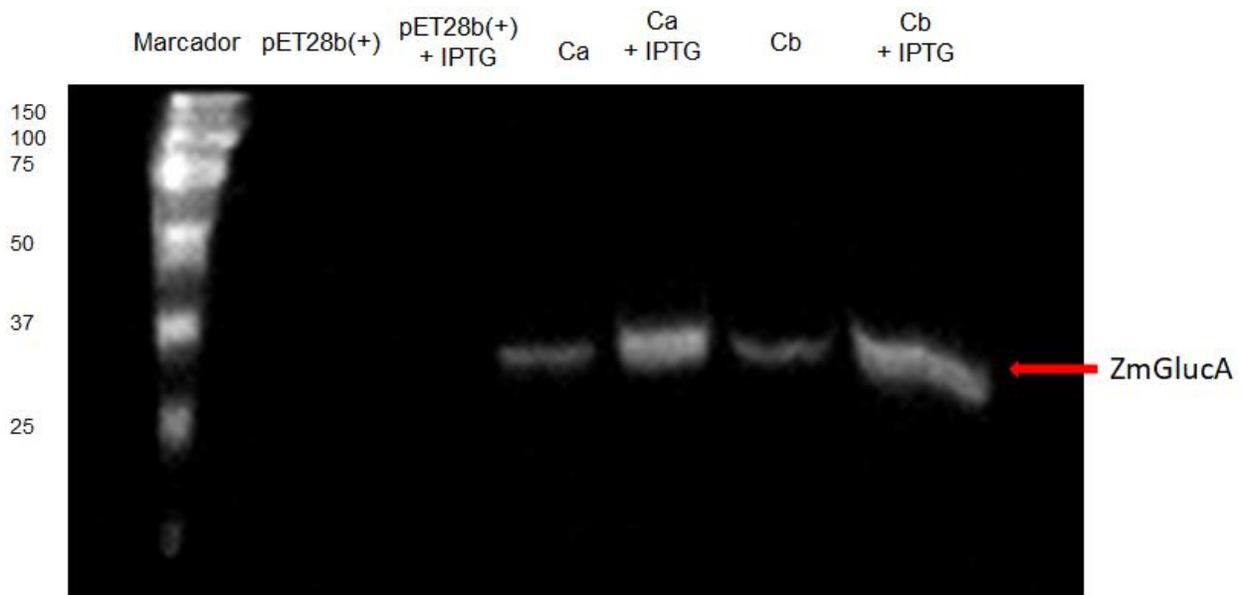


Figura 34. Western blot para la detección de la proteína recombinante ZmGlucA. Los extractos celulares se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 15% y se cargaron aproximadamente 2-35 μ g de proteína, el gel se transfirió a una membrana de PVDF.

VII. Discusión

En este trabajo se aisló el cDNA de una β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) proveniente de RNA de embriones de maíz germinados por 12, 24 y 30 h, conociendo las secuencias parciales de la estructura primaria de la proteína obtenida por purificación bioquímica (Ramos Villegas, 2018). Adicionalmente se estudió el patrón de expresión de *ZmGlucA* durante la germinación y el efecto de la infección por *F. verticillioides* y la presencia de FB1. Asimismo, se clonó el cDNA en un vector para la expresión de la proteína recombinante.

A. Patrón de expresión de *ZmGlucA* de embriones de maíz en respuesta a la infección por *Fusarium verticillioides* y la presencia de fumonisina B1.

1. Papel de las β -1,3-glucanasas en la defensa de las plantas contra patógenos e isoformas básicas como blanco de la FB1.

Las β -1,3-glucanasas forman parte integral de la respuesta de defensa en plantas, pues tienen actividad antifúngica y se inducen en presencia de microorganismos patógenos. Estas hidrolasas pertenecen a la familia PR-2, una de las 19 familias de las proteínas PR (Balasubramanian et al. 2012; Ceasar & Ignacimuthu, 2012). Las β -1,3-glucanasas son eficientes en la respuesta contra patógenos fúngicos al degradar los β -1,3/1,6-glucanos de su pared celular. Además, el resultado de esta actividad enzimática provoca la liberación de oligosacáridos que son percibidos por receptores en la célula vegetal, lo que amplifica aún más la respuesta de defensa del huésped (Zhang et al. 2019; Rose et al. 2002). Algunos patógenos, a su vez, han evolucionado para responder a este ataque al producir inhibidores que suprimen estas enzimas. Por ejemplo, *Phytophthora sojae* secreta una proteína-1 inhibidora de glucanasa (GIP1), cuyo blanco son las endo- β -1,3-glucanasas específicas de soya, lo que resulta en una menor liberación de los oligosacáridos de la pared celular de este patógeno durante el proceso de infección y de esta forma se suprime la respuesta de defensa del huésped (Rose et al. 2002). Asimismo, la fumonisina B1 (FB1) contribuye a la virulencia de *F. verticillioides* en maíz pues se produce en la planta a tiempos tempranos durante la colonización del tejido y ejerce su acción en tres blancos

moleculares: la esfinganina N-acil transferasa, la ATPasa de protones de membrana plasmática y las β -1,3-glucanasas básicas (Galena-Sánchez et al. 2017). Su acción sobre estas hidrolasas de pared celular puede ser determinante en el resultado de la interacción por lo que es relevante identificar cuáles de estas enzimas son susceptibles a la inhibición por la micotoxina y así confirmar su función como efector.

El presente estudio se realizó para profundizar en los niveles de transcritos de una β -1,3-glucanasa durante la germinación de embriones de maíz y en respuesta a la infección por *F. verticillioides* y la FB1. Estudios previos del grupo de trabajo demostraron que en embriones de maíz la imbibición con FB1 20 μ M, produce un efecto dual sobre la actividad total de la β -1,3-glucanasa, pues al menos tres isoformas principales de esta enzima están activas durante la germinación. Cuando se germinaron embriones en presencia de FB1, una isoforma de migración rápida (isoforma I) aumenta a las 24 h y dos isoformas de migración lenta (isoformas II y III) se reducen. Se estimó que el pI de la isoforma I fue de aprox. 5.3, mientras que para las isoformas II y III, estos valores fueron de 8.5 y 9, respectivamente. Una vez identificadas, en experimentos *in vitro* demostraron que la FB1 inhibe a las isoformas básicas de la β -1,3-glucanasa (Sánchez-Rangel et al. 2012). En otro estudio en embriones de maíz se probaron cuatro cepas de *F. verticillioides* que varían en su producción de FB1, donde observaron que la cepa MY3, una alta productora, causó una inhibición del 35% de la actividad total de la β -1,3-glucanasa a las 24 h después de la inoculación (Galeana-Sánchez et al. 2017). Asimismo, Ramos-Villegas (2018) purificó y caracterizó a las β -1,3-glucanasas básicas de maíz que se expresan en las primeras 24 h de germinación y que tienen actividad antifúngica *in vitro* contra dos cepas de *F. verticillioides*. Esta actividad de β -1,3-glucanasa es inhibida por la fumonisina B1 a una concentración >60 μ M. Mediante análisis proteómico se identificó a partir de las fracciones obtenidas de la purificación a tres péptidos correspondientes a una β -1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) que tiene una masa molecular de 35.954 kDa y un pI de 9.38. Estos datos sugieren que la enzima codificada por *ZmGlucA* corresponde a una β -1,3-glucanasa que es sensible a la inhibición por la FB1.

2. Inducción de *ZmGlucA* en embriones de maíz germinados infectados con *F. verticillioides* y en presencia de FB1.

Uno de los objetivos de este trabajo fue estudiar el patrón de expresión del gen *ZmGlucA* en embriones de maíz que codifica una β -1,3-glucanasa básica y que puede ser un blanco de la FB1. Para abordarlo, se embebieron embriones de maíz en presencia de FB1 e infectados por *F. verticillioides* donde se observó la disminución del tamaño de la radícula lo que concuerda con lo observado por Sánchez-Rangel et al. (2012). Este efecto se podría explicar por la acción de la FB1, que inhibe a la ATPasa de protones de membrana plasmática (Gutiérrez-Nájera et al. 2005), cuya función es fundamental para mantener un potencial membranal negativo y un gradiente transmembranal de pH, el cual se requiere para la elongación del tejido (Elmore & Coaker, 2011).

Las β -1,3-glucanasas generalmente se expresan en bajos niveles en la mayoría de los tejidos de plantas, pero cuando éstas son infectadas por hongos, bacterias o virus patógenos, se induce su expresión. Por ejemplo, la infección por *Fusarium culmorum* causa la inducción de dos isoformas básicas de β -1,3-glucanasa de embriones de trigo en germinación (Caruso et al. 1999). También *Glu-1* (codifica una β -1,3-glucanasa básica) de la fruta de azufaiifa (*Ziziphus jujube Mill*) y la *MpGlu* (codifica una β -1,3-glucanasa básica) de plátano (*Musa paradisiaca*) son altamente inducidos por la infección por *Cryptococcus laurentii* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Jin et al. 2007; Tian et al. 2007). Además, las β -1,3-glucanasas parecen expresarse de manera coordinada junto con las quitinasas, esta co-inducción se ha descrito en muchas especies de plantas, incluyendo frijol, tomate, tabaco, maíz, soja, papa y trigo (Li et al. 2001; Cheong et al. 2000; Petruzzelli et al. 1999; Lambais & Mehdy 1998; Bettini et al. 1998; Jach et al. 1995; Vogelsang & Barz, 1993; Mauch et al. 1988). Se encontró que hubo una inducción coordinada de la expresión de una β -1,3-glucanasa y tres isoformas de quitinasas en plántulas de maíz en respuesta a la infección por *F. moniliforme* (Cordero et al. 1994). La *ZmGns* (codifica una β -1,3-glucanasa básica) de maíz se induce drásticamente por el tratamiento con los patógenos bacterianos *Clavibacter michiganensis* subsp. *Nebraskensis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia stewartii* y el patógeno fúngico *Aspergillus flavus*.

Por otro lado el establecimiento de *F. verticillioides* se ve facilitado por la FB1 y en general por las toxinas que produce, siendo estas detectadas de forma directa o indirecta por las proteínas R. A esta respuesta se le llama inmunidad inducida por efectores (ETI, del inglés effector-triggered immunity) e incluye la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la activación de genes de defensa (PRs, fitoalexinas, fitohormonas, etc.) (Perincherry, 2019; Panstruga et al. 2009; Jones & Dangl, 2006). Se cuenta con evidencias de la inducción de proteínas PRs por efectores de patógenos fúngicos; por ejemplo el tratamiento con moniliformina, una micotoxina producida por *F. verticillioides*, induce la acumulación del mRNA de *ZmPR4* en embriones de maíz durante la germinación, este gen codifica una quitinasa de clase II, un miembro de la familia PR-4 de proteínas PR de maíz (Bravo et al. 2003). Además la FB1 induce la expresión del transcrito de PRm que también se induce fuertemente durante la infección por *F. verticillioides* en embriones de maíz durante la germinación, PRm pertenece a la familia PR-1 (Sánchez-Rangel et al. 2012).

En este trabajo encontramos que *ZmGlucA* se indujo tanto por el tratamiento con FB1 como por la infección por la cepa MY3 de *F. verticillioides*. La respuesta a ambos tratamientos se observó a partir de las 24 h, pero bien pudo ser antes. El gen *FUM1*, que codifica una policétido sintasa, fundamental para la producción de la FB1 se expresa durante las primeras horas en la interacción con maíz (18 hpi) y los niveles aumentan constantemente hasta las 30 hpi. Su expresión se correlacionó con la producción de FB1 ya que la toxina se detectó a las 24 hpi ($65,7 \pm 11,6$ ng/g de tejido fresco) y a las 30 hpi ($209,1 \pm 21,4$ ng/g de tejido fresco) (Sánchez-Rangel et al. 2012). Estos resultados apoyan que la producción temprana de FB1 (24 hpi) facilita el proceso de infección de *F. verticillioides* y que puede actuar como un efector e inducir una ETI. Nuestros resultados de inducción indican que la *ZmGlucA* está involucrada en la defensa del huésped contra las invasiones de patógenos. Además el gen no se expresa en embriones secos pero sí a lo largo de la germinación, que es una etapa muy susceptible al ambiente externo e implica numerosos eventos físicos y bioquímicos, como la activación de la transcripción génica. La inducción de proteínas de defensa de las plantas, como las proteínas PR-2 en los tejidos de las semillas en germinación, puede tener un efecto en la reducción de la colonización de patógenos.

B. Clonación y obtención de la proteína recombinante.

1. Características de la secuencia de *ZmGlucA* y homología con otras β -1,3-glucanasas de maíz.

En este estudio, se clonó un fragmento del cDNA de β -1,3-glucanasa de un tamaño de 1,088 pb a partir de embriones de maíz en base a la secuencia conocida de *ZmGlucA*, este fragmento codifica la proteína madura de 320 residuos de aminoácidos con un peso molecular deducido de 34 kDa y un pI de 9.47. El cDNA de *ZmGlucA* (HM641756.1) reportado tiene un tamaño de 1261 pb y codifica una proteína de 339 a.a, su peso molecular calculado es de 35.98 kDa y su pI de 9.73, con un péptido señal de 31 a.a en el extremo N-terminal, esta proteína eventualmente esta destinada a ser secretada en el espacio extracelular (UniProt, 2019). Se hizo un alineamiento del cDNA clonado y el reportado y los resultados arrojaron un porcentaje de identidad del 99.45%, las diferencias a nivel de DNA fueron 6 nucleótidos en la región 3'-UTR por lo que a nivel de proteína el porcentaje de identidad es del 100%, estos resultados sugieren que se trata del mismo gen/proteína.

Los resultados del análisis BLAST mostraron que *ZmGlucA* presenta una alta identidad (98.17%) con otra β -1,3-glucanasa básica de maíz anotada como *ZmGns* (HM021761.1; 17 nucleótidos diferentes a nivel DNA y 2 diferencias de aminoácidos a nivel de proteína). Sin embargo, muestra mayor identidad con la secuencia anotada como (HM641756.1) que comparte 99.38% de identidad con esta proteína, GRMZM2G125032 que parece ser el clon genómico de HM641756.1, ACF83600 que corresponde a una β -1,3-glucanasa putativa y comparte un 98% de identidad con *ZmGns* (Fig. 35; Xie et al. 2014).

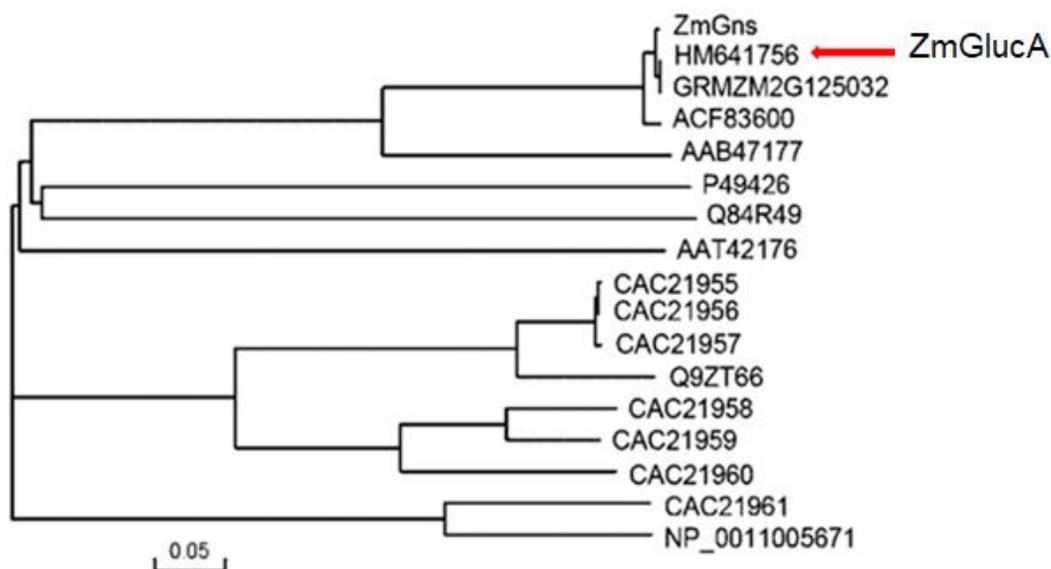


Figura 35. Árbol filogenético basado en la alineación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las glucanasas putativas de maíz. Las secuencias de proteínas se alinearon con el software Clustal X y la estructura filogenética se construyó con el software Treeview (Tomado y modificado de Xie et al. 2014).

2. ZmGlucA recombinante se produce de forma abundante y corresponde a una glucanasa básica.

La proteína recombinante se expresó en un sistema heterólogo de bacteria (*E. coli* BL21-RIL) y se predijo un peso molecular de 34 kDa y un pI de 9.47. Con base en su nivel de identidad, masa molecular estimada y pI, ZmGlucA corresponde a una isoforma básica de β -1,3-glucanasa. Los resultados de la producción de ZmGlucA indican la presencia de una proteína abundante de aproximadamente 34 kDa lo que concuerda con el peso molecular calculado. También se detectó una banda de aprox. 34 kDa con el anticuerpo His-probe (G-18), lo que confirma la producción de la proteína recombinante, aunque esta banda también se observó en las muestras sin inducción pues fue debido a un error técnico ya que se cargó el máximo volumen de las muestras inducidas en los geles y se pasó parte del volumen de estas al carril de al lado, dando

como resultado una banda del mismo tamaño pero de menor intensidad. Se ha reportado que en el maíz, al menos tres proteínas, PR6ma, PR6mb y PRm Bal, se han purificado y mostraron actividades de glucanasa (Nasser et al. 1990). Entre ellos, PRm Bal fue la única glucanasa básica con una masa molecular de 36 kDa. Además, *ZmGns* que comparte una alta identidad (98.17%) con *ZmGlucA*, codifica una glucanasa básica de 338 residuos de aminoácidos con un pI calculado de 9.33 y una masa molecular de 35.9 kDa y tiene un alto nivel de expresión en el estigma, pero también se expresa en la semilla, como es el caso de *ZmGlucA* (Xie et al. 2014). El hecho de que *ZmGns* tenga un alto nivel de expresión en el estigma nos habla de que las β -1,3-glucanasas pueden ayudar al maíz a montar una defensa exitosa contra la infección por *F. verticillioides* y patógenos fúngicos a través del estigma, pues es una de sus vías principales de infección (Payne, 1998). Asimismo las β -1,3-glucanasas pueden participar en procesos fisiológicos y de desarrollo en la planta no infectada, por ejemplo en la germinación de semillas; debilitan el endospermo mediante la digestión del material de la pared celular y esto promueve la protrusión de la radícula, signo distintivo de la germinación. En el desarrollo del polen, pues para que se produzcan granos de polen maduros, la calosa (β -1,3-glucano en plantas) que cubre a las microesporas se tiene que degradar por la acción de esta enzima y así las microesporas se liberan en el lóculo de la antera, donde se convierten en granos de polen maduros (Leubner-Metzger & Meins, 1999; Leubner-Metzger et al. 1995; Vögeli-Lange et al. 1994).

En resumen se estudió el patrón de expresión del gen *ZmGlucA* en embriones de maíz. *ZmGlucA* se indujo tanto por el tratamiento con FB1 como por la infección por la cepa MY3 de *F. verticillioides* a partir de las 24 h. Se observó una disminución en el tamaño de la radícula de los embriones de maíz embebidos en presencia de FB1 e infectados por *F. verticillioides*. Se clonó un fragmento del cDNA de *ZmGlucA* a partir de las secuencias parciales de la proteína nativa semipurificada y se obtuvo a *ZmGlucA* recombinante. Se detectó a la proteína recombinante *ZmGlucA*- His 6X por Western blot. En estudios futuros se pretende purificarla y determinar su actividad enzimática, así como evaluar dicha actividad enzimática frente a la FB1 y *F. verticillioides*.

VIII. Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

- Se indujo la expresión del gen *ZmGlucA* en embriones de maíz, en respuesta a la infección por *Fusarium verticillioides* y a la presencia de FB1.
- Se clonó el cDNA correspondiente a *ZmGlucA* a partir de embriones de maíz y se determinaron las condiciones óptimas para su expresión en un sistema heterólogo de bacteria.
- Se obtuvo una proteína abundante de aproximadamente 34 kDa lo que concuerda con el peso molecular deducido de *ZmGlucA*, se expresó la proteína recombinante *ZmGlucA*- His 6X y se detectó por Western blot

Perspectivas

- Purificar la proteína recombinante *ZmGlucA*- His 6X.
- Determinar la actividad enzimática de la proteína recombinante.
- Caracterizar la actividad enzimática de la proteína recombinante frente a la FB1 y *F. verticillioides*.
- Evaluar el efecto inhibitorio de *ZmGlucA* recombinante en *F. verticillioides*.

IX. Bibliografía

- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Riley, R. T. (1994). Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol.*, 106(3), 1085–1093. doi:10.1104/pp.106.3.1085.
- Abel, S., Gelderblom, W.C.A., (1998). Oxidative damage and fumonisin B1-induced toxicity in primary rat hepatocytes and rat liver in vivo. *Toxicology* 131, 121–131. [https:// doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00123-1).
- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. *El maíz en Cuba. Cultivos tropicales*, 30(2).
- Anfoka, G. & Buchenauer, H. (1997). Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*;50(2):85-101.
- Arias, S. L., Mary, V. S., Otaiza, S. N., Wunderlin, D. A., Rubinstein, H. R., & Theumer, M. G. (2016). Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B1-watered maize seedlings. *Phytochemistry*, 125, 54–64. doi:10.1016/j.phytochem.2016.02.006.
- Arora, R., Kumar, A., Singh, I.K., et al. (2019). Pathogenesis related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans. *Int. J. Biol. Macromol.* S0141-8130(19)33972-8. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.11.223.
- Aubert, A., Marion, J., Boulogne, C., Bourge, M., Abreu, S., Bellec, Y., Faure, J.D. & Satiat Jeunemaitre, B. (2011). Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J*, 65:958-971.
- Bacon, C.W., Marijanovic, D.R., Norred, W.P. & Hinton, D.M. (1989). Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2745-2748.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. & Leslie, J.F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4039-4043.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., Sakthivel, N. (2012). Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against

- phytopathogenic fungi. *Biotechnol. Lett.* 34, 1983–1990, <https://doi.org/10.1007/s10529-0121012-6>.
- Beffa, R.S., Neuhaus, J.M., Meins, F. Jr. (1993). Physiological compensation in antisense transformants: Specific induction of an ersatz glucan endo-1,3- β -glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90:8792-8796.
- Berberich, T., Sugawara, K., Harada, M., & Kusano, T. (1995). Molecular cloning, characterization and expression of an elongation factor 1 α gene in maize. *Plant Mol. Biol.*, 29(3), 611–615. doi:10.1007/bf00020988.
- Bettini, P., Cosi E., Pellegrini, M. G., Turbanti, L., Vendramin, G.G., Buiatti, M. (1998). Modification of competence for in vitro response to *Fusarium oxysporum* in tomato cells, III. PR-Protein gene expression and ethylene evolution in tomato cell lines transgenic for phytohormone-related bacterial genes. *Theor. Appl. Genet.* 98: 575-583.
- Bewley, J.D. & Black, M. (1994). *Seeds. Physiology of development and germination.* New York: Plenum Press.
- Blacutt, Alex A., Gold, Scott E., Voss, Kenneth A., Glenn, Minglu Gaoy Anthony, E. (2018). *Fusarium verticillioides: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize.* *Phytopathology*, 108(3), 312–326. doi:10.1094/phyto-06-17-0203-rvw.
- Boller, T. (1985). Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. In: Key, J. L., and Kosuge, T., Eds. *Cellular and molecular biology of plant stress.* Liss, New York, p. 247-262.
- Bol, J.F., Linthorst J.M., Cornelissen B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection, *Annu. Rev. Phytopathol.* 28 113–138.
- Botha, F.C., Potgieter, G.P., & Botha, A.M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *J. Plant Growth. Regul.* 11,211-224.
- Bowles, D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59:873-907.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bravo, J. M., Campo, S., Murillo, I., Coca, M., & San Segundo, B. (2003). Fungus- and wound-induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant. Mol. Biol.*, 52(4), 745–759. doi:10.1023/a:1025016416951.
- Bucciaglia, P.A. & Smith, A.G. (1994). Cloning and characterization of Tag1, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Mol. Biol.* 24:903-914.
- Burge, R.M. & Duensing, W.J. (1989). Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World* 34: 535-538.
- Cacas, J.L., Furt, F., Le, Guedard, M., Schmitter, J.M., Bure, C., Gerbeau Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.J., Simon-Plas, F. & Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Prog. Lipid. Res.*, 51:272-299.
- Caruso, C., Chilosi, G., Caporale, C., Leonardi, L., Bertini, L., Magro, P., & Buonocore, V. (1999). Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.*, 140(1), 87–97. doi:10.1016/s0168-9452(98)00199-x.
- Ceasar, S.A., Ignacimuthu, S. (2012). Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. *Biotechnol. Lett.* 34, 995–1002 <https://doi.org/10.1007/s10529-012-0871-1>.
- Chao D.Y., Gable K., Chen M., Baxter I., Dietrich C.R., Cahoon E.B., Guerinot M.L., Lahner B., Lu S., Markham J.E. et al. (2011). Sphingolipids in the root play an important role in regulating the leaf ionome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23:1061-1081.
- Cheong, Y.H., Kim, C. Y., Chun, H. J., Moon, B. C., Park, H.C., Kim, J.K., Lee, S.H., Han, C. D., Lee, S. Y., Cho, M. J. (2000). Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. *Plant Sci.* 154: 71-81.

- Collinge, D.B., Gregersen, P., Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Cordero, M.J., Raventos, D., San Segundo, B. (1994). Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds, Mol. Plant-Microbe Interact. 7, 23–31.
- Deacon, J.W. (1997). Modern Mycology (Blackwell, Boston).
- Delaney, T.P. (1997). Genetic dissection of acquired resistance to disease. Plant Physiol. 113: 5-12.
- Desjardins, A.E. (2006). *Fusarium* Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology. St Paul, MN, The American Phytopathological Society. 260 pp.
- Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelson, T.C. & Leslie, J.F. (1995). Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 61, 79-86.
- Desjardins, A.E. & Plattner, R.D. (2000). Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. J. Agric. Food Chem. 48, 5773-5780.
- de Bruijn, W.J.C., Gruppen, H., & Vincken, J.P. (2018). Structure and biosynthesis of benzoxazinoids: Plant defence metabolites with potential as antimicrobial scaffolds. Phytochemistry, 155:233–243.
- de la Torre-Hernández, M.E, Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin-Synthesis and function in the interaction *Fusarium verticillioides*-maize. TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol. Vol. 17, No. 1.
- de la Torre-Hernández, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves Fernández, N., Cruz-Ortega, R. & Plasencia, J. (2010). Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. Physiol. Mol. Plant Pathol. 74, 337–345.

- Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1990). Molecular communications in interactions between plants and microbial pathogens, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41 339–367.
- Doehlert, D.C., Knutson, C.C. & Vesonder, R.F. (1994). Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127, 117-121.
- Dong J.Z. & Dunstan D.I. (1997). Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*; 201(2):189-194.
- Downie, A.B. (2001). Seed maturation, germination, and dormancy. In: Bhojwani S.S., Soh WY. (eds) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Springer, Dordrecht, p. 396-397.
- Doxey, A.C., Yaish, M.W., Moffatt, B.A., Griffith, M., McConkey, B.J. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1045–1055.
- Duncan, K.E. & Howard, R.J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 6-16.
- Ebrahim, S., Usha, K. & Singh, B. (2011). Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* A. Méndez-Vilas (Ed.)
- Elmore, J.M. & Coaker, G. (2011). The role of plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant.* 4, 416-427.
- FAO, (1993). “El maíz en la nutrición humana”. *Alimentación y nutrición*, N°25, 86 AGRIS: S01. JK última visita: 21/01/2020.
- Ferreira, R. et al. (2007). The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 8, 677-700.
- Flach, J., Pilet, P.-E., & Jollès, P. (1992). What’s new in chitinase research? *Experientia*, 48(8), 701–716. doi:10.1007/bf02124285.
- Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., Leisner, J. J. (2013). Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as

virulence factors. *Microbiology*, 159(Pt_5), 833–847. doi:10.1099/mic.0.051839-0.

Fuentes-Silva, D. & Rodríguez-Romero, A. (2006). Endo- β -1,3-glucanasas reconocidas por anticuerpos tipo IgE de sueros de pacientes alérgicos. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*, Vol. 15, Núm. 1.

Fulcher, R.G., Mc Cully, M.E., Setterfield, G., Sutherland, J. (1976). β -1,3-Glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. *Can J. Bot.*, 54:459-542.

Galeana-Sánchez, E.A. (2014). Asociación entre la producción de fumonisina B1 y la virulencia de *Fusarium verticillioides* en plántulas de maíz. Tesis de licenciatura UNAM, FQ.

Galeana-Sánchez, E., Sánchez-Rangel, D., de la Torre-Hernández, M. E., Nájera-Martínez, M., Ramos-Villegas, P., & Plasencia, J. (2017). 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. doi:10.1016/j.pmpp.2017.07.003.

Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Theil, P.G., Horak, R.M., Vlegaar, R. & Kriek, N.P.J. (1988). Fumonisins—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806–1811.

Gilbertson, R.L., Brown, M. Jr., Ruppel, E.G. & Capinera, J.L. (1986). Association of corn stalk rot *Fusarium* spp. and western corn rootworm beetles in Colorado. *Phytopathology*.76, 1309-1314.

Glenn, A.E., et al. (2008). Transformation mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 87–97.

Guan, S.P., Mok, Y.K., Koo, K.N., Chu, K.L., & Wong, W.S. (2009). Chitinases: Biomarkers for Human Diseases. *Protein Pept. Lett.*, 16(5), 490–498. doi:10.2174/092986609788167842.

Gutiérrez-Nájera, N., et al. (2005). Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221, 589–596.

- Gutiérrez-Nájera, N., Saucedo-García, M., Noyola-Martínez, L., Vázquez-Vázquez, C., Palacios-Bahena, S., Carmona-Salazar, L., Gavilanes-Ruiz, M. (2020). Sphingolipid effects on the plasma membrane produced by addition of fumonisin B1 to maize embryos. *Plants*, 9(2), 150.
- Ham, K.S., Kauffmann, S., Albersheim, P., Darvill, A.G. (1991). Host-pathogen interactions; A soybean pathogenesis-related protein with β -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat stable fragments from fungal walls. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 545-552.
- Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., Hilbert, J.L. (1998). Extracellular β -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta*; 205(1):56-63.
- Hinton, D.M. & Pressey, R. (1980). Glucanase in fruits and vegetables. *J. Amer. Soc Hort. Sci.*; 105:499-502.
- Hla, T. & Dannenberg, A.J. (2012). Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metabol.* 16, 420-434.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8: 97109.
- Jin, X., Feng, D., Wang, H., & Wang, J. (2007). A novel tissue-specific plantain β -1,3-glucanase gene that is regulated in response to infection by *Fusarium oxysporum* fsp. *cubense*. *Biotechnol. Lett.*, 29(9), 1431–1437. doi:10.1007/s10529-007-9403-9.
- Jones, D. A., & Takemoto, D. (2004). Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr. Opin. Immunol.*, 16(1), 48–62. doi:10.1016/j.coi.2003.11.016.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- Joosten, M.H.A.J. & de Wit, P.J.G.M. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as β -1,3-glucanases and chitinases. *Plant Physiol.* 89, 945-951.

- Jugenheimer, R.W. (1988). Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México, p.841.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. & Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, p.21.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987). Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have β -1,3-glucanase activity. EMBO J. 6, 3209-3212.
- Kedera, C.J., Leslie, J.F. & Claflin, L.E. (1994). Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. Phytopathology 84, 603-607.
- Keefe, D., Hinz, U., Meins, F. Jr. (1990). The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. Planta; 182(1):43-51.
- Keen, N.T. & Yoshikawa, M. (1983). β -1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungal cell walls. Plant Physiol. 7: 460-465.
- Kim, S.H., Singh, M.P., Sharma, C., Kang, S.C., (2018). Fumonisin B1 actuates oxidative stress-associated colonic damage via apoptosis and autophagy activation in murine model. J. Biochem. Mol. Toxicol. 32, e22161. <https://doi.org/10.1002/jbt.22161>.
- Kim, H. & Woloshuk, C.P. (2008). Role of *AREA*, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. Fungal Genet. Biol. 45, 947-953.
- Kim, W.G., Oh, I.S., Yu, S.H., Park, J.S. (1984). *Fusarium moniliforme* detected in seeds and its pathological significance. Korean J. Mycol. 12:105– 110.
- Klarzynski O., Plesse B., Joubert J.M., Yvin J.C., Kopp M., Kloareg B., Fritig B. (2000). Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. Plant Physiol. 124: 1027-1037.

- Kobayashi, T., Uchimura, K., Kubota, T., Nunoura, T., Deguchi, S. (2016). Biochemical and genetic characterization of β -1,3 glucanase from a deep subseafloor *Laceyella putida*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 203–214.
- Kusaykin, M.I., Belik, A.A., Kovalchuk, S.N., Dmitrenok, P.S., Rasskazov, V.A., Isakov, V.V., Zvyagintseva, T.N. (2017). A new recombinant endo-1,3- β -D-glucanase from the marine bacterium *Formosa algae* KMM 3553: enzyme characteristics and transglycosylation products analysis. World J. Microbiol. Biotechnol. 33, 40.
- Lambais, M.R.; Mehdy, M.C. (1998). Spatial distribution of chitinases and β -1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. New Phytol. 140: 33-42.
- Lamprecht, S.C., et al. Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato (1994). Phytopathology 84, 383-391.
- Lawrence, C.B., Joosten, M.H.A.J., Tuzun, S. (1996). Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol.; 48(6):361-377.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 6750-6754.
- Leslie, J.F. (1995) *Gibberella fujikuroi*—available populations and variable traits. Can J. Bot. 73: S282–S291.
- Leslie, J.F & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual (Blackwell Publishing, Ames). 1st Edition.
- Leubner-Metzger, G. & Meins, F. (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2) in Pathogenesis-related proteins in plants (eds. in Datta, S.K. & Muthukrishnan, S.) 49–76 (CRC Press, Boca Rat).
- Leubner-Metzger G., Fründt C., Vögeli-Lange R., Meins F. Jr. (1995). Class I β -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. Plant Physiol. 109:751-759

- Li, W.L., Faris, J.D., Muthukrishnan, S., Liu, D.J., Chen, P.D., Gill, B.S. (2001). Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor. Appl. Genet.* 102: 353362.
- Linthorst, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 113–150.
- Liu, X., Fan, L., Yin, S., Chen, H., & Hu, H. (2019). Molecular mechanisms of fumonisin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2019.06.009.
- Lotan, T., Ori, N., Fluhr, R. (1989). Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. *Plant Cell*;1:881-887.
- Lusso, M. & Kuc, J. (1996). The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for β -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*; 49:267-283.
- Madriz Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63 p. 22 - 32.
- Marín, S.V., Sanchis-Vinas, I., Canela, R. & Magan, N. (1995). Effect on water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 298-301.
- Martínez Manrique, E. & Jiménez Vera, V. (2013). Maíz (*Zea mays*). <http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/>, última visita 01/11/19.
- Martínez-Fraca, F. J. (2019). Estudios *in planta* del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes reguladores y estructurales de la biosíntesis de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. UNAM, FQ.
- Mauch, F., Hadwiger, L.A., Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue I. Purification and characterization of two chitinases and two beta-1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87: 325-333.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942.

- Meikle, P.J., Bonig, I., Hoogenraad, N.J., Clarke, A.E., Stone, B.A. (1991). The location of (1-3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana glauca* using a (1-3)- β glucan-specific monoclonal antibody. *Planta* 185:1-8.
- Meins, F. Jr, Neuhaus, J.M., Sperisen, C., Ryals, J. (1992). The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In: Boller T, Meins F Jr, eds. *Genes Involved in Plant Defense*. Vienna, New York: SpringerVerlag: 245-282.
- Midoro-Horiuti, T., Brooks, E. G & Goldblum, R. M. (2001). "Pathogenesis -related proteins of plants as allergens," *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, vol. 87, no. 4. pp. 261 –271.
- Mobio, T.A., Baudrimont, I., Sanni, A., Shier, T.W., Saboureau, D., Dano, S.D., Ueno, Y., Steyn, P.S., Creppy, E.E., (2000). Prevention by vitamin E of DNA fragmentation and apoptosis induced by fumonisin B1 in C6 glioma cells. *Arch. Toxicol.* 74, 112–119.
- Moretti, A. (2017). *Mycotoxigenic Fungi Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* 1542. En: <http://www.springer.com/series/7651>.
- Munkvold, G.P. & Desjardins, A.E. (1997). Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81, 556-565.
- Munkvold, G.P., McGee, D.C. & Cariton, W.M. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology.* 87, 209-217.
- Müller, S., Dekant, W., Mally, A., (2012). Fumonisin B1 and the kidney: Modes of action for renal tumor formation by fumonisin B1 in rodents. *Food Chem. Toxicol.* 50, 3833–3846. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.053>.
- Murillo, I., Cavallarin, L. & San Segundo, B. (1999). Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology.* 89, 737-747.
- Musser, S.M. & Plattner, R.D., (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1169–1173.

- Nasser, W., de Tapia, M., & Burkard, G. (1990). Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of 1,3- β -glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 36(1), 1–14. doi:10.1016/0885-5765(90)90087-e.
- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., Ohashi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* 1998; 39: 500-507.
- O'Donnell, K. et al. (2013). 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.
- Okinaka, Y., Mimori, K., Takeo, K., Kitamura, S., Takeuchi, Y., Yamaoka, N., Yoshikawa, M. (1995). A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol.*; 109:839-845.
- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., & Weinert, J. (2017). *Fusarium* diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Res.*, 33(3), 167–182. doi:10.1007/s12550-017-0277-y.
- Ori, N., Sessa, G., Lotan, T., Himmelhoch, S., Fluhr, R. (1990). A major stylar matrix polypeptide (Sp41) is a member of the pathogenesis-related proteins superclass. *EMBO J*; 9(11):3429-3436.
- Paliwal, R. L., Granados, G., Lafitte, H. R., Violic, A.,D. y Marathée, J. P. (2001). El maíz en los trópicos. Mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal 28. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- Pan, S.Q., Ye, X.S., Kuc, J. (1989). Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. *Anal. Biochem.* 182: 136-140.

- Panstruga, R., Parker, J. E., & Schulze-Lefert, P. (2009). SnapShot: Plant Immune Response Pathways. *Cell*, 136(5), 978.e1–978.e3. doi:10.1016/j.cell.2009.02.020.
- Payne, G.A. (1998). Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. In: Sinha KK, Bhatnagar D, eds. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 279–306.
- Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Goy, P.A., Moyer M., Harper A., Meins F. Jr, Ryals J. (1990). Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Mol. Biol.*;15(6):797-808.
- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., & Stępień, L. (2019). *Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins*. 11, 664. <https://doi.org/10.3390/toxins11110664>.
- Petruzzelli, L., Kunz, C., Waldvogel, R., Meins, F., Leubner-Metzger, G. (1999). Distinct ethylene and tissue-specific regulation of β -1,3 glucanases and chitinases during pea seed germination. *Planta*. 209:195-201.
- Picot, A., et al. (2010). Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 221-231.
- Pitt John I. & Hocking Ailsa D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer, p. 120-121.
- Proctor, R. H., Busman, M., Seo, J.-A., Lee, Y. W., & Plattner, R. D. (2008). A fumonisin biosynthetic gene cluster in *Fusarium oxysporum* strain O-1890 and the genetic basis for B versus C fumonisin production. *Fungal Genet. Biol.*, 45(6), 1016–1026. doi:10.1016/j.fgb.2008.02.004.
- Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busaman, M. & Butchko, R. (2006). Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J. Agric. Food Chem.*54, 2424-2430.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. & Desjardins, A.E. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 237-249.

- Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. & Hohn, T.M. (1999). A poliketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27, 100-112.
- Rabie, C.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Lübben, A. & Vlegaar, R. (1982). Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 517-521.
- Rahar, S., Swami, G., Nagpal, N., Nagpal, M., & Singh, G. (2011). Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *JAPTR*, 2(2), 94. doi:10.4103/2231-4040.82953.
- Ramos-Villegas P.V. (2018). Caracterización de las β -1,3-glucanasas de maíz sensibles a inhibición por la micotoxina fumonisina B1. Tesis de licenciatura UNAM. p. 12.
- Reyes C., P. (1990). El maíz y su cultivo. AGT-EDITOR S.A. México, D.F.
- Riley, R. T., Enongene, E., Voss, K. A., Norred, W. P., Meredith, F. I., Sharma, R. P., Merrill, A. H. (2001). Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *EHP*, 109 (suppl 2), 301–308. doi:10.1289/ehp.01109s2301.
- Roggen H.P., Stanley R.G. (1969). Cell wall hydrolyzing enzymes in wall formation as measured by pollen-tube extension. *Planta* 84:295-303.
- Roncero, C. & Vázquez de Aldana, C.R. (2019) Glucanases and Chitinases. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rose, J.K.C., Ham, K.S., Darvill, A.G., Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counter defense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* 14:1329–1345.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*.8: 1809-1819.
- Ryland, L.K., Fox, T.E., Liu, X., Loughran, T.P. & Kester, M. (2011). Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Canc. Biol. Therap.* 11, 138-149.
- SAGARPA, (2017). Maíz grano blanco y amarillo mexicano. Planeación Agrícola nacional 2017-2030. p. 4.
- SAGARPA & SIAP, (2018). Atlas agroalimentario 2012-2018. www.gob.mx/siap, última visita: 01/12/19.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. M. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez Linares, L., Gavilanes Ruíz, M., Díaz Pontones, D., Guzmán Chávez, F., Calzada Alejo, V., Zurita Villegas, V., Luna Loaiza, V., Moreno Sánchez, R., Bernal Lugo, I. & Sánchez Nieto, S. (2012). Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J. Exp. Bot.* 63: 4513 - 4514.
- Sánchez Ortega, I. (2014). "Maíz I (*Zea mays*)". *Reduca (Biología). Serie Botánica.* 7 (2), p.151-171.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan Badillo, A. & Plasencia, J. (2005). Fumonisin production by *F. verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric Food Chem.* 53, 8565-71.
- Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S. & Plasencia, J. (2012). Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3 glucanase activities involved in defense response. *Planta* 235, 965-978
- Sagaram, U.S., Butchko, R.A.E. & Shim, W.B. (2006). The putative monomeric G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* 7, 381–389.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C. (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101:857-863.
- Sels, J., Mathys, J., de Coninck, B., Cammue, B. & Bolle, M. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.*, 46:941-950.
- Seo, J.A., Proctor, R.H. & Plattner, R.D. (2001). Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 34, 155-165.
- Shahidi, F. & Abuzaytoun, R., (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 93-135.

- Sharp, J.K., Valent, B., Albersheim, P. (1984). Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259:11312-11320.
- Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Burger, H.M., Somdyala, N.I.M., Rheeder, J.P., Westhuizen, L. van der, Gatyeni, P. and van Schalkwyk, D.J. (2007). Exposure assessment for fumonisins in the former Transkei region of South Africa. *Food Addit. Contam.* 24: 621–629.
- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau, P., Pissot P., Mongrand, S. (2011). An update on plant membrane rafts. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14:642-649.
- Singh, M.P., Kang, S.C., (2017). Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation attenuates fumonisin B1 induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* 110, 371–382. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.054>.
- Sobek, E. A., & Munkvold, G.P. (1999). European Corn Borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae as vectors of *Fusarium moniliforme*, causing kernel rot and symptomless infection of maize kernels. *J. Econ. Entomol.* 92:503-509.
- Soriano, J.M., González, L., Catalá, A.I., (2005). Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog. Lipid Res.* 44, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.09.001>. S.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S., Heinz, E. (2005). Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol. Biochem.*, 43:1031-1038.
- Sticher, L., Hinz, U., Meyer, A.D., Meins F. Jr. (1992). Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta*; 188(4):559- 565.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. (1993). Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie.*, 75(8), 687–706.
- Subbanna, A. R. N. S., Rajasekhara, H., Stanley, J., Mishra, K. K., & Pattanayak, A. (2018). Pesticidal perspectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. *Soil Biol. Biochem.* 116, 52–66.
- Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., van Schalkwyk, D.J. and Koch, K.R. (1990). Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in

- corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1900–1903.
- Synytsya, A., Novak, M. (2014). Structural analysis of glucans. *Ann. Transl. Med.*, 2, 17. PubMed.
- Synytsya, A., Novak, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr. Polym.* 92, 792–809.
- Tamura, M., Mochizuki, N., Nagatomi, Y., Harayama, K., Toriba, A., & Hayakawa, K. (2015). Identification and Quantification of Fumonisin A1, A2, and A3 in Corn by High-Resolution Liquid Chromatography-Orbitrap Mass Spectrometry. *Toxins*, 7(2), 582–592. doi:10.3390/toxins7020582.
- Tapia, M. E. & Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú. Lima.
- Tian, S. P., Yao, H. J., Deng, X., Xu, X. B., Qin, G. Z., & Chan, Z. L. (2007). Characterization and expression of β -1,3-glucanase genes in *Jujube* fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 97(3), 260–268. doi:10.1094/phyto-97-3-0260.
- Tjellstrom, H., Hellgren, L.I., Wieslander, A., Sandelius, A.S. (2010). Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J.*, 24:1128-1138.
- UniProt, (2019). Signal peptide. <https://www.uniprot.org/help/signal>, última visita: 22/04/21.
- van Asch, M.A.J., Rijkenberg, F.H.J. & Coutinho, T.A. (1992). Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin, and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology* 82, 1330-1332.
- Van den Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M., Vandekerckhove, J. (1989). Characterization of vacuolar and extracellular β (1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ;86:2673-2677

- Van Loon, L.C. & Van Strien, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97.
- Van Loon, L.C. & Van Kammen, R.T. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.*;12:245-264.
- Vogelsang, R., Barz, W. (1993). Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta*. 189: 60-69.
- Vögeli-Lange R., Fründt C., Hart C.M., Beffa R., Nagy F., Meins F. Jr. (1994). Evidence for a role of β -1,3-glucanase in dicot seed germination. *Plant J.*; 5(2):273-278.
- Wang, X., Wu, Q., Wan, D., Liu, Q., Chen, D., Liu, Z., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Anadon, A. & Yuan, Z., (2016). Fumonisin: Oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Arch. Toxicol.* 90, 81–101. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1604-8>.
- Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., Merrill, A.H. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 5; 266: 14486-14490.
- Ward, E.R., Payne, G.B., Moyer, M.B., Williams, S.C., Dincher, S.S., Sharkey, K.C., Beck, J.J., Taylor, H.T., Ahi-Goy, P., Meins, F. Jr, Ryals, J.A. (1991). Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection. *Plant Physiol* ; 96(2):390-397.
- Waterkeyn, L. Sur. (1967). l'existece d'un "stade callosique" présenté par la paroi cellulaire, au cours de la cytokinèse. *C R Acad. Sci. Paris D.* 265:1792- 1794.
- Watson, S.A. (1987). Structure and composition. En S.A. Watson & P.E. Ramstad. eds. *Corn: chemistry and technology*, p. 53-82. St Paul, EE.UU., Am. Assoc. Cereal Chem.

- White, F., Kramer, K.J., Johnson, L., Muthukrishnan, S., (1997). Chitinases for insect control. In: Koziel, M., Carozzi, N. (Eds.), *Advances in Insect Control, the Role of Transgenic Plants*. CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-0-7484-0417-9.
- Wilkes, H. G. & Goodman, M. M. (1995). Mystery and missing links: The origin of maize. *Maize Genetics Resources*. Taba, S (Eds.). Maize Program Special Report. México,D.F. CIMMYT.
- Williams, L. D., Glenn, A. E., Zimeri, A. M., Bacon, C. W., Smith, M. A., & Riley, R. T. (2007). Fumonisin Disruption of Ceramide Biosynthesis in Maize Roots and the Effects on Plant Development and *Fusarium verticillioides*-Induced Seedling Disease. *J. Agri. Food Chem.*, 55(8), 2937–2946. doi:10.1021/jf0635614.
- Wu, Q., Dou, X., Wang, Q., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2018). Isolation of β -1,3-Glucanase-Producing Microorganisms from *Poria cocos* Cultivation Soil via Molecular Biology. *Molecules*, 23(7), 1555. doi:10.3390/molecules23071555.
- Xie, Y. R., Raruang, Y., Chen, Z. Y., Brown, R. L., & Cleveland, T. E. (2014). *ZmGns*, a maize class I β -1,3-glucanase, is induced by biotic stresses and possesses strong antimicrobial activity. *J. Integr. Plant Biol.*, 57(3), 271–283. doi:10.1111/jipb.12286.
- Yang, H., Richter, G.L., Wang, X., Mlodzinska, E., Carraro, N., Ma, G., Jenness, M., Chao, D.Y., Peer, W.A., Murphy, A.S. (2013). Sterols and sphingolipids differentially function in trafficking of the *Arabidopsis* ABCB19 auxin transporter. *Plant J.*
- Yeung, J.M., Wang, H.Y., Prelusky, D.B., (1996). Fumonisin B1 induces protein kinase C translocation via direct interaction with diacylglycerol binding site. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 178–184. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(96\)80023-8](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(96)80023-8).
- Yin, S., Guo, X., Li, J., Fan, L., Hu, H., (2016). Fumonisin B1 induces autophagic cell death via activation of ERN1-MAPK8/9/10 pathway in monkey kidney MARC-145 cells. *Arch. Toxicol.* 90, 985–996. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1514-9>.

- Yoshikawa, M., Tsuda, M., Takeuchi, Y. (1993). Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwiss*; 80(9):417-420.
- Zhang, S.B., Zhang, W.J., Zhai, H.C., Lv, Y.Y., Cai, J.P., Jia, F., Hu, Y.S. (2019). Expression of a wheat β -1,3-glucanase in *Pichia pastoris* and its inhibitory effect on fungi commonly associated with wheat kernel. *Protein Expr. Purif.* 154, 134–139. doi:10.1016/j.pep.2018.10.011.
- Zipfel, C., & Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes?. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8(4), 353–360. doi:10.1016/j.pbi.2005.05.004.
- Zitomer, N. C., Jones, S., Bacon, C., Glenn, A. E., Baldwin, T., & Riley, R. T. (2010). Translocation of Sphingoid Bases and Their 1-Phosphates, but Not Fumonisin, from Roots to Aerial Tissues of Maize Seedlings Watered with Fumonisin. *J. Agri. Food Chem.*, 58(12), 7476–7481. doi:10.1021/jf100142d.

X. Anexos

A. Anexos materiales y métodos.

1. Preparación de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) 0.5X para la cepa MY3 de *F. verticillioides*.

Para preparar 250 mL de medio PDA 0.5X, pesar 4.875 g de PDA (Sigma- Aldrich) y 1.125 g de agar, agregar 250 mL de agua desionizada y mezclar en un frasco con tapón de rosca de 500 mL. El medio se esteriliza con calor húmedo (14 psi, 121 °C, 20 min), se deja enfriar a aprox. 40°C y se vierten 25 mL a cada caja Petri, en condiciones de esterilidad.

2. Preparación de medio de cultivo para embriones.

2.1. Preparación de medio sin FB1.

Para preparar 170 mL de Agar 0.9% para 7 cajas Petri de plástico: se pesan 1.53 g de agar, se agregan 170 mL de agua desionizada y mezclar en un frasco con tapón de rosca de 250 mL. El medio se esteriliza con calor húmedo (14 psi, 121 °C, 20 min), se deja enfriar a aprox. 40°C y se vierten 20 mL a cada caja Petri, en condiciones de esterilidad.

2.2. Preparación de medio con FB1 (20 µM).

Para preparar 65 mL de Agar 0.9% para 3 cajas Petri de plástico: se pesan 0.585 g de agar, se les agrega 65 mL de agua desionizada y se mezclan en un frasco con tapón de rosca de 100 mL. El medio se esteriliza con calor húmedo (14 psi, 121 °C, 20 min), se deja enfriar aproximadamente a 40°C, se añaden 650 µL de un stock de Fumonisina B1 (2 mM; disuelta en agua) para tener una concentración final de 20 µM, se agita el medio suavemente para homogenizar y se vierten 20 mL a cada caja Petri, en condiciones de esterilidad.

3. Componentes de la mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT).

Tabla 1A. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcripción reversa (RT).

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

4. Composición de la mezcla de reacción para la adenilación de los extremos 3' de los productos de PCR.

Tabla 2A. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la adenilación del producto de PCR.

Reactivo	Volumen	Concentración final
Producto PCR purificado	Varía dependiendo la concentración	-
dATPs 10 mM	0.1 µL	0.2 mM
Buffer PCR, 7.5 mM MgCl ₂	10 µL	1x (1.5mM MgCl ₂)
Taq Polimerasa (5 U/ µL)	0.2 µL	1 U
H ₂ O estéril	c.b.p. 50 µL	-

5. Fórmula para calcular la cantidad de inserto a ligar.

Se utilizó la fórmula indicada en el Manual técnico de pGEM[®]-T y pGEM[®]-T Easy Vector Systems de Promega:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \text{relación molar inserto:vector} = \text{ng del inserto}$$

6. Preparación de células competentes.

Se utilizaron células *E. coli* de la cepa DH5 α y BL21-RIL para hacerlas competentes aplicando un tratamiento con CaCl₂: Se inoculó una asada de un stock de glicerol de cada una de las cepas de *E. coli* en 10 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (peptona al 1% p/v; extracto de levadura al 0.5% p/v; NaCl 170 mM), en un matraz Erlenmeyer de 125 mL PYREX[®] con tapón de rosca, se incubó a 37°C, con agitación (250 rpm) y durante toda la noche. Se transfirieron 2 mL de cultivo a 200 mL de LB contenidos en un matraz de Erlenmeyer de 1 L PYREX[®] con tapón de rosca, se incubó a 37°C, con agitación (250 rpm) hasta que el cultivo alcanzará una densidad óptica, medida a 590 nm, de 0.375. Se transfirió el cultivo a 4 tubos estériles de 25 mL PYREX[®] con tapón de rosca y se mantuvo en hielo (4°C) durante 5-10 min. Se centrifugo a 3,000 rpm, a 4°C en la centrifuga Beckman (GS-6R), durante 6 min. Se resuspendió lentamente cada botón celular en 10 mL de solución de CaCl₂ fría (60 mM/Glicerol 15%) y se volvió a centrifugar a 3,000 rpm, a 4°C y por 5 min. De nuevo se resuspendió lentamente cada botón celular en 10 mL de solución de CaCl₂ fría (60 mM/Glicerol 15%), se incubó en hielo (4°C) durante 30 min. Se centrifugó a 3,000 rpm, a 4°C y por 7 min, se resuspendió el pellet celular en 2.5 mL de solución de CaCl₂ fría (60 mM/Glicerol 15%). Las células competentes se guardaron a -70°C en alícuotas de 100 μ L.

7. Mapas de los vectores pGEM[®]-T Easy y pET28b (+).

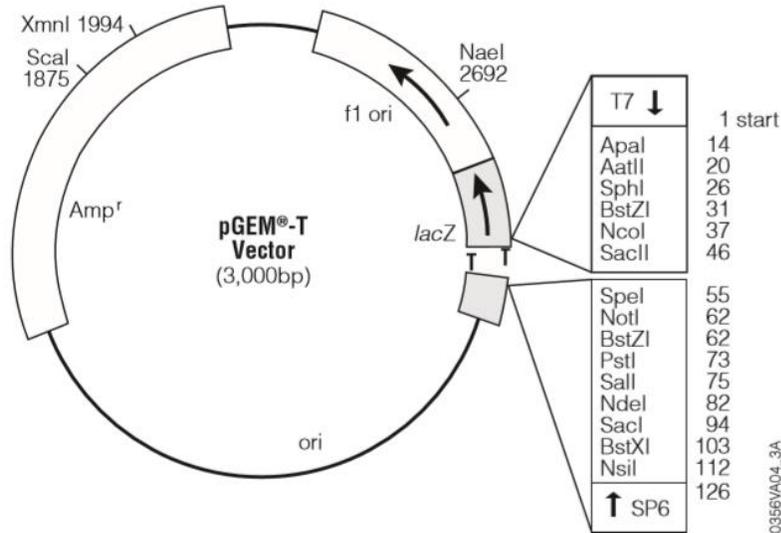


Figura 1A. Mapa del vector de clonación pGEM[®]-T Easy. Tomado del Manual técnico pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems de Promega, 2018.

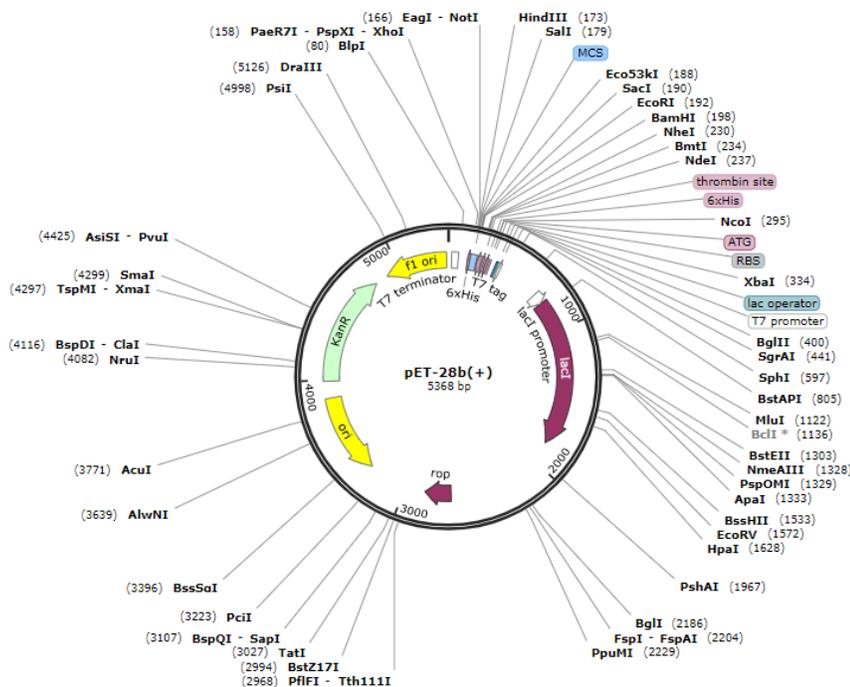


Figura 2A. Mapa del vector de expresión pET28b (+). Tomado de SnapGene software (from Insightful Science; available at snapgene.com).

8. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de las clonas recombinantes pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*.

Tabla 3A. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de las clonas recombinantes pGEM[®]-T Easy/*ZmGlucA*.

Oligonucleótido	Secuencia
Sp6	5'- ATTTAGGTGACACTATAGA-3'
T7	5'- TAATACGACTCACTATAGG-3'

9. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de pET28b(+)/*ZmGlucA*.

Tabla 4A. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para secuenciación de pET28b(+)/*ZmGlucA*.

Oligonucleótido	Secuencia
Primer T7- promotor	5'- TAATACGACTCACTATAGG-3'
Primer T7- terminador	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3'

10. Determinación de proteína por Bradford

El fundamento de la cuantificación de proteínas por Bradford consiste en la formación de un compuesto de coloración azul, producido por la unión de los residuos de aminoácidos aromáticos y básicos de las proteínas con el colorante azul brillante de Coomassie G-250 que absorbe a 595 nm (Bradford, 1976).

Tabla 5A. Componentes de la curva estándar de BSA 3 mg/mL y preparación de la muestra.

BSA (μg)	Vol. De muestra (μL)	H₂O (μL)	Reactivo de Bradford (μL)
0	-	800	200
3	1	800	200
6	2	800	200
9	3	800	200
12	4	800	200
15	5	800	200
18	6	800	200
Blanco muestra (amortiguador de lisis)	1	800	200
muestra	5	800	200

11. Soluciones utilizadas en el Western blot.

Tabla 6A. Composición de la solución de transferencia.

Componentes	Cantidad
Tris Base	3.03 g
Glicina	14.41 g
Metanol absoluto	100 mL
H ₂ O	c.b.p. 1000 mL

Tabla 7A. Composición de la solución de bloqueo.

Componentes	Cantidad
Non-fat dried milk Agdia 5%	1 g
Tween 20, 0.8%	160 μ L
PBS 1X (NaCl 1.37 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM)	c.b.p. 20 mL

Tabla 8A. Composición de la solución de lavado.

Componentes	Cantidad
Tween 20, 0.1%	1 mL
PBS 1X (NaCl 1.37 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄-7H₂O 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM)	c.b.p. 1000 mL

B. Anexo Resultados

1. Calibración del RNA total.

Se tomó como criterio que la diferencia entre los valores de densitometría de las bandas de RNAr no fuera mayor a un 15%.

Tabla 1B. Valores de densitometría de las bandas de RNAr. El RNA total se aisló de embriones de maíz sometidos a diferentes tratamientos. C₀, 0 h Embriones secos; C Control; F Presencia de 20 µM de FB1; M Infección con la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*, incubados a 12, 24 y 30 h. Se muestran los valores de dos replicas realizadas.

Primer réplica		
Tiempo	Muestra	Unidades densitométricas
0 h	C ₀	150.75
12 h	C	141.91
	F	154.87
	M	164.49
24 h	C	167.33
	F	147.46
	M	154.85
30 h	C	154.40
	F	155.93
	M	167.81
Segunda réplica		
Tiempo	Muestra	Unidades densitométricas
0 h	C ₀	218.70
12 h	C	194.96
	F	155.23
	M	161.42
24 h	C	187.78
	F	181.09
	M	164.11
30 h	C	174.01
	F	183.64
	M	190.62

2. Determinación de las condiciones de amplificación del gen de la β-1,3-glucanasa (*ZmGlucA*) de maíz y del gen de referencia (*ZmEF1α*), mediante RT-PCR punto final.

Las figuras 1B y 2B muestran el barrido de ciclos para el gen *ZmGlucA* y *ZmEF1 α* , respectivamente que sirvieron para determinar este parámetro así como la temperatura de alineamiento y la concentración de oligonucleótidos a utilizar.

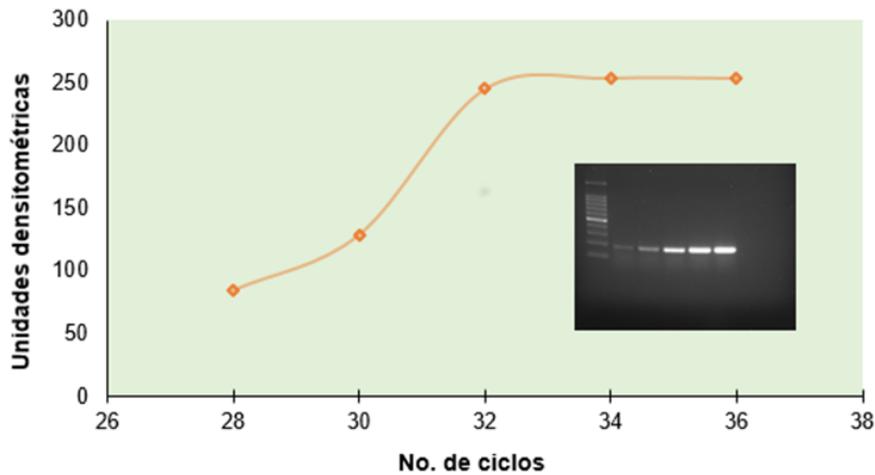


Figura 1B. Barrido de ciclos para el gen β -1,3-glucanasa de maíz (*ZmGlucA*). La parte lineal se encuentra entre los ciclos 30 y 32. Temp. de alineamiento 60 °C y la concentración de oligonucleótidos en 0.6 μ M.

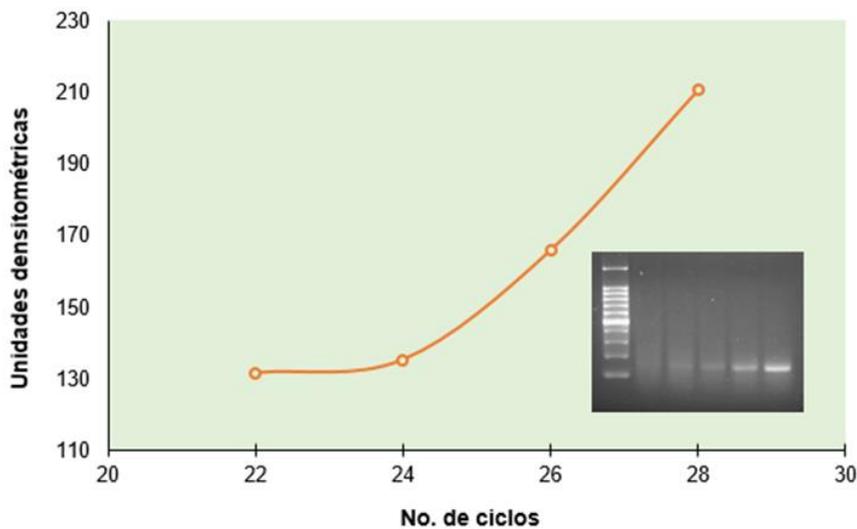


Figura 2B. Barrido de ciclos para el gen *ZmEF1 α* . La parte lineal se encuentra entre los 24 y 28 ciclos. La T de alineamiento es de 65 °C y la concentración de oligonucleótidos de 0.1 μ M.

3. Electroferograma obtenido de la secuenciación de *ZmGlucA* clonado en pGEM[®]-T Easy.

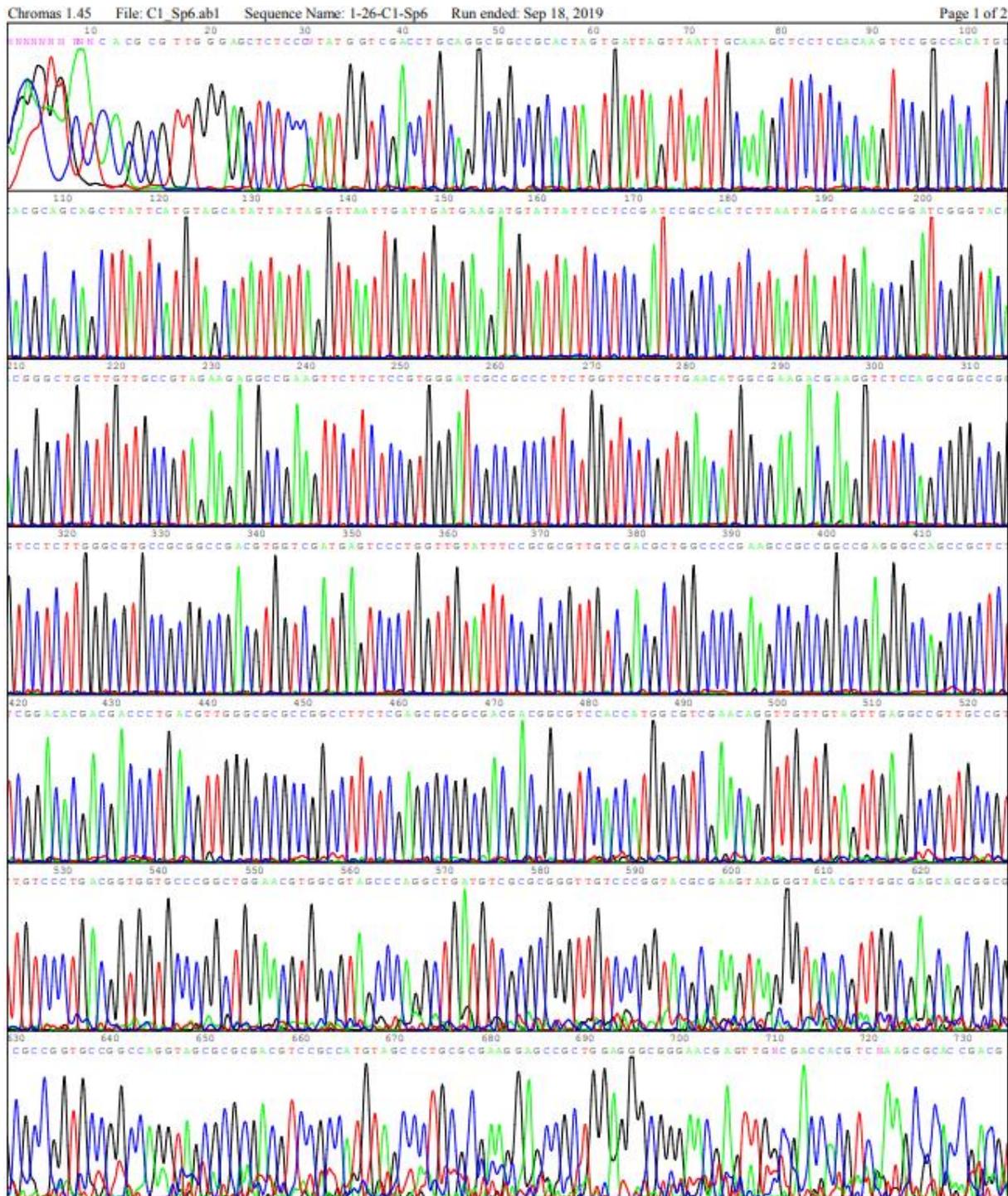


Figura 3B. Electroferograma obtenido del gen *ZmGlucA* clonado en en pGEM[®]-T Easy.