



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ACUMULACIÓN DE BASES  
ESFINGOIDEAS DURANTE LA RESPUESTA  
DE DEFENSA DE MAÍZ AL PATÓGENO  
*Fusarium verticillioides*.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)  
P R E S E N T A:  
DIANA SÁNCHEZ RANGEL



TUTOR: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

MÉXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2006



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Fco. Javier Plasencia de la Parra en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Dr. Jesús Aguirre Linares	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

El Jurado para el examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Helena Porta Ducoing	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM

Este trabajo se realizó con apoyos de los proyectos

- ❖ CONACYT 40311-Q
- ❖ UC-MEXUS, Universidad de California (CN-03-118)

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (No. de registro 183485), DGEP-UNAM y del proyecto CONACYT 40311-Q.

Se agradece la supervisión de la M.C. Manuela Nájera Martínez en el montaje de las técnicas de Biología Molecular.

Se reconoce el apoyo técnico de la Q. Laurel Fabila Ibarra.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Fco Javier Plasencia por ser un excelente tutor, gracias por su apoyo, sus enseñanzas y el tiempo dedicado.

A la Dra. Marina Gavilanes por todas las ideas aportadas y por estar siempre al pendiente de mi desarrollo profesional.

A todos mis queridos amigos y compañeros que formaron y forman parte del grupo de trabajo a Erika, Jiro, Nahieli, Maru, Manuela, Belem, Mariana y Andrea.

A todos y cada uno de los valiosos integrantes del grupo de trabajo que dirige la Dra. Marina Gavilanes.

A la Sra. Jose por su dedicación y valiosísimo apoyo en el laboratorio.

## *DEDICATORIAS*

A mis papás, Gloria y Sergio, y a mi hermano Oscar por su amor y paciencia. Gracias a ustedes he podido alcanzar cada meta. Gracias también porque siempre tienen las palabras adecuadas para hacerme seguir adelante y por ser un ejemplo a seguir.

A Luis por ser mi complemento. Gracias por tu amor y apoyo incondicional, también por toda tu ayuda en la ilustración de la tesis.

A mi tía Norma por su cariño.

A mis amigos Jessi, Carmen, Karla, Norma, Efraín, Tere, Sonia, Blanca y Samia porque son parte importante de mi vida y me siento afortunada de tener personas como ustedes a mi lado.

A la “flotilla” (Andrea, Manue y Marianita) gracias por su amistad incondicional, su apoyo y su cariño. Gracias de verdad.

---

---



## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>A. RESPUESTA DE DEFENSA EN LAS PLANTAS AL ATAQUE DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS</b> .....	3
A.1. Tipos de interacción planta-patógeno.....	4
A.2. Elicitores y detección del patógeno.....	4
A.3. Proteínas de unión a GTP.....	6
A.4. Flujos iónicos y señalización por Ca <sup>2+</sup> .....	7
A.5. Estallido oxidativo y especies reactivas de oxígeno (EROS).....	7
A.6. Óxido Nítrico (NO).....	8
A.7. Hormonas vegetales: ácido jasmónico, etileno y ácido salicílico.....	9
A.7.1. Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET).....	9
A.7.2. Ácido Salicílico (SA).....	10
A.8. Regulación del metabolismo secundario.....	10
A.9. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).....	11
<b>B. SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA EN LAS PLANTAS ANTE EL ATAQUE DE ORGANISMOS PATÓGENOS</b> .....	14
B.1. Fosfolípidos membranales y su importancia en la respuesta de defensa de las plantas ante patógenos.....	14
B.1.1. Vía de la fosfolipasa C (PLC) y patogénesis.....	15
B.1.2. Vía de la fosfolipasa D (PLD) y patogénesis.....	16
B.1.3. Vía de las fosfolipasas A (PLA) y patogénesis.....	16
B.2. Ácidos grasos libres.....	16
B.3. Oxilipinas.....	17
B.4. Esfingolípidos.....	19
<b>C. ESFINGOLÍPIDOS</b> .....	19
C.1. Generalidades.....	19
C.1.1. Diversidad estructural.....	19
C.2. Topología y Biosíntesis <i>de novo</i> de los esfingolípidos.....	20
C.3. Actividad biológica de los esfingolípidos.....	23
C.3.1. Esfingolípidos y microdominios membranales.....	23
C.3.2. Funciones biológicas de los esfingolípidos en mamíferos.....	24
C.3.2.1. Funciones biológicas de la esfingosina.....	24
C.3.2.2. Funciones biológicas de la ceramida.....	24
C.3.3. Funciones biológicas de los esfingolípidos en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
C.3.4. Funciones biológicas de los esfingolípidos en plantas.....	25
C.3.4.1. Esfingolípidos y patogénesis.....	26
<b>D. LA SERINA PALMITOIL TRANSFERASA (SPT)</b> .....	27
D.1. Características generales.....	27
D.2. Mecanismo catalítico de la SPT.....	28
D.3. Regulación transcripcional y post traduccional de la SPT.....	29

<b>E. GERMINACIÓN</b> .....	30
E.1. Estructura de la semilla de maíz.....	30
E.2. Definición y generalidades de la germinación.....	30
E.3. Germinación: estadio de desarrollo susceptible a la infección de microorganismos patógenos.....	33
<b>F. Patógenos del maíz</b> .....	34
F.1. Características generales de <i>F. verticillioides</i> .....	34
F.2. Proceso de infección en maíz.....	35
F.3. <i>Fusarium verticillioides</i> y producción de toxinas.....	36
F.3.1. Toxicidad y mecanismo de acción de la FB1.....	36
F.4. Biosíntesis de FB1 en <i>Fusarium verticillioides</i> .....	37
F.5. Factores que afectan la producción de FB1.....	38
F.5.1. Genes específicos reguladores de la producción de FB1.....	38
F.5.2. Otros factores que regulan la producción de FB1.....	39
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
1. Material Biológico.....	41
2. Inoculación de embriones de maíz con <i>Fusarium verticillioides</i> . .....	41
2.1. Obtención de una suspensión de conidias del hongo <i>Fusarium verticillioides</i> .....	41
2.2. Inoculación de los embriones de maíz con esporas del hongo <i>Fusarium verticillioides</i> .....	42
2.3. Incremento de peso húmedo. ....	42
3. Purificación de RNA y cuantificación de transcritos.....	43
3.1 Extracción de RNA total.....	43
3.2. Cuantificación y calibración del RNA total.....	43
3.3. Diseño de cebadores para amplificar secuencias parciales de cDNAs de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmLCB2</i> . ....	44
3.4. Síntesis de cDNAs por transcripción reversa.....	45
3.5. Amplificación por PCR del cDNA obtenido por RT.....	45
3.6. RT-PCR semicuantitativo.....	46
4. Clonación y Secuenciación.....	46
4.1. Aislamiento y clonación de fragmentos de cDNA de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmLCB2</i> . ....	46
4.1.2. Secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmLCB2</i> .....	46
4.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	47
4.1.4. Ligación de los insertos.....	47
4.1.5. Transformación de células competentes .....	48
4.1.6. Purificación del DNA plasmídico (Miniprep).....	49
4.1.7. Digestión del plásmido.....	49
4.1.8. Aislamiento y secuenciación.....	49
4.1.9. Digestión con una Enzima de Restricción del cDNA de <i>ZmPR-1</i> . .....	50
5. Extracción de bases esfingoideas .....	50
6. Formación de derivados de bases esfingoideas con NDA y análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC). ....	51

---

<b>V. RESULTADOS</b> .....	53
<b>1. Establecimiento del método de inoculación</b> .....	53
1.1.Efecto del método de inoculación utilizado en la acumulación de peso húmedo en embriones de maíz infectados con <i>F. verticillioides</i> . ....	53
1.2. Estudio de un marcador de defensa en el sistema de interacción planta patógeno establecido.....	55
<b>2. Niveles de esfinganina en embriones de maíz durante la infección con el hongo <i>F. verticillioides</i></b> .....	61
<b>3. Análisis de los niveles de transcrito del gen <i>lcb2</i> de la SPT de maíz en respuesta a la infección por <i>F. verticillioides</i></b> .....	66
3.1 Clonación e identificación de <i>ZmLCB2</i> .....	66
3.2.Optimización del ensayo semicuantitativo para el análisis del transcrito <i>ZmLCB2</i> por RT-PCR.....	68
3.3. Prueba de especificidad de los oligonucleótidos que amplifican <i>ZmLCB2</i>	70
3.4. Ensayo de RT-PCR para el análisis de <i>ZmLCB2</i> en embriones de maíz durante la infección con <i>F. verticillioides</i> .....	71
<b>VI.DISCUSIÓN</b> .....	73
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	88
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	89
<b>IX. APÉNDICE</b> .....	99

## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	ácido abscísico	<b>MAPK</b>	quinasas de proteínas activadas por mitógenos
<b>AOS</b>	aleno óxido sintasa	<b>NDA</b>	naftalen 2,3-dicarboxialdehído
<b>Avr</b>	gen de avirulencia	<b>NOS</b>	óxido nítrico sintasa
<b>CAPK</b>	cinasa activada por ceramida	<b>OPDA:</b>	ácido 12-oxofitodienoico
<b>CAPP</b>	fosfatasa de proteínas activadas por ceramida	<b>PA</b>	ácido fosfatídico
<b>cbp</b>	cuanto baste para	<b>PCD</b>	muerte celular programada
<b>CERK</b>	ceramida cinasa	<b>PDA</b>	papa dextrosa agar
<b>CHO</b>	células de ovario de hamster chino	<b>PKC</b>	proteína cinasa C
<b>DAG</b>	diacilglicerol	<b>PLA</b>	fosfolipasa A
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato	<b>PLC</b>	fosfolipasa C
<b>DES</b>	divinil éter sintasa	<b>PLD</b>	fosfolipasa D
<b>DGK</b>	diacilglicerol cinasa	<b>PLP</b>	piridoxal fosfato
<b>DHS</b>	D-eritro-esfinganina	<b>POX:</b>	perooxigenasa
<b>DMS</b>	N.N-dimetilesfingosina	<b>PR</b>	relacionadas con la patogénesis
<b>DO</b>	densidad óptica	<b>PUFA</b>	ácido graso poliinsaturado
<b>a DOX:</b>	$\alpha$ -dioxigenasa	<b>R</b>	gen de resistencia
<b>EROS</b>	especies reactivas de oxígeno	<b>RA</b>	ácido retinóico
<b>ET</b>	etileno	<b>RE</b>	retículo endoplásmico
<b>FAD</b>	desaturasa de ácido graso	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>FAH</b>	hidroxilasa de ácido graso	<b>RSA</b>	resistencia sistémica adquirida
<b>FB1</b>	fumonisina B1	<b>RT</b>	transcripción reversa
<b>FFA</b>	ácidos grasos libres	<b>Rv</b>	reverse
<b>FT</b>	factores transcripcionales	<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>Fw</b>	forward	<b>SDKs</b>	quinasas de proteínas dependientes de esfingosina
<b>GCS</b>	glucosilceramida sintasa	<b>SE</b>	elicitores de naturaleza esfingolipídica
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente	<b>SA</b>	ácido salicílico
<b>GIPC</b>	glucosilinositolfosforilceramida	<b>SIPK1</b>	MAPK inducida por ácido salicílico
<b>HPL</b>	hidroperóxido liasa	<b>SK</b>	esfingosina cinasa
<b>HR</b>	respuesta de hipersensibilidad	<b>Sm</b>	esfingomielina
<b>IL-1</b>	interleucina 1	<b>S1P</b>	esfingosina 1-fosfato
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato	<b>SPT</b>	serina palmitoil transferasa
<b>IPC</b>	inositolfosforilceramida	<b>TAE</b>	amortiguador Tris-HCl, ácido acético, EDTA
<b>JA</b>	ácido jasmónico	<b>TNF<math>\alpha</math>,</b>	factor de necrosis tumoral
<b>3KSR</b>	3-cetoesfinganina reductasa	<b>TMV</b>	virus del mosaico del tabaco
<b>LCB</b>	base esfingoidea de cadena larga		
<b>LOX</b>	lipooxigenasa		

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Curso temporal de los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren en plantas durante la respuesta de defensa al ataque de un patógeno	..... 6
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de señalización que se presentan en una interacción planta-patógeno	..... 13
<b>Figura 3.</b> Esquema de las posiciones en las que hidrolizan las diferentes fosfolipasas en los fosfolípidos membranales	..... 14
<b>Figura 4.</b> Generación de ácido fosfatídico (PA) por acción directa de la fosfolipasa D (PLD) o indirecta por la fosfolipasa C (PLC)	..... 15
<b>Figura 5.</b> Síntesis de oxilipinas en plantas	..... 18
<b>Figura 6.</b> Productos derivados de la actividad de LOX	..... 18
<b>Figura 7.</b> Diversidad estructural de LCBs en plantas.	..... 20
<b>Figura 8.</b> Biosíntesis <i>de novo</i> de esfingolípidos complejos en plantas	..... 23
<b>Figura 9.</b> Estructura de la semilla de maíz.	..... 30
<b>Figura 10.</b> Eventos celulares y metabólicos durante la toma de agua en la germinación	..... 32
<b>Figura 11.</b> Estructura de la toxina FB1 producida por <i>F. verticillioides</i>	..... 36
<b>Figura 12.</b> Plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega	..... 48
<b>Figura 13.</b> Formación de los derivados de las bases esfingoideas con naftalendicarboxaldehído (NDA)	..... 51
<b>Figura 14.</b> Efecto del método de inoculación en la toma de agua de los embriones de maíz durante la germinación	..... 53
<b>Figura 15.</b> Incremento de peso húmedo en los embriones de maíz infectados con las cepas MY3 y CHQ1 de <i>F. verticillioides</i>	..... 55
<b>Figura 16.</b> Obtención e identificación de <i>ZmPR-1</i>	..... 57
<b>Figura 17.</b> Alineamiento a nivel de aminoácidos de proteínas PR-1 de diferentes especies vegetales	..... 57
<b>Figura 18.</b> Determinación de los parámetros óptimos para la detección semicuantitativa de los transcritos de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmUBQ</i>	..... 59
<b>Figura 19.</b> Niveles de <i>ZmPR1</i> en embriones de maíz infectados con <i>F. verticillioides</i> .	..... 60
<b>Figura 20.</b> Separación de los derivados de NDA de fitoesfingosina y esfinganina por cromatografía en fase reversa	..... 62
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas de la detección de bases esfingoideas por HPLC	..... 63
<b>Figura 22.</b> Niveles de esfinganina en embriones de maíz infectados con <i>F. verticillioides</i> .	..... 64
<b>Figura 23.</b> Amplificación e identificación de <i>ZmLCB2</i> .	..... 67

<b>Figura 24.</b>	Alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia de LCB2 obtenida de maíz ( <i>Zea mays</i> ) con la secuencia de LCB2 de otras especies vegetales	.....	68
<b>Figura 25.</b>	Condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de un producto de 412pb <i>ZmLCB2</i>	.....	69
<b>Figura 26.</b>	Prueba de especificidad de los oligonucleótidos para amplificar <i>ZmLCB2</i> .	.....	67
<b>Figura 27.</b>	Niveles del transcrito <i>ZmLCB2</i> en embriones de maíz durante la infección con la cepa MY3 de <i>F. verticillioides</i> .	.....	71
<b>Figura 28.</b>	Niveles del transcrito <i>ZmLCB2</i> en embriones de maíz durante la infección con la cepa CHQ1 de <i>F. verticillioides</i> .	.....	72
<b>Figura 29.</b>	Mecanismos propuestos para el incremento en los niveles de esfinganina en embriones de maíz durante la interacción con <i>Fusarium verticillioides</i> .	.....	87

---

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de elicitores y sus efectos que han sido caracterizados en diferentes tipos de plantas .....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). .....	11
<b>Tabla 3.</b> Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmLCB2</i> .....	44
<b>Tabla 4.</b> Componentes de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa .....	45
<b>Tabla 5.</b> Preparación de la mezcla para PCR .....	46
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de la reacción de RT-PCR para la amplificación de <i>ZmPR-1</i> y <i>ZmUBQ</i> .....	58
<b>Tabla 7.</b> Análisis de dos picos que fueron identificados en los cromatogramas para el análisis de bases esfingoideas .....	66

---



## RESUMEN

*Fusarium verticillioides* (syn. *moniliforme*), es un hongo patógeno que llega a constituir hasta el 80% del total de las cepas de hongos que se aíslan de semillas de maíz. El hongo puede infectar la semilla de maíz desde su formación y sobrevivir en ésta para acceder luego a la plántula durante la germinación y desarrollo post-germinativo. La infección en esta etapa del desarrollo es de gran relevancia pues compromete seriamente la viabilidad y el establecimiento de la plántula. Aún en este periodo temprano de desarrollo, la planta es capaz de responder a la infección pues produce proteínas antioxidantes, proteínas de choque térmico, y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como quitinasas. Por otro lado, el patógeno produce varios metabolitos secundarios con actividad biológica. Muchas cepas de *F. verticillioides* producen micotoxinas, como la fumonisina B<sub>1</sub> (FB1), que perturba el metabolismo de esfingolípidos causando acumulación de bases esfingoideas y depleción en los niveles de esfingolípidos complejos.

En este trabajo se estableció un sistema de infección de embriones de maíz con *F. verticillioides*, empleándose dos cepas del hongo aisladas de semillas de maíz que difieren en la producción de FB1: la cepa MY3 que produce la toxina y la cepa CHQ1 que no la produce. Para evaluar la activación de la respuesta de la planta se analizaron los niveles de transcrito de la proteína relacionada a patogénesis-1 (*ZmPR1*), que se acumula como parte de la respuesta de defensa, y se ha sugerido que tiene actividad antifúngica. Se encontró una inducción significativa del 100% con ambas cepas a las 3 y 6 horas post-inoculación con respecto a embriones no inoculados. Para estudiar la alteración del metabolismo de esfingolípidos en la respuesta al patógeno, se cuantificaron por HPLC los niveles de esfinganina, que es un intermediario de esta ruta biosintética. Se encontró que la infección con el hongo provocó un incremento de hasta 100% en los niveles de esfinganina y, posiblemente de otras bases esfingoideas. Este aumento fue transitorio pues solamente se observó a las 9 horas post-inoculación con ambas cepas; lo que sugiere que esta acumulación no se debe a la producción de FB1. Para determinar si el incremento en los niveles de esfinganina estaba asociado a la activación transcripcional de genes de la ruta biosintética de esfingolípidos, se aisló una sonda del gen LCB2 (*long chain base 2*) de maíz. Éste corresponde a una subunidad de

la enzima serina-palmitoil tranferasa (SPT) que cataliza el primer paso en la biosíntesis de bases esfingoideas y por experimentos de RT-PCR semicuantitativo no se encontró un incremento significativo en los niveles de éste.

Los resultados obtenidos sugieren que las bases esfingoideas sí se acumulan como parte de la respuesta de la planta a la infección por el hongo y que su acumulación no se asocia a una inducción transcripcional de la SPT y que parece ocurrir en ausencia de fumonisina pues se observaron patrones similares con ambas cepas y a tiempos muy tempranos en los que probablemente no hay producción de la toxina. Este trabajo aportó evidencia de la acumulación de un intermediario de la biosíntesis de esfingolípidos durante los eventos tempranos de la interacción con el patógeno y que pudiera funcionar como una molécula de señalización de la respuesta de defensa en células vegetales.

---

### I. INTRODUCCIÓN

#### A. RESPUESTA DE DEFENSA EN LAS PLANTAS AL ATAQUE DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

##### A.1. Tipos de interacción planta-patógeno

La habilidad de discriminar entre lo propio y lo ajeno es un rasgo distintivo de los organismos vivos y es la base para la activación de un sistema de defensa cuando ocurre una infección generada por organismos patógenos. En animales, la maquinaria de defensa involucra al sistema inmune, que está basado en la participación de células altamente especializadas (macrófagos, neutrófilos, y células dendríticas) que están distribuidas a través del sistema circulatorio (Nürnbergger *et al*; 2004). En contraste, en las plantas no hay células circulantes por lo que la respuesta de defensa depende de la capacidad de percepción y respuesta de cada célula individual (Bonas y Lahaye, 2002).

Existe una variedad de organismos patógenos que pueden infectar a una planta: como las bacterias, los hongos, los nemátodos, los fitoplasmas, los virus y los protozoarios. Cuando estos patógenos logran penetrar el tejido y colonizarlo, se desarrolla la enfermedad. Este evento se define como una reacción de *compatibilidad* y se establece que la planta es *susceptible*. El caso opuesto ocurre cuando un patógeno intenta penetrar y colonizar una planta y ésta responde eficientemente para contener la infección. Este es un evento de *incompatibilidad* que ocurre en plantas *resistentes*.

Dependiendo del rango de los patógenos contra los que se monta la respuesta de resistencia, se pueden clasificar en resistencia *específica* y *no específica*. La primera ocurre en genotipos específicos de una planta hospedera contra cepas particulares de un microorganismo patógeno. Esta respuesta de resistencia se ha caracterizado extensivamente a nivel genético y está mediada por la presencia de un gen de la planta denominado gen de resistencia y la presencia de un gen en el patógeno conocido como gen de avirulencia. En contraste, la resistencia no específica se presenta en todos los genotipos de una especie de plantas y son eficientes contra muchos géneros y especies de patógenos microbianos. Sin embargo, los eventos bioquímicos y moleculares que se presentan en estos dos tipos de resistencia son muy similares (Somssich y Hahlbrock, 1998).

## Introducción

---

Uno de los mecanismos de defensa que desarrollan las plantas se conoce como respuesta de hipersensibilidad (RH). La RH se caracteriza por una rápida muerte celular que está restringida al área que rodea al punto de infección y su apariencia varía según la especie. Como consecuencia, esta respuesta limita el crecimiento y diseminación del patógeno invasor hacia otros tejidos de la planta (Heath 2000, Gozzo 2003). Se ha propuesto que la RH se acompaña por otras respuestas de defensa como la generación de un estallido oxidativo, inducción en la actividad de enzimas detoxificantes, síntesis de compuestos antimicrobianos, como las fitoalexinas así como la inducción transcripcional de una familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). En muchos casos, esta respuesta de defensa se extiende a través de la resistencia sistémica adquirida (RSA). La RSA requiere de ácido salicílico (SA), y se ha asociado principalmente con una acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis no solo en tejidos locales donde ocurrió la infección de la planta sino principalmente en tejidos sistémicos, lo que contribuye a proteger contra infecciones subsecuentes (Durrant y Dong, 2004).

### A.2 Elicitores y detección del patógeno.

Una característica de la reacción de resistencia es la detección rápida del patógeno que permite a la planta hospedera montar una respuesta temprana y eficiente. De hecho, la diferencia más notoria entre las respuestas de susceptibilidad y resistencia son cuantitativas y cinéticas, pues se considera que el reconocimiento del patógeno suele ser menos eficiente en una planta susceptible y, por lo tanto, las reacciones de defensa que se inducen son de menor intensidad y a tiempos más tardíos que en la planta resistente (Katagiri, 2004).

En una reacción de resistencia específica el producto del gen de avirulencia del patógeno se reconoce directa o indirectamente por el producto del gen de resistencia de la planta. Se sugiere que en las respuestas de resistencia no específica, el patógeno o productos de éste son reconocidos por receptores de la planta hospedera que desencadena una cascada de señalización. Estas moléculas derivadas del patógeno se conocen como elicitores y su naturaleza química es muy diversa, pues se han caracterizado péptidos, glicoproteínas, polisacáridos y lípidos (Tabla1) (Zhao *et al*; 2005).

## Introducción

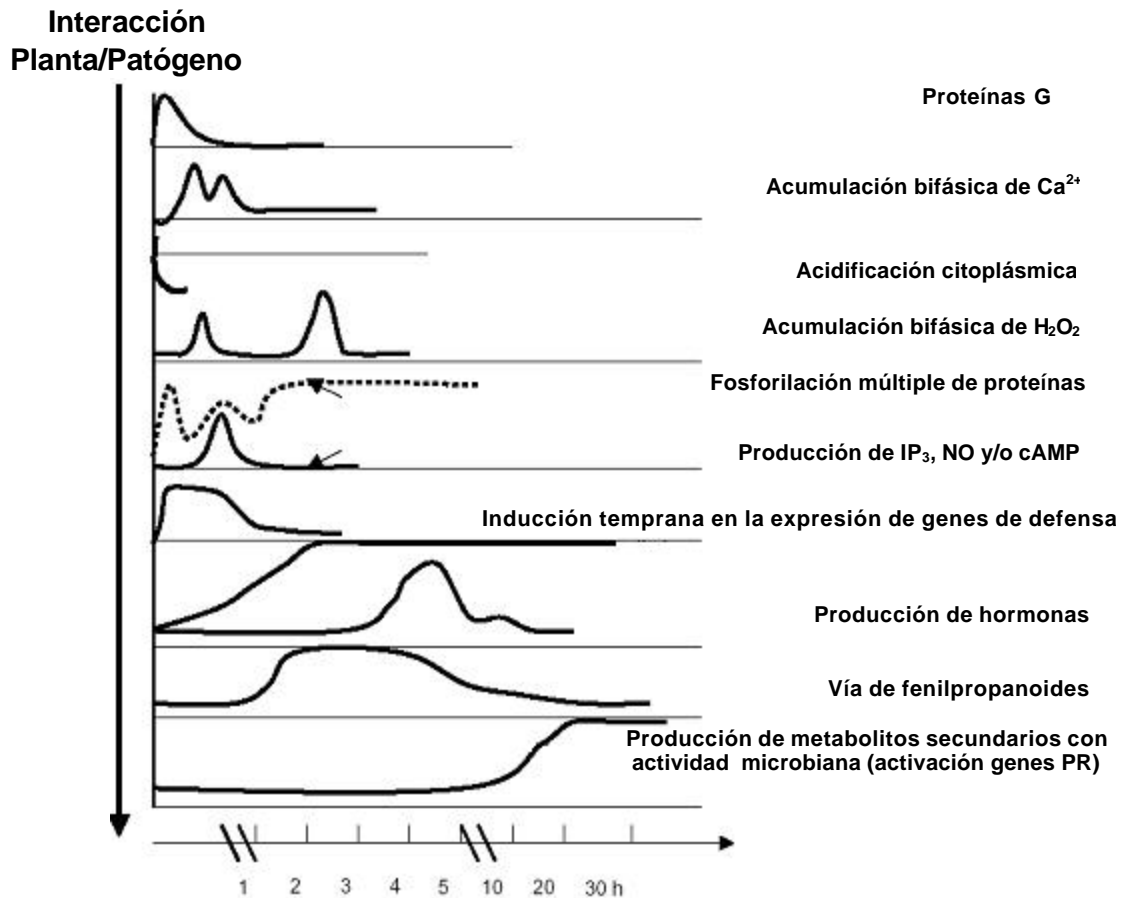
**Tabla 1.** Ejemplos de elicitores y sus efectos que han sido caracterizados en diferentes tipos de plantas.

<b>Elicitor</b>	<b>Organismo que lo produce</b>	<b>Naturaleza química del elicitore</b>	<b>Eventos bioquímicos y moleculares que induce en plantas</b>	<b>Referencia</b>
β-glucanos	<i>Phytophthora sojae</i>	1,6-β-heptaglucósido	↑↑ flujo Ca <sup>2+</sup> , generación de EROS y expresión de genes PR en soya	Fliegmann <i>et al</i> ; 2004
Harpinas	<i>Pseudomonas spp.</i>	Proteína de 10-12 kDa	↑↑ flujo Ca <sup>2+</sup> y generación de EROS en arroz	Ito <i>et al</i> ; 1997
flg22	Eubacteria	Péptido de 22 aa del dominio activo de la flagelina	Acumulación de EROS y desarrollo de HR en tabaco	Lee <i>et al</i> ; 2001
Sistemina	Hojas de tomate	Péptido de 18 aa	Inducción de la síntesis de JA, producción de EROS y ↑↑ flujo Ca <sup>2+</sup> en tomate	Scheer y Ryan, 2002
13-pep	<i>Phytophthora sojae</i>	Péptido de 13 aa derivado de una glicoproteína de 42 kDa	Acumulación de EROS, JA y fitoalexinas en perejil	Nennstiel <i>et al</i> ; 1998
Criptogeína	<i>Phytophthora cryptogea</i>	glicoproteína	Despolarización de la membrana, acumulación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y MAPK en tabaco	Bourque <i>et al</i> ; 1999
Xilanasa	<i>Thricoderma viride</i>	Proteína de 22 KDa	Activación de una MAPK y de una fosfolipasa en tomate	Mayrose <i>et al</i> ; 2004, Laxalt <i>et al</i> ; 2001
Cerebrósidos A y C	<i>Magnaporthe griseae</i>	Esfingolípidos	Acumulación de fitoalexinas, HR y activación de una MAPK en arroz	Koga <i>et al</i> ; 1998, Lieberherr <i>et al</i> ; 2005

Una vez que ha sido reconocido el patógeno se inducen varias respuestas, que van desde minutos a horas, según el tipo de tejido. Las primeras reacciones se producen en la membrana plasmática y comprenden los siguientes eventos: apertura de canales iónicos, formación de especies reactivas de oxígeno (EROS), modificaciones en la polaridad de la membrana y modificación de la actividad enzimática de oxidasas, fosfolipasas, cinasas y fosfatasa. Estos primeros eventos conducen a la activación de señales en otros sitios de la célula como la activación de cinasas citosólicas de la cascada de MAPK, activación temprana en la expresión de genes relacionados con la patogénesis (genes PR), producción de hormonas como etileno, ácido jasmónico (JA) y/o ácido salicílico (SA), y por último la expresión de genes asociados con la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. La secuencia temporal de

## Introducción

este conjunto de eventos que se han identificado en algunas plantas durante una interacción planta-patógeno se muestra en la Figura 1 (Zhao *et al*; 2005).



**Figura 1.** Curso temporal de los eventos bioquímicos y moleculares que ocurren en plantas durante la respuesta de defensa al ataque de un patógeno (Modificado de Zhao *et al*; 2005).

A continuación se describirán algunos de estos eventos que en conjunto forman parte de la red de transducción de señales que conducen a cambios bioquímicos y moleculares con el objetivo de generar un metabolismo en la planta dirigido a combatir la infección de un patógeno.

### A.3. Proteínas de unión a GTP.

Las proteínas G constituyen una familia de proteínas eucarióticas de origen ancestral que incluyen a las proteínas monoméricas G pequeñas y a las proteínas G heterotriméricas, estas últimas formadas por las subunidades  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -. En plantas,

## Introducción

---

los genes de las proteínas G heterotriméricas se encuentran en pocas copias, mientras que los genes de las proteínas G-pequeñas Rop (homólogo de las GTPasas Rho), Rac y Rab se encuentran en múltiples copias (Assmann, 2002). Se postula la participación de las proteínas G en la respuesta de defensa en plantas por su posible asociación a los receptores membranales que perciben la señal de un elicitador o una proteína efectora con la consecuente activación de fosfatasa y canales iónicos.

### A.4 Flujos iónicos y señalización por $\text{Ca}^{2+}$ .

La activación de flujos iónicos en las células de la planta es una respuesta muy rápida, pues ocurre en los primeros 5 min después de percibir la señal generada por un elicitador. Se ha descrito que ocurre principalmente influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$ , y salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Somssich y Hahlbrock, 1998). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los eventos más significativos debido a la función de este ión como segundo mensajero en diversos eventos fisiológicos y procesos celulares. Los niveles basales de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  se encuentran entre 50 y 100 nM y se ha demostrado que diferentes elicitores inducen un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  alcanzando concentraciones entre 1-5  $\mu\text{M}$  en los primeros 2 a 5 min después del contacto inicial. Este incremento muestra un patrón bifásico explicado por un primer influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y un segundo pulso como posible resultado de la activación de una fosfolipasa C (PLC) para liberar inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que entonces puede mediar la liberación de reservas intracelulares de calcio ubicadas en vacuolas, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Lecourieux *et al*; 2002). El incremento súbito de  $\text{Ca}^{2+}$  activa procesos intracelulares directamente, o a través de sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la calmodulina, que es una proteína ácida con cuatro sitios de unión de alta afinidad para este catión. La calmodulina se asocia con una variedad de proteínas como cinasas, fosfatasa o factores transcripcionales para activarlos. Algunas fosfolipasas responsables de la biosíntesis de JA, inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), ácido fosfatídico (PA) y diacilglicerol (DAG) también son regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang 2002, de Jong *et al*; 2004).

### A.5. Estallido oxidativo y especies reactivas de oxígeno (EROS).

El estallido oxidativo es una de las respuestas fisiológicas más tempranas durante una interacción planta-patógeno. Las principales especies que se producen en este estallido son el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se



## Introducción

---

genera por la acción de una superóxido dismutasa a partir de  $O_2^-$ . En las células vegetales existen muchas fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno (**EROS**) como son la NADPH oxidasa membranal, la peroxidasa de pared celular, las amino oxidasas del apoplasto y otras oxidasas localizadas en mitocondria, cloroplasto y peroxisomas (Mittler, 2004). Muchos tipos de estrés, incluyendo el ataque por patógenos, pueden desestabilizar la homeostasis de la célula y se llegan a alcanzar niveles de producción altos, tanto de  $O_2^-$  como de  $H_2O_2$ , siendo que este último puede alcanzar una concentración de hasta  $15 \mu M$ . (Mittler *et al*; 2004)

La función de las EROS en estas interacciones se ha atribuido a su toxicidad directa sobre el patógeno y también por su contribución al reforzamiento de la pared celular al incrementar la formación de polímeros de lignina. Además de estos efectos, las EROS pueden funcionar como señales biológicas para controlar la expresión de genes relacionados con patogénesis (Apel y Hirt, 2004).

### A.6. Óxido Nítrico (NO).

El óxido nítrico (NO) es un radical libre reactivo, lipofílico y volátil (Crawford & Guo, 2005). El NO es una molécula bien caracterizada en mamíferos que participa en múltiples procesos fisiológicos incluyendo la respuesta inmune y recientemente se ha propuesto como molécula señal que participa en una respuesta de defensa en las plantas (Wendehenne *et al.* 2004).

El NO se produce en plantas por vías enzimáticas y vías no enzimáticas. La principal vía no enzimática forma NO a partir de dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) en un proceso que depende de luz y de los pigmentos  $\beta$ -carotenoides. Por otro lado la principal vía enzimática es a partir de nitrito ( $NO_2^-$ ) el cual es reducido por una nitrato reductasa dependiente de NADPH (Neill *et al.* 2003). La participación del NO en una respuesta de defensa en plantas se ha demostrado en varios sistemas. Por ejemplo en células en cultivo de soya tratadas con *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*, ocurre una producción rápida de NO con una cinética muy similar a la producción de  $H_2O_2$ . La máxima producción de estas especies reactivas es a las 6 h post infección. Además, al utilizar el compuesto  $N^w$  nitro-L-arginina (L-NNA) que es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), la expresión del gen de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la muerte celular disminuyen de manera significativa (Delledonne *et al*; 1998).

## Introducción

---

En plantas de tabaco inoculadas con TMV se induce de 4 a 5 veces la actividad de NOS a las 2-3 h.p.i y esta inducción correlaciona con un aumento en los niveles de NO. Asimismo, la administración de una NOS recombinante de mamíferos en plantas de tabaco induce la síntesis de SA a las 18 h y la expresión de genes relacionados con defensa como *PR-1* y *PAL* (Durner *et al.*; 1998).

Al igual que en mamíferos, la señalización por NO en plantas también requiere la síntesis de GMPc. En plantas de tabaco infectadas con TMV el aumento del NO induce un incremento en los niveles de GMPc, e inhibidores de la vía de la guanilato ciclasa como el 6-anilino-5,8-quinolinediona (LY 83583, 200  $\mu$ M) inhibe la inducción de los niveles de *PAL* dependiente de NO (Durner *et al.* 1998). El NO también puede activar MAP cinasas, como la SIPK (proteína cinasa inducida por ácido salicílico) en tabaco (Kumar & Klessig, 2000).

### **A.7. Hormonas vegetales: ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA).**

Las hormonas SA, JA y ET se acumulan en las plantas como respuesta a la infección de patógenos dirigiendo a la activación de distinto grupos de genes relacionados con la patogénesis. Diversos estudios muestran que existe una co-regulación entre las vías de señalización inducidas por estas tres hormonas durante un determinado mecanismo de defensa en la plantas y pueden también entrecruzarse generando respuestas cooperativas o antagónicas (Glazebrook *et al.*; 2003).

#### **A.7.1. Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET).**

De acuerdo a los tipos de interacciones, se ha propuesto que la resistencia hacia patógenos biótrofos (organismos que sólo viven y se reproducen cuando se encuentran en un hospedero vivo), está mediada por vías dependientes de SA, mientras que la respuesta hacia patógenos necrótrofos (organismos parásitos que causan la muerte del hospedero y utilizan como base nutritiva el tejido muerto), depende de vías en las que participan JA y ET (Feys y Parker, 2000). Diversas líneas de investigación sugieren un modelo de señalización en donde las vías de SA y JA/ET son paralelas con una retroalimentación negativa entre ellas. Por ejemplo, mutantes de *Arabidopsis* defectuosas en la biosíntesis de SA, presentan una elevada expresión del transcrito del

## Introducción

---

gen *PDF1.2* que codifica para una defensina con actividad antifúngica y que en su promotor tiene elementos que responden a JA (Spoel *et al*; 2003, Brown *et al*; 2003). En contraste, en mutantes que producen constitutivamente SA, está suprimida la expresión de este gen, y mutantes defectuosas en la producción de JA expresan constitutivamente PR-1, que es una proteína de defensa que se activa por SA (Petersen *et al*; 2000). Sin embargo, el antagonismo entre la señalización mediada por SA y JA/ET no se da en todos los casos y algunos genes PR requieren JA, ET y SA al mismo tiempo.

### A.7.2. Ácido Salicílico (SA).

Los niveles de SA incrementan en plantas de tabaco y *Arabidopsis* en los sitios de infección durante interacciones compatibles e incompatibles (Ryals *et al*; 1996) y se requiere para desarrollar una resistencia local y sistémica en las plantas cuando son infectadas por patógenos (Durner *et al*; 1997).

Algunos efectos del incremento del SA en las respuestas de defensa ante patógenos que se han observado son: inducción de la actividad de una MAPK denominada SIPK1 (salicylic acid induced protein kinase) en células de tabaco (Zhang *et al*; 1997), así como también un incremento en los niveles de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (Kawano *et al*; 1998). Por último, el incremento del SA puede inducir la expresión de genes de defensa (genes PR) a través de regular la actividad de la proteína NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes), que a su vez regula la actividad del factor transcripcional TGA1 (Dong, 2001; Després *et al*; 2003). Esta interacción incrementa su capacidad de unión a elementos específicos en los promotores de numerosos genes relacionados con la patogénesis (PR).

### A.8. Regulación del metabolismo secundario.

Cuando las plantas son atacadas por patógenos se activa el metabolismo secundario para generar una diversidad amplia de compuestos, algunos de ellos con propiedades antimicrobianas, y otros con capacidad de modificar las características físicas de la pared celular. Una de las vías más estudiadas es la vía de los fenilpropanoides. En varios sistemas de interacción planta patógeno las enzimas que están involucradas en esta ruta, como la fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato CoA ligasa (4-CL) son inducidas a nivel transcripcional. Se han encontrado elementos comunes en los promotores de estos genes, como las

## Introducción

---

cajas H y caja L que son blanco de los factores de transcripción de la familia Myb. Esta activación génica precede a la producción y acumulación de fitoalexinas que son compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana y de compuestos de señalización como el SA (Somssich y Hahlbrock, 1998).

### A. 9. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

También durante la respuesta de defensa en las plantas se induce la expresión de una serie de proteínas denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) y que en conjunto son efectivas para inhibir el crecimiento del patógeno y su multiplicación. Estas proteínas se acumulan localmente en los tejidos infectados, pero también se pueden inducir sistémicamente durante la RSA. Dentro de las proteínas PR, se han identificado actividades de quitinasas, glucanasas, endoproteasas y peroxidasa, entre otras. Esta diversidad funcional se refleja en las 17 familias caracterizadas de PRs (Tabla 2) (Van Loon *et al*; 1999; Okushima *et al*; 2000; Niderman *et al*; 1995).

**Tabla 2.** Clasificación de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

Familia	Proteína representativa	Propiedades y/o función
PR-1	PR-1a de tabaco	Antifúngica 14-17 kDa
PR-2	PR-2 de tabaco	Endo- $\beta$ -1,3-glucanasas clase I, II y III, 25-35 kDa
PR-3	P y Q de tabaco	endoquitinasas tipo I,II, IV,V,VI,VII, 30 kDa
PR-4	R de tabaco	Quitinasa tipo I,II, 13-19 kDa
PR-5	S de tabaco	Taumatina *
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteasa, 6-13 kDa
PR-7	P <sub>69</sub> de tomate	Endoproteasa
PR-8	Quitinasa de calabaza	Quitinasa tipo III
PR-9	Peroxidasa de tabaco	Peroxidasa
PR-10	"PR-1" de perejil	Ribonucleasa
PR-11	Quitinasa clase V de tabaco	endoquitinasa
PR-12	Rs-AFP3 de rábano	Defensina*
PR-13	THI2.1 de Arabidopsis	Tionina*
PR-14	LTP4 de cebada	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	OxOa de cebada	Oxalato oxidasa
PR-16	OxOLP de cebada	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	PRp27 de tabaco	Se desconoce

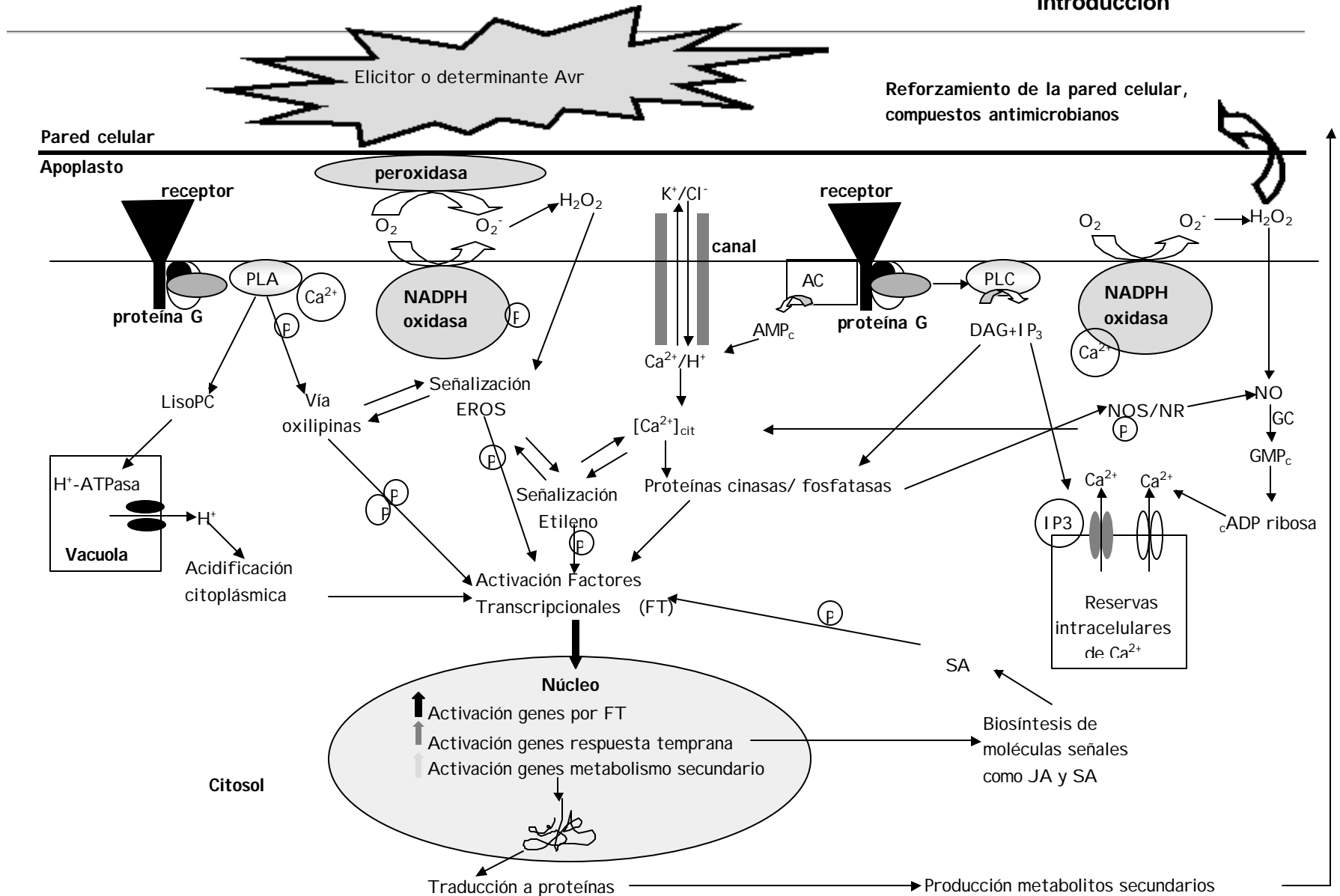
\*Las proteínas PR-5, PR-12, PR-13 y PR-14 tienen la habilidad de permeabilizar la membrana plasmática causando plasmólisis y daño a patógenos bacterianos y fúngicos. Este efecto se sugiere es causado por

## **Introducción**

---

interacciones electrostáticas de estas proteínas con componentes membranales, produciendo cambios conformacionales y poros en la membrana (Edreva, 2005).

En la Figura 2 se muestra un esquema general de los mecanismos bioquímicos y moleculares que se presentan en una célula vegetal como respuesta al ataque de un microorganismo patógeno.



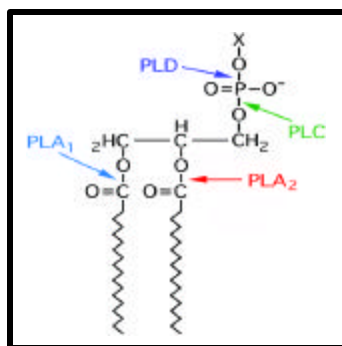
**Figura 2. Mecanismos de señalización que se presentan en una interacción planta-patógeno.** Los elicitores o determinantes Avr son reconocidos por receptores específicos en la membrana plasmática. Las proteínas G, posiblemente acopladas a los receptores, activan canales iónicos. El Ca<sup>2+</sup> citoplásmico activa cinasas de proteínas, peroxidasas, NADPH oxidasas y fosfolipasas para generar otras moléculas de señalización como EROS, DAG, IP<sub>3</sub>, cAMP, JA, etileno, AC:AMP ciclasa y GC: GMP ciclasa. (P) Significa una regulación por fosforilación y/o desfosforilación. Modificado de Zhao *et al*; 2005.

## B. SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA EN LAS PLANTAS ANTE EL ATAQUE DE ORGANISMOS PATÓGENOS.

Aunque los lípidos se encuentran principalmente distribuidos en las membranas celulares, no sólo son componentes estructurales, sino que también participan como mediadores en muchos procesos como transducción de señales, rearrreglo del citoesqueleto y tráfico membranar. Estos procesos son cruciales tanto para la sobrevivencia, crecimiento, diferenciación celular y para la respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos. Por ejemplo, evidencias experimentales demuestran la participación activa de algunos lípidos y sus derivados en la respuesta de defensa de las plantas ante patógenos. Entre estos lípidos se encuentran los fosfolípidos, los esfingolípidos, los ácidos grasos y las oxilipinas (Wang, 2004).

### B.1. Fosfolípidos membranales y su importancia en la respuesta de defensa de las plantas ante patógenos.

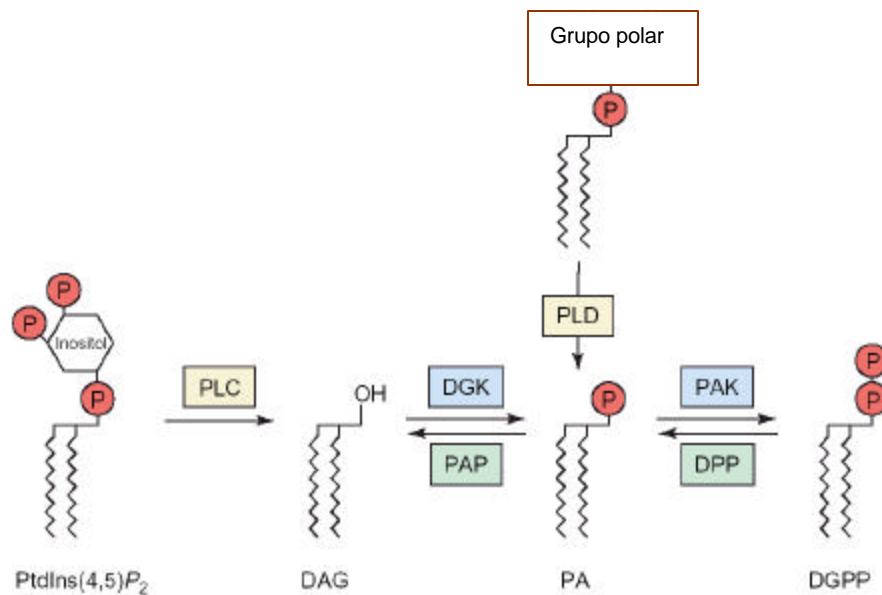
Los fosfolípidos son muy abundantes en la membrana plasmática y sus niveles varían desde 25 mol% hasta 60 mol% dependiendo de la especie y tejido. El catabolismo de fosfolípidos membranales origina moléculas con actividad biológica, como el ácido fosfatídico (PA), los ácidos grasos libres y el diacilglicerol (DAG). Este catabolismo es dirigido principalmente por una familia de hidrolasas denominadas fosfolipasas. Las fosfolipasas se clasifican en los grupos A, C y D, dependiendo del sitio de corte en la estructura del fosfolípido (Figura 3). Los productos originados por la actividad de las fosfolipasas pueden ser también sustratos de cinasas y/o fosfatasas para generar otros segundos mensajeros con actividad biológica (Weber, 2002, Wang, 2004).



**Figura 3.** Esquema de las posiciones en las que hidrolizan las diferentes fosfolipasas en los fosfolípidos membranales.

### B.1.1. Vía de la fosfolipasa C (PLC) y patogénesis.

La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis de fofatidilinositol (PI) 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) generando dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> difunde en el citosol donde media la liberación de Ca<sup>2+</sup> a partir de reservas intracelulares, mientras que el DAG permanece en la membrana. En células animales el DAG activa a algunos miembros de la familia de proteínas cinasas C (PKC), pero su función en plantas es incierta pues no se han identificado homólogos de PKC. Sin embargo, si el DAG es fosforilado por la diacilglicerol cinasa (DGK), se genera PA, un intermediario bioactivo (Meijer y Munnik, 2003). En varios sistemas de interacción planta - patógeno se ha demostrado que se activa la vía PLC-DGK (Figura 4). Se proponen varios mecanismos para explicar la actividad biológica del PA: 1) su acumulación crea una sitio de reclutamiento de enzimas citosólicas a dominios membranales específicos, 2) que su unión a enzimas induce un cambio conformacional en éstas incrementando su afinidad por el sustrato y 3) el PA concentra enzimas citosólicas aumentando las probabilidades de interacción proteína-proteína para regular alguna actividad (Munnik, 2001).



**Figura 4.** Generación de ácido fosfatídico (PA) por acción directa de la fosfolipasa D (PLD) o indirecta por la fosfolipasa C (PLC) y DGK: diacilglicerol cinasa, PAP: fosfatasa (Testerink y Munnik, 2005).



### **B.1.2. Vía de la fosfolipasa D (PLD) y patogénesis.**

La fosfolipasa D hidroliza fosfolípidos en el enlace fosfodiéster generando directamente PA y un grupo de cabeza polar como la colina (Figura 3). En plantas, se ha demostrado que se incrementan los niveles de PA por la acción de una fosfolipasa D durante estrés osmótico (Munnik, *et al*; 2000), estrés por herida (Lee *et al*; 1997) y en interacciones planta patógeno (Young *et al*; 1996, Laxalt *et al*; 2001, De Torres *et al*; 2002). En *Arabidopsis* inoculadas con *Pseudomonas syringae*, las 4 isoformas de una PLD (**a1**, **b1**, **g1** y **g2**) se expresan con temporalidad variable (desde 60 min hasta 4 h), lo que sugiere una regulación fina para activar cada una de las isoformas (De Torres *et al*; 2002). En hojas de tomate infiltradas con xilanasa, un elicitor fúngico, se elevan los niveles del transcrito de la isoforma *PLDb1* (Laxalt *et al*; 2001).

### **B.1.3. Vía de las fosfolipasas A (PLA) y patogénesis.**

La superfamilia de fosfolipasas A (PLA) tiene dos subtipos; las fosfolipasas A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) y las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que catalizan la hidrólisis de glicerofosfolípidos membranales en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2, respectivamente (Figura 3). Esta reacción genera ácidos grasos libres (FFA), como el ácido linoléico y linolénico que de forma subsecuente puede convertirse en compuestos con actividad biológica como las oxilipinas. Los lisofosfolípidos, que son los otros productos generados por las PLAs, como lisofosfatidilcolina (LPC) y lisofosfatidiletanolamina (LPE), son también compuestos biológicamente activos en varios procesos celulares (Ryu, 2004). Durante el desarrollo de la RH por TMV en hojas de tabaco, se observa un rápido incremento entre las 36 y 72 horas postinoculación en la actividad de una PLA<sub>2</sub> soluble. Esta acumulación precede la formación de zonas necróticas características de una HR, así como a la acumulación de oxilipinas como el ácido jasmónico (Dhondt *et al*; 2000).

### **B.2. Ácidos grasos libres.**

Los ácidos grasos libres se generan principalmente por la actividad de una PLA, y pueden funcionar como sustratos para generar oxilipinas (ver apartado B.3). También se les ha atribuido una función de segundos mensajeros durante una interacción planta patógeno (Wang, 2004). Un estudio en *Eshscholtzia californica* muestra que durante el

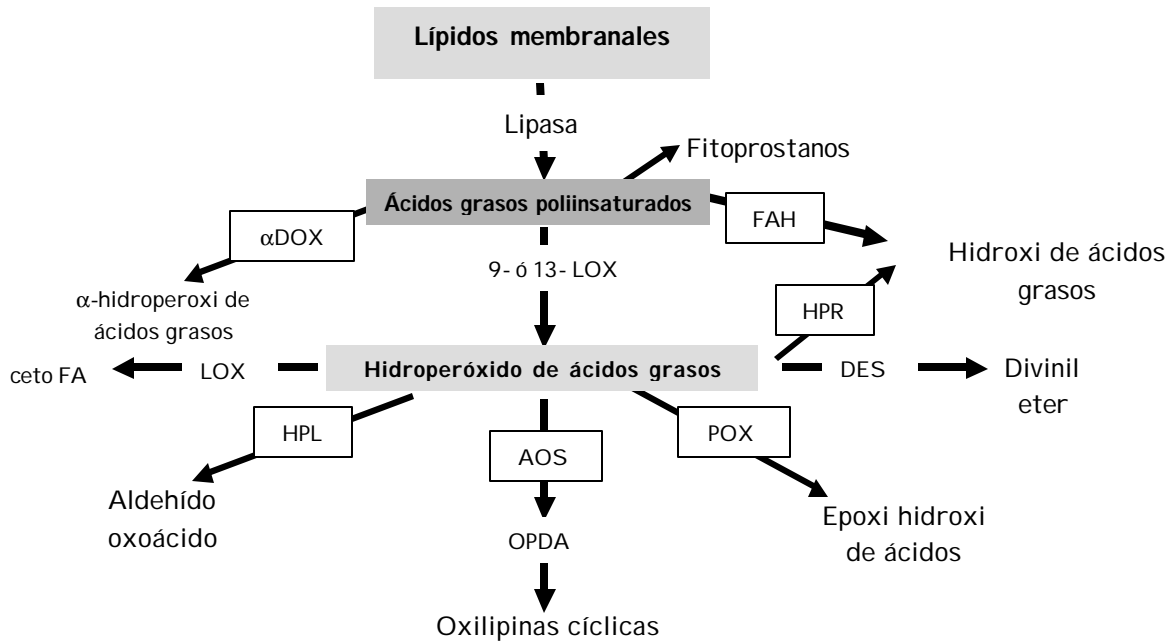
tratamiento con un extracto de levadura, los niveles de ácido  $\alpha$ -linolénico incrementan durante las primeras 3 h posterior al tratamiento (Mueller *et al*; 1993). En cultivos celulares de perejil tratados con el elicitor Pep25 derivado del oomiceto *Phytophthora*, se induce la expresión de una desaturasa  $\omega$ -3 de ácidos grasos (Kirsch *et al*; 1997). Esta desaturasa es un ortólogo de las proteínas FAD7 (fatty acid desaturase 7) y FAD8 de *Arabidopsis*, las cuales participan en la síntesis de los ácidos grasos trienólicos 16:3 y 18:3. La función de estas enzimas en la respuesta de defensa se ha demostrado con la doble mutante *fad7fad8* que desarrolla una ineficiente respuesta de resistencia contra cepas avirulentas de *P. syringae* y no presenta un estallido oxidativo (Yaeno *et al*; 2004).

### B.3. Oxilipinas

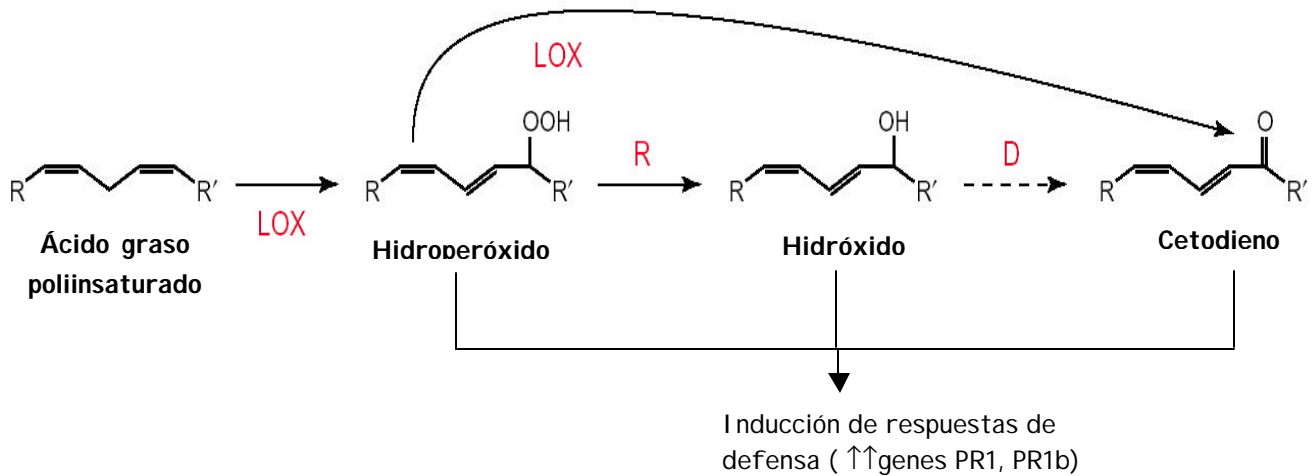
La oxilipinas son una clase de compuestos biológicamente activos que se generan durante el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados por la acción coordinada de fosfolipasas, lipooxigenasas y un grupo de citocromos P450, incluyendo la aleno óxido sintasa (AOS) y la hidroperóxido liasa (HPL) (Zhao *et al*; 2005) (Figura 5). El punto de inicio en la síntesis de oxilipinas es catalizada por lipooxigenasas (LOXs), que adicionan oxígeno molecular a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para formar el correspondiente hidroperóxido del ácido graso que son sustratos para otras enzimas. De acuerdo a su regioespecificidad las LOXs se han clasificado en 9- y 13-LOX que forman 9- o 13-hidroperóxidos respectivamente. Los hidroperoxi, hidroxi y ceto ácidos grasos (Figura 6) son productos derivados de la actividad de LOX, y se acumulan en plantas en respuestas al ataque de patógenos (Weber, 2002). Por ejemplo, cuando *Arabidopsis* se infiltra con *P.syringae*, se acumulan aproximadamente 50 veces más con respecto al control los ácidos grasos cetodienólicos (Vollenweider *et al*; 2000). En hojas de cebada tratadas con ácido salicílico (SA) se observa la acumulación del ácido 13(s)-hidroxi octadecatrienólico (13-HOTrE) y la aplicación de este compuesto de manera exógena, induce la expresión del gen *PR1b*, lo que sugiere que el derivado del ácido graso está involucrado en la señalización por SA en cebada (Weichert *et al*; 1999).

Los hidroxiperóxidos de ácidos grasos producidos por LOX son sustratos de varias enzimas que contribuyen a la síntesis de jasmonatos, de compuestos con

actividad antifúngica como aldehídos, ésteres divinílicos y de otras moléculas volátiles con actividad insecticida o antimicrobiana.



**Figura 5. Síntesis de oxilipinas en plantas.** AOS: aleno oxido sintasa,  $\alpha$ DOX:  $\alpha$ -dioxigenasa; DES:divinil éter sintasa; FAH: hidroxilasa de ácido graso; HPL: hidroperóxido liasa; HPR: hidroperóxido reductasa; LOX: lipooxigenasa; OPDA:ácido 12-oxofitodienoico; POX: perooxigenasa (Shah 2005).



**Figura 6.** Productos derivados de la actividad de LOX.

#### **B.4. Esfingolípidos**

Los esfingolípidos complejos son componentes esenciales y abundantes de todos los organismos eucariontes y de algunas bacterias. Confieren importantes propiedades estructurales a la membrana plasmática y se ha demostrado que, en asociación con el colesterol, se requieren para la formación de microdominios de membrana que están implicados en la transducción de señales en mamíferos, protozoarios y plantas (Hoessli *et al*; 2001).

Recientemente se reportó evidencia de que los esfingolípidos participan en la señalización durante la respuesta de las plantas a la invasión de microorganismos patógenos (Koga *et al*; 1998, Birch *et al*; 1999, Brodersen *et al*; 2002) por lo que a continuación se presentará una descripción general de la biosíntesis de estos compuestos y las evidencias experimentales de su función como moléculas de señalización.

### **C. ESFINGOLÍPIDOS**

#### **C.1 Generalidades.**

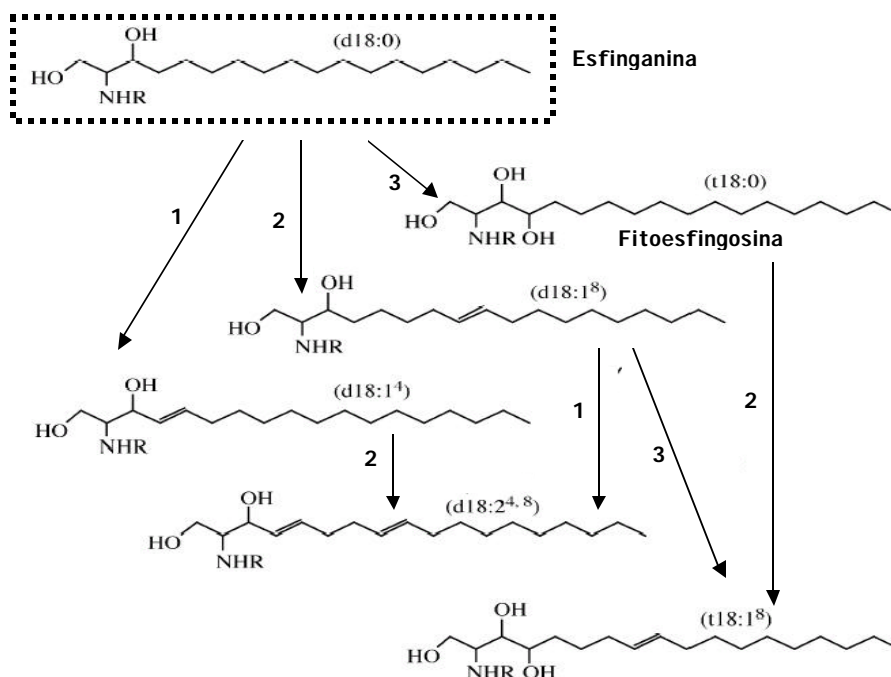
Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas cuya región hidrofóbica corresponde a un amino alcohol de cadena larga denominado base esfingoidea (2-amino-1,3-dihidroxicano). Ésta se esterifica a un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono mediante un enlace amida en el C-2 para formar la ceramida, a la cual se le pueden unir residuos de azúcar o grupos fosfato que constituyen la región hidrofílica (Futerman *et al*; 2004, Sperling y Heinz, 2003).

Los esfingolípidos son un grupo de moléculas con una gran diversidad estructural. Esta diversidad se presenta debido a las combinaciones que se dan entre los diferentes grupos polares, y el esqueleto de ceramida que puede estar formada por diferentes bases esfingoideas y ácidos grasos, que pueden variar en la longitud de la cadena, grados de insaturación e hidroxilaciones (Dunn *et al*; 2004).

##### **C.1.1. Diversidad estructural**

En mamíferos, la base esfingoidea (LCB) más abundante es la esfingosina (*E*)-4-esfingenina, mientras que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es la fitoesfingosina (4-hidroxisfinganina). En contraste, la composición de las bases esfingoideas en plantas es más variable, la mayoría se derivan de la D-eritro-

esfinganina (DHS) como los isómeros *cis* y *trans* de la 4,8-esfingadienina (d18:2), 4-dihidroxi-8-esfingenina (t18:1) y la 8-esfingenina (d18:1), las cuales son las más abundantes. Para formar estas bases derivadas de la DHS se requiere de la actividad de tres enzimas: la LCB  $\Delta^4$ -desaturasa, LCB  $\Delta^8$ -desaturasa y LCB 4-hidroxilasa (Figura 7).



**Figura 7. Diversidad estructural de LCBs en plantas. (1) LCB  $\Delta^4$ -desaturasa, (2) LCB 4-hidroxilasa. (3) esfingosina-cinasa. (Modificado de Dunn *et al*, 2004).**

## C.2. Topología y Biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos.

A diferencia de la síntesis de otros lípidos membranales como los esteroides y los glicerolípidos que ocurre totalmente en el retículo endoplásmico (RE), los primeros pasos en la biosíntesis de esfingolípidos se realizan en el RE pero los pasos finales se llevan a cabo en el aparato de Golgi. Además, algunos pasos específicos de la síntesis ocurren en superficies opuestas de estos organelos (lumenal contra citosólica) (Futerman y Riezman, 2005).

La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos (Figura 8) comienza con la condensación de la L-serina con un ácido graso activado por CoA, generalmente palmitoil CoA, para generar 3-cetoesfinganina, CoA y CO<sub>2</sub>. Esta reacción se cataliza por la serina palmitoil transferasa (SPT), una enzima heterodimérica formada por las subunidades LCB1 y LCB2. (Hanada *et al*; 2000a, Hanada *et al*; 2003). Posteriormente, la 3-cetoesfinganina se reduce por la 3-cetoesfinganina reductasa (3KSR) dependiente

de NADPH para formar la esfinganina. El sitio catalítico de esta enzima es sensible a la actividad de proteasas en microsomas intactos por lo que probablemente se encuentra orientado hacia el citosol (Mandon *et al*; 1992). De esta forma no existen problemas topológicos con las dos primeras enzimas de la vía (Futerman y Riezman, 2005).

En el siguiente paso de la biosíntesis, el grupo amino de la esfinganina es acilado con un ácido graso por la N-aciltransferasa (ceramida sintasa en mamíferos) para formar la ceramida. En levadura, esta reacción puede ser catalizada por dos N-aciltransferasas similares: Lac1 y Lag1, ambas requieren un acil-coA de cadena larga. En *A. thaliana* se han encontrado dos cDNAs con alta similitud a Lag1 (AF198179, AF198180) que podrían codificar para dos esfinganinas N-aciltransferasas. La actividad de esta enzima se demostró en membranas microsomales de calabaza, frijol y maíz, sugiriendo localización en membrana del RE (Lynch *et al*; 1993). En levaduras y plantas *in vitro* la síntesis de ceramida también puede ocurrir por una vía independiente de acil-coA utilizando ácidos grasos libres. En levadura, esta actividad está mediada por la reacción reversible de las ceramidasa Ypc1 y Ydc1 (Mao *et al*; 2000). Una vez formada, la ceramida se transporta al aparato de Golgi en donde se le adicionan grupos polares para formar esfingolípidos complejos. La naturaleza hidrofóbica de la ceramida evita su transferencia espontánea a través del citosol, por lo que depende de componentes protéicos (Futerman y Hannun, 2004). En mamíferos se ha identificado una proteína denominada CERT (ceramide transport protein) que medía el transporte de la ceramida del RE al aparato de Golgi de una manera no vesicular (Hanada *et al*; 2003). CERT es una proteína citoplásmica con un dominio de unión a fosfatidilinositol-4-monofosfato y un dominio putativo para la transferencia de lípidos.

Las glucosilceramidas (cerebrósidos) son los esfingolípidos complejos más abundantes en plantas, y se forman por la adición de una molécula de glucosa a la ceramida. Esta reacción se cataliza por una glucosilceramida sintasa (GCS), la cual es una proteína membranal tipo III, con el C-terminal localizado en el lumen del aparato de Golgi. Su sitio activo está orientado hacia el citosol (Ichikawa y Hirabayashi, 1998). Se han encontrado homólogos de GCS en *Drosophila* (Kohyama-Koganeya, 2004, Hillig *et al*; 2003).

La esfinganina, además de ser acilada para formar la ceramida, puede ser fosforilada por una esfingosina cinasa (SK) para generar esfingosina 1-fosfato (S1P), un

importante lípido bioactivo. Las SKs fueron originalmente identificados en levadura como el producto de dos genes *Lcb4* y *Lcb5* (Nagiec *et al.*; 1998). *Lcb4p* se requiere principalmente para este proceso y se encuentra en la cara citoplásmica de membranas de RE, aparato de Golgi y endosomas (Funato *et al.*; 2003, Hait *et al.*; 2002). En mamíferos se han encontrado dos isoformas, SK1 y SK2 (Delon *et al.*; 2004, Igarashi *et al.*; 2003). Una vez formada la S1P en el citoplasma, puede ser procesada por dos enzimas: la S1P fosfatasa (SPP) que elimina el grupo fosfato, regenerando la esfinganina, o por la S1P liasa (SPL) la cual produce hexadecanal y etanolamina fosfato en el catabolismo de esfingolípidos (Kihara *et al.* 2003).

La función de los esfingolípidos y sus derivados en procesos celulares ha sido principalmente investigado en células de mamíferos. Los principales metabolitos esfingoideos que se han estudiado son la esfingosina, ceramida, y recientemente sus derivados fosforilados de ambos compuestos (Futerman y Hannun, 2004).

Los estudios en células de mamífero indican que la ceramida es el lípido central en el metabolismo de los esfingolípidos. La ceramida se produce *de novo* por la actividad de la SPT pero también se puede producir por la hidrólisis de la esfingomielina por acción de esfingomielinasas. La ceramida se fosforila por una ceramida cinasa (CERK) para formar la ceramida 1-fosfato (C1P), o bien se utiliza para la síntesis de esfingomielina o glicoesfingolípidos. La ceramida también se hidroliza por acción de las ceramidinasas para generar esfingosina y un ácido graso (Figura 8), (Chalfant y Spiegel; 2005).

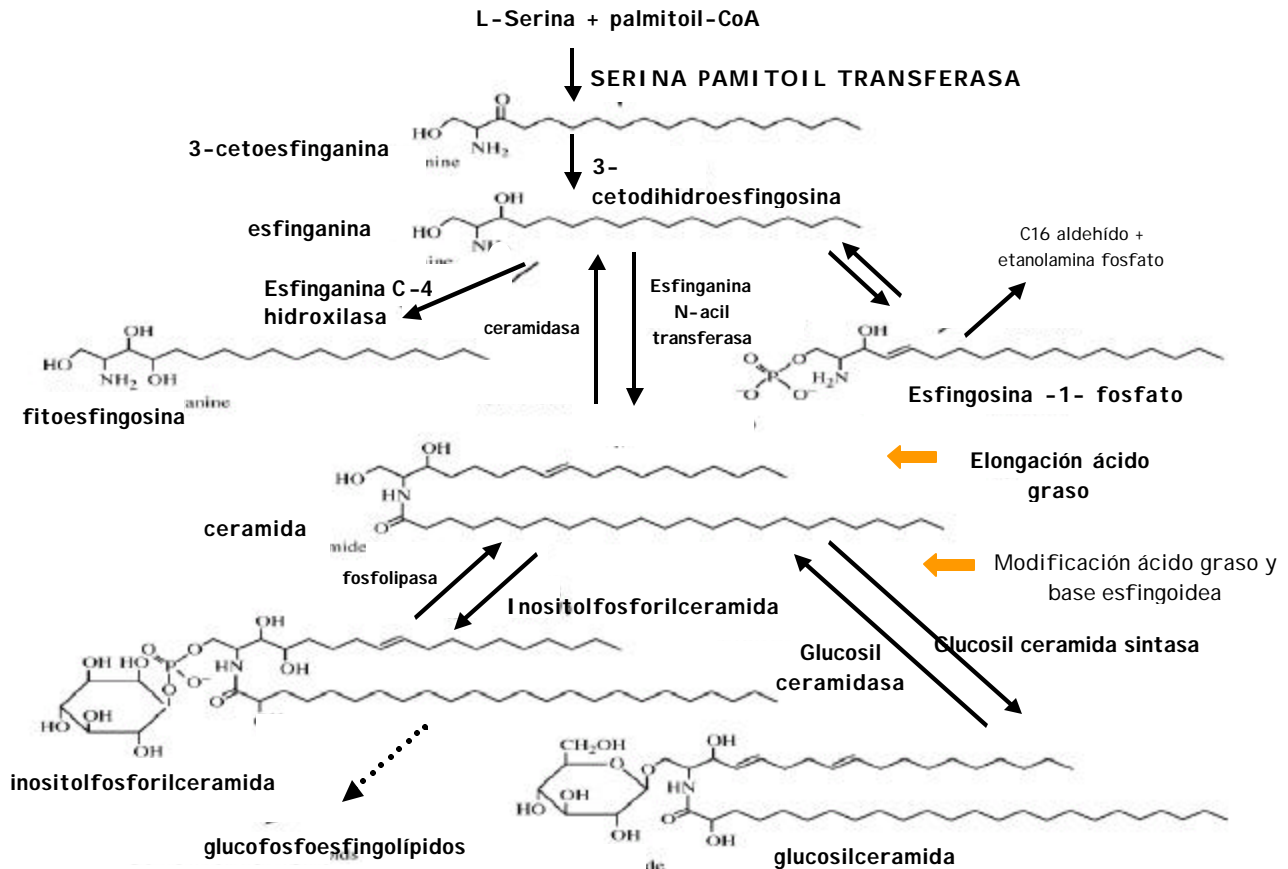


Figura 8. Biosíntesis *de novo* de esfingolípidos complejos en plantas. Modificado de Dunn *et al*; 2004.

### C.3. Actividad biológica de los esfingolípidos

#### C.3.1 Esfingolípidos y microdominios membranales

La caracterización y estudio de las balsas lipídicas ó “lipid rafts” en diferentes organismos eucariontes, incluyendo las plantas (Mongrand *et al*; 2004), han generado evidencias que sugieren que los esfingolípidos y sus intermediarios metabólicos poseen actividad biológica. Las balsas lipídicas son microdominios de membrana que contienen altas concentraciones de esteroides, como el colesterol y esfingolípidos, constituyendo regiones de membrana altamente ordenados y resistentes a la extracción con detergentes no-iónicos. Se aíslan como una fracción de baja densidad por ultracentrifugación. En estos microdominios de la membrana plasmática se segregan diferentes tipos de proteínas, muchas de las cuales están involucradas en la transducción de señales, lo que ha llevado a postular que dichos microdominios pueden actuar como plataformas de señalización y jugar un papel importante en funciones



celulares como apoptosis, adhesión y migración celular, así como tráfico vesicular (Brown 1998, Hoessli *et al*; 2001, Ishitsuka *et al*; 2005)

### **C.3.2. Funciones biológicas de los esfingolípidos en mamíferos**

#### **C.3.2.1 Funciones biológicas de la esfingosina**

El primer blanco que se descubrió para la esfingosina fue la proteína cinasa C (Hannun *et al*; 1986) que se inhibe por esta base esfingoidea con una  $IC_{50}$  de 100  $\mu$ M. Los estudios subsecuentes demuestran que la esfingosina también tiene efecto en otras proteínas cinasas. La esfingosina inhibe a la cinasa dependiente de calmodulina (Jefferson *et al*; 1988) y el receptor de insulina tirosina/cinasa (Arnold *et al*; 1991) y activa a la diacilglicerol cinasa y a la cinasa de caseína II (Yamada *et al*; 1993, McDonald *et al*; 1991).

Por otro lado, también se han purificado y caracterizado cinasas de proteínas que son dependientes de esfingosina (SDKs). Estas enzimas fosforilan *in vitro* una gran variedad de proteínas celulares como, la proteína 14-3-3, las chaperonas calreticulina y disulfuro isomerasa (PDI), así como algunas proteínas de choque térmico (Megidish *et al*; 1995, 1998 y 1999).

#### **C.3.2.2 Funciones biológicas de la ceramida**

Los niveles de ceramida se pueden incrementar en la célula, ya sea por la hidrólisis de esfingomielina o síntesis *de novo*. Este incremento se ha observado en respuesta a  $TNF\alpha$ , interferón- $\gamma$ ,  $1\alpha$ , 25-dihidroxitamina  $D_3$ , interleucina 1 (IL-1), luz UV, calor, agentes quimioterapéuticos y antígeno FAS (Hannun y Obeid, 2002; Pettus *et al*; 2002). El primer evento que se detecta después de la acumulación de ceramida es la activación de una cascada de MAPK, específicamente la vía de la MAPK ERK 1 y 2. También se ha encontrado que regula positivamente a la proteína cinasa activada por estrés SAPK/JNK en varios tipos celulares como células HL-60, fibroblastos, línea celular de macrófagos y células epiteliales (Westwick *et al*; 1995, Verheij *et al*; 1996, Pyne *et al*; 1996). Estas vías de señalización regulan aspectos fundamentales de la función, metabolismo y secreción celular así como la expresión de genes (Huwiler *et al*; 2000).

Otros blancos inmediatos de la ceramida son:

- 1) Una cinasa activada por ceramida de 97 kDa (CAPK) (Mathias *et al*; 1991), la cual se ha sugerido que es idéntica al supresor de Ras (KSR) (Zhang *et al*; 1997).
- 2) Fosfatasas de proteínas activadas por ceramida (CAPP) (Dobrowsky *et al*; 1992). La ceramida es un activador de estas fosfatasas (Ser/Thr) de proteínas (también conocidas como CAPPs), y que se ha relacionado con la función de la ceramida para inducir apoptosis (Chalfant *et al*; 2002).

### **C.3.3. Funciones biológicas de los esfingolípidos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.**

Los esfingolípidos son esenciales para el crecimiento celular y sobrevivencia de células de levadura dado que la inactivación de la biosíntesis es letal para estas células (Obeid *et al*; 2002). Las mutantes en cualquiera de las dos subunidades de la SPT no son viables, a menos que se les proporcione una fuente exógena de bases esfingoideas (Dickson *et al*; 1990). Por otro lado, algunos de los intermediarios, como la ceramida, bases esfingoideas (Mao *et al*; 1997, Saba *et al*; 1997) y bases esfingoideas fosforiladas tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de la levadura. A concentraciones micromolares (1 - 20  $\mu$ M) de ceramida C2 se inhibe la proliferación de las células de levadura, que se detienen en la fase G1 del ciclo celular y ocurre un incremento importante en la actividad de fosfatasas de proteínas activadas por ceramida (Fishbein *et al*; 1993, Nickels y Broach, 1996).

### **C.3.4. Funciones biológicas de los esfingolípidos en plantas**

En comparación con mamíferos y levaduras, existe poca investigación acerca de la función de los esfingolípidos en plantas. Su función en señalización se ha mostrado en células guardia durante estrés por sequía en *Commelina communis*. Como respuesta a estrés hídrico; se incrementan los niveles de la fitohormona ABA que estimula la producción de S1P que induce un incremento en la concentración de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  en las células guardia y, como consecuencia, se reduce la apertura del poro estomatal (Ng *et al*; 2001). Otras evidencias sugieren que ABA estimula a la esfingosina cinasa para generar S1P, pues al inhibir a esta enzima con N,N-dimetilesfingosina (DMS) se atenúa

el efecto de la hormona sobre la actividad de canales de  $K^+$  y aniónicos que mantienen el turgor de células guardia en *A. thaliana* (Coursol *et al*; 2003). Este efecto de la S1P parece estar mediado por proteínas G heterotriméricas ya que en plantas de *A. thaliana* con una mutación en un gen de la subunidad  $\alpha$ , GPA1, de una proteína G heterotrimérica no ocurre esta regulación estomatal por el esfingolípido (Coursol *et al*; 2003). Esto resulta interesante puesto que en mamíferos el receptor de la S1P está acoplada a proteínas G en la transducción de la señal.

Las proteínas G también se activan en hojas de plantas de arroz cuando son infiltradas con elicitores de naturaleza esfingolípídica (SE/glicosilceramidas) purificados de un hongo patógeno. La activación de una MAPK en la señalización de respuesta depende de OsRac1, una proteína G pequeña y también de una proteína G heterotrimérica (Lieberherr *et al*; 2005).

Otro intermediario del metabolismo de esfingolípidos que posee actividad biológica en plantas es la ceramida. La principal evidencia de su función como molécula de señalización en la muerte celular programada en plantas (PCD) proviene de la caracterización de la mutante ACD5 (*accelerated cell death 5*) de *Arabidopsis*. Esta mutante tiene un desarrollo normal, pero la planta adulta muestra regiones de muerte celular en las hojas y este síntoma se exagera cuando se inocula con *P. syringae*. Este fenotipo se puede explicar por la posible acumulación de ceramidas, puesto que la mutación se encuentra en un gen que codifica para una ceramida cinasa que contribuye a mantener un balance entre esfingolípidos fosforilados y no fosforilados (Liang *et al*; 2003).

### **C.3.4.1 Esfingolípidos y patogénesis**

Existen evidencias que sugieren que los esfingolípidos complejos y sus intermediarios están involucrados en la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de un patógeno. Koga y colaboradores (1998) demostraron que esfingolípidos complejos (cerebrósidos) purificados del hongo *Magnaporthe grisea* tienen actividad elicitora, pues al aplicarlos exógenamente en plantas de arroz, inducen respuesta de hipersensibilidad y acumulación de fitoalexinas como la momilactona. Otra evidencia de la participación del metabolismo de esfingolípidos en una respuesta de defensa de las plantas es el hallazgo de que durante la respuesta de hipersensibilidad al hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* en una variedad de papa resistente al patógeno, se

induce la expresión del gen *LCB2*. Esta secuencia tiene una alta similitud (75-81%) con otras *LCB2* de la serina palmitoil transferasa (SPT), de otras especies y que es la enzima que cataliza la primera reacción de la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos (Birch *et al*; 1999).

La caracterización de una mutante de *Arabidopsis* sugiere que el transporte intracelular de esfingolípidos está relacionado en una respuesta de defensa (Brodersen *et al*; 2002). Esta mutante, denominada *acd11* (*accelerated-cell-death11*), muestra muerte celular durante el desarrollo y una expresión constitutiva de genes PR, acumulación de fitoalexinas y deposición de callosa. El gen *ACD11* codifica para una proteína homóloga de mamíferos que transfiere glicolípidos y que muestra una gran afinidad para transportar esfingosina *in vitro*. Estos resultados sugieren que una alteración en la distribución de bases esfingoideas entre membranas posiblemente altera mecanismos de señalización asociados con defensa.

Debido a que la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos produce una gran cantidad de intermediarios bioactivos, esencialmente todas las enzimas que participan en esta ruta metabólica deben estar eficientemente coordinadas y reguladas. En especial la primera enzima de la ruta biosintética: **la serina palmitoil transferasa (SPT)**, pues una regulación a este nivel parece ser relevante en controlar la acumulación de intermediarios incluyendo bases esfingoideas y ceramida (Hanada, 2003).

## D. LA SERINA PALMITOIL TRANSFERASA (SPT)

### D.1. Características generales.

La SPT es un heterodímero compuesto por 2 subunidades: LCB1 y LCB2 y su asociación se requiere para la actividad enzimática, aunque la subunidad catalítica reside en LCB2. En *Saccharomyces cerevisiae*, los genes *lcb1* y *lcb2* se aislaron por complementación de cepas mutantes defectuosas en la actividad de SPT que requieren una fuente exógena de bases esfingoideas para crecer (Nagiec *et al*; 1994). Los genes *lcb1* y *lcb2* en mamíferos codifican para proteínas de 53 y 63 KDa respectivamente y muestran un 20% de similitud. La SPT es una enzima integral de la membrana del RE con su sitio activo expuesto hacia el citoplasma. Los estudios de predicción de hidrofobicidad para ambas subunidades de mamíferos sugieren que ambas proteínas

tienen un solo paso transmembranal hacia el C-terminal (Yasuda *et al*; 2003) mientras que los análisis de secuencia de la SPT de levadura indican que podría tener hasta tres pasos transmembranales (Han *et al*; 2004), lo que también coincide con la predicción de la estructura de la SPT de *Arabidopsis* (Tamura *et al*; 2001). Estos datos sugieren que las subunidades LCB1 y LCB2 interactúan en el citosol. La SPT se purificó en su forma activa a partir de células de ovario de hamster chino (CHO) por cromatografía de afinidad y se determinó que la relación de las dos subunidades en el heterodímero es 1:1 (Hanada *et al*; 2000a).

La actividad de la SPT en plantas se determinó en fracciones microsomales de calabaza (*Cucurbita pepo*) por incorporación de L-[<sup>3</sup>H]-serina en la 3-cetoesfingina. La actividad enzimática tiene un pH óptimo de 7.6 y la Km aparente para la L-serina es aproximadamente 1.8 mM (Lynch *et al*; 1993). En *Arabidopsis* el cDNA de LCB2 tiene un marco abierto de lectura de 1,467 nucleótidos que codifica una proteína de 489 aminoácidos y se predicen tres hélices transmembranales. El análisis del genoma de esta planta predice un segundo gen *LCB2* y un único gen *LCB1*. La expresión de una proteína de fusión LCB2-GFP en células de tabaco BY-2 demuestra que AtLCB2 se localiza en el retículo endoplásmico (Tamura *et al*; 2001).

### D.2. Mecanismo catalítico de la SPT.

La SPT cataliza la condensación de carboxil CoA tioéster con L-serina para generar una  $\alpha$ -oxoamina en una reacción dependiente de piridoxal fosfato (PLP). El sitio de unión de este cofactor está conservado entre las  $\alpha$ -oxoaminas sintetas en un motivo -GTFTKSFG- que se encuentra únicamente en la subunidad LCB2 por lo que se ha sugerido que la subunidad LCB2 es la subunidad catalítica (Nagiec *et al*; 1994). Durante la condensación de la serina y el palmitoil-coA por la SPT el grupo carboxilo del aminoácido es eliminado en una reacción que inicia con la formación de una base de Schiff entre la L-serina y el PLP. En seguida, se elimina el  $\alpha$ -hidrógeno de la L-serina, que permite el ataque nucleofílico del palmitoil CoA para formar un intermediario acilado. Después ocurre la descarboxilación y la reprotonación del  $\alpha$ -carbanión para liberar 3-cetoesfingina por la enzima (Hanada, 2003).

### D.3. Regulación transcripcional y post traduccional de la SPT.

Se ha observado que los niveles de transcrito de las dos subunidades LCB varían en respuesta a estímulos extracelulares. En células  $\beta$  de ratas prediabéticas hay un incremento en los niveles de ceramida que correlaciona con un aumento de 2 a 3 veces del ARNm de la SPT aunque no especifican si son ambas subunidades. Esto va acompañado con una mayor incorporación de [ $^3$ H]L-serina, probablemente por activación de la enzima (Shimabukuro *et al*; 1998). En queratinocitos humanos, en respuesta a irradiación con luz hay un incremento del 70% después de 48 h de exposición del transcrito *lcb2*, mientras que el transcrito *lcb1* se mantiene sin cambios. Este incremento es suficiente para aumentar la cantidad de proteína de LCB2 y la actividad de la SPT 50% en este sistema (Farrell *et al*; 1998).

La aplicación de una endotoxina (lipopolisacárido) en células de tejido extrahepático de hamster induce un incremento del 100% del transcrito de *LCB2* con respecto al control, y que precede temporalmente al aumento en la actividad de la SPT. (Memon *et al*; 1998).

La actividad de la SPT también se regula a nivel postraduccional. Las células PCC7-Mz1 de carcinoma de ratón detienen su proliferación y comienza una diferenciación neuronal cuando son tratadas con ácido retinóico (RA), evento asociado a un mecanismo de apoptosis. En estas células se incrementan los niveles de ceramida de manera paralela a la actividad de la SPT sin que se presente un incremento en los niveles de transcritos de las dos subunidades (Herget *et al*; 2000). Resultados similares se encontraron en células Molt-4 de humano donde también se evaluó la apoptosis generada por ceramida *de novo* (Perry *et al*; 2000).

Se ha propuesto que la LCB1 tiene una función regulatoria al estabilizar el heterodímero, pues en experimentos de expresión transitoria en células CHO, la acumulación de LCB2 solamente ocurre si hay co-expresión de LCB1. En cambio, los niveles de LCB1 se pueden incrementar en ausencia de la subunidad catalítica (Yasuda *et al*; 2003).

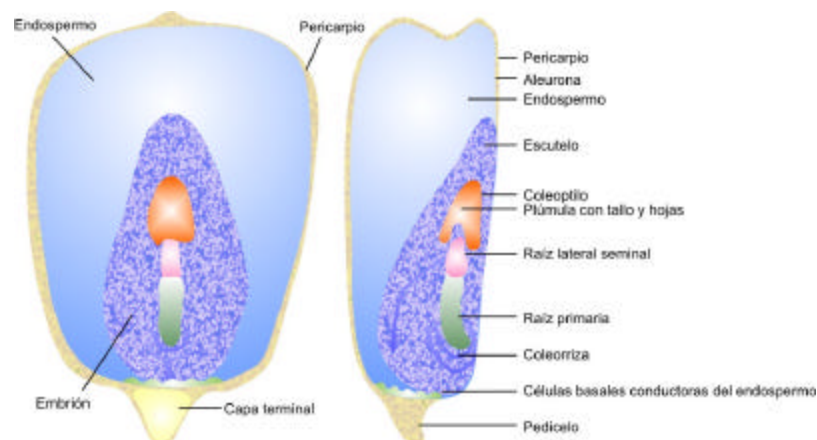
Otro mecanismo regulatorio podría estar operando también en *Saccharomyces cerevisiae* ya que se encontró una proteína ácida, Tsc3, asociada al complejo LCB1/LCB2, y que no es esencial para la actividad enzimática pero sí se requiere para alcanzar una actividad óptima (Gable *et al*; 2000).

## E. GERMINACIÓN

### E.1. Estructura de la semilla de maíz.

El fruto de la planta del maíz se conoce como grano, botánicamente es un cariósido y agrícolamente se le conoce como semilla. Durante la formación del cigoto, se originan las estructuras fundamentales del grano de maíz que son el endospermo y el embrión. El endospermo contiene las reservas de almidón que son consumidas durante la germinación (Reyes, 1990).

El embrión (Figura 9) está constituido por un eje embrionario que es parte esencial en la semilla ya que contiene las estructuras necesarias para generar una planta nueva y un cotiledón, también llamado escutelo, el cual es un tejido que almacena nutrientes y que absorbe los nutrimentos generados en el endospermo cuando ocurre la movilización de reservas por acción enzimática. Las tres regiones diferenciadas que forman al eje embrionario son: la radícula, el mesocotilo y la plúmula ó primeras hojas verdaderas. La plúmula está envuelta en una estructura denominada coleoptilo y la radícula está cubierta por la colerorriza, ambas estructuras protegen a estos tejidos durante la germinación (Kiesselbach, 1999).



**Figura 9.** Estructura de la semilla de maíz. A. Corte longitudinal y B. Corte transversal.

### E.2. Definición y generalidades de la germinación.

La germinación se define como el proceso que comienza con la imbibición, es decir cuando las semillas se rehidratan y termina con la elongación de la radícula (Bewley,

1997). La germinación está influenciada por factores ambientales como la temperatura y la disponibilidad de agua, oxígeno y luz. Asimismo, factores intrínsecos como dormancia, permeabilidad de la testa y la obstrucción del endospermo para el desarrollo de la radícula también afectan la germinación (Bove *et al*; 2001). Los procesos fisiológicos de crecimiento exigen actividades metabólicas aceleradas y la fase inicial de la germinación consiste principalmente en la activación de los procesos por aumentos en humedad y actividad respiratoria de la semilla. La primera condición para que la germinación ocurra, siendo la semilla viable y sin dormancia, es la disponibilidad de agua para la rehidratación.

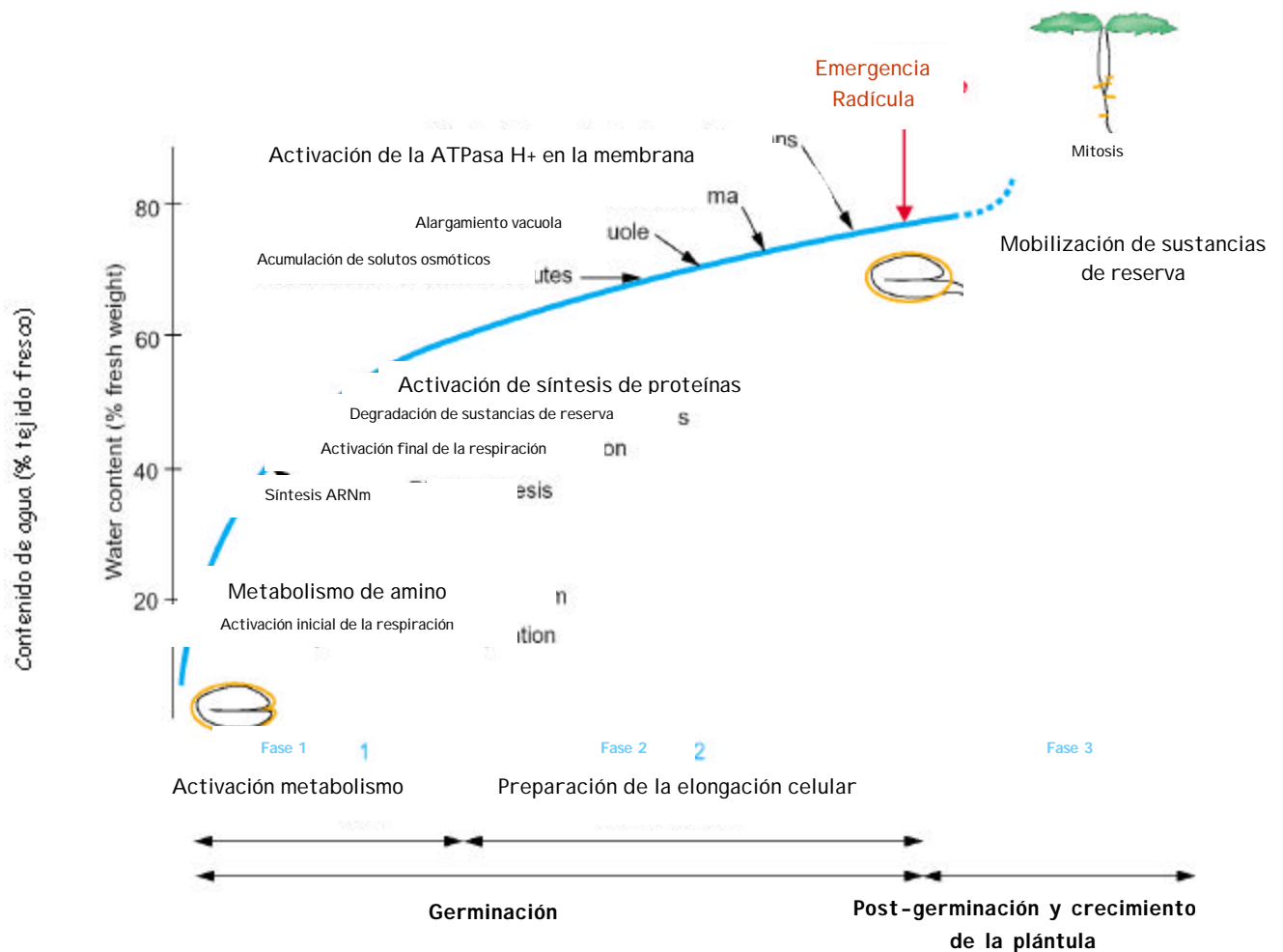
La toma de agua bajo condiciones óptimas tiene un comportamiento trifásico (Figura 10). La primera **fase I o etapa de imbibición**, se caracteriza por una toma de agua rápida de tal manera que se incrementa el contenido de humedad de 12-15% hasta 50-60%. En esta fase se reinicia el metabolismo básico paso a paso con el aumento gradual de la hidratación. La velocidad de imbibición de agua varía con la especie, permeabilidad del tegumento, disponibilidad de agua, temperatura, presión hidrostática, área de contacto semilla-agua, fuerzas intermoleculares, composición química y condición fisiológica. Cuando el nivel de la hidratación excede del 60%, el índice de la hidratación se retarda y comienza la **fase 2 o germinación** y entonces se preparan mecanismos fisiológicos para dar paso al crecimiento celular en los ejes embrionarios culminando con el comienzo de la elongación de la radícula. Las sustancias osmóticamente activas, como azúcares, aminoácidos y cationes  $K^+$  se acumulan y promueven la acidificación de la pared celular, lo que conduce a una pérdida de los enlaces entre los polímeros de la membrana celular. Estos eventos coinciden con la activación de la ATPasa de  $H^+$  y el debilitamiento de los tejidos circundantes como el endospermo, mientras que los ejes embrionarios se elongan y termina la germinación para dar inicio a la **fase III o crecimiento** que se caracteriza por un nuevo aumento en la toma de agua.

Las sustancias de reserva (lípidos, proteínas o almidón) que se encuentran en el cotiledón del embrión y/o en el endospermo se empezarán a mover antes de que termine la germinación y también son usadas en eventos post-germinación para el mantenimiento de la plántula en sus etapas tempranas del crecimiento, antes de que



llegue a ser autótrofa. La primera división celular (mitosis) ocurre en la fase post-germinativa (Bove *et al*; 2001).

Al iniciarse la germinación de las semillas, y cuando las células están suficientemente hidratadas, se produce una activación de la síntesis protéica, y por lo tanto, la formación de enzimas hidrolíticas que son las que promueven la movilización de las sustancias de reserva del embrión y del endospermo. La movilización de las reservas requiere un proceso previo de hidrólisis para liberar los compuestos de menor peso molecular, que pueden ser utilizados durante el crecimiento inicial de la plántula. Además, en muchos casos, los productos de la hidrólisis sufren una serie de transformaciones metabólicas antes de ser transportados al eje embrionario en desarrollo.



**Figura 10.** Eventos celulares y metabólicos durante la toma de agua en la germinación. Modificada de Bove *et al*; 2001.

### **E.3. Germinación: estadio de desarrollo susceptible a la infección de microorganismos patógenos.**

Las plantas están expuestas a la infección de microorganismos patógenos durante todo su ciclo de vida y el estadio de germinación no es la excepción. Las semillas contienen una gran cantidad de nutrientes por lo que son un blanco atractivo para el ataque de microorganismos patógenos. La semilla, entonces debe tener la capacidad, una vez iniciada la germinación, de contar con mecanismos de defensa que le permitan, responder a la infección. Una de las primeras líneas de defensa preformadas que poseen las semillas son las defensinas (Lay y Anderson, 2005). Estos péptidos, aislados inicialmente de granos de trigo y cebada (Colilla *et al*; 1990, Méndez *et al*; 1990), son de bajo P.M. (~5 kDa, 45 a 54 aa) y ricos en cisteínas que contribuyen a estabilizar su estructura terciaria formando puentes disulfuro. La principal actividad de este grupo de moléculas es inhibir el crecimiento de un amplio espectro de hongos (Thevissen *et al*; 1997, Lay y Anderson 2005 y Osborn *et al*;1995), y aunque no se conoce a detalle como llevan a cabo su actividad, se sabe que actúan en los organismos patógenos a nivel de membrana plasmática. En granos de maíz en desarrollo se expresa fuertemente un transcrito que daría origen a un péptido de 5.5 kDa (ZmESR6) con alta similitud a otras defensinas. El péptido recombinante tiene actividad inhibitoria contra bacterias y hongos fitopatógenos (Balandin *et al*; 2005). Además de estos mecanismos de defensa preformados, hay respuestas inducidas cuando ocurre la invasión de un patógeno. En embriones de maíz germinados por 20 horas e inoculados con esporas de *F. verticillioides* se identificaron, por proteómica, la inducción de proteínas antioxidantes (glutati6n-S-transferasa, catalasa), proteínas de choque térmico, factores de iniciaci6n y PRs como glucanasas y quitinasas (Campo *et al*; 2004). Tambi6n, el transcrito de una prote6na PR del grupo 1 se acumula en semillas de ma6z infectadas con *F. verticillioides*, y se detecta a las 72 h de imbeci6n (Casacuberta *et al*; 1991). En otro trabajo se estudi6 la correlaci6n entre la infecci6n de *F. verticillioides* en semillas de ma6z y la acumulaci6n de PRms (pathogenesis-related maize seed). Se encontr6 una acumulaci6n de PRms en los tejidos infectados del embri6n, como la capa de aleurona y el escutelo por t6cnicas inmunohistoqu6micas,

además que estos tejidos presentaron cambios morfológicos como deposición de callosa en la pared celular (Murillo *et al*; 1999).

En este estadio de desarrollo el estallido oxidativo también se induce durante la respuesta de defensa en semillas de *Lupinus luteis* inoculadas con *Fusarium oxysporum*, hay un incremento del 24% en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, desde las 48 h y que se mantiene hasta las 96 h post-inoculación. Este incremento se asoció a la inducción de superóxido dismutasa y proteínas con actividad de catalasa (Morkunas *et al*; 2004).

### F. Patógenos del maíz

Un alto porcentaje de especies de hongos que infectan a los cereales pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (González *et al*; 2002). Las semillas y plántulas de maíz son particularmente susceptibles a la invasión por hongos que se adhieren al pericarpio, o que se encuentran en la semilla; o bien, son invadidas en el suelo por hongos saprófitos o que sobreviven como esporas en el suelo. La infección se facilita en suelos húmedos y en granos con fisuras. De importancia económica, son diversas especies de *Pythium* que infectan a la semilla en la germinación dañando a las plántulas. Otros hongos que también atacan a las plántulas pero que además son peligrosos en otros estadios de desarrollo, y atacan otros tejidos son: *Helminthosporium maydis*, *Nigrospora oryzae*, *Diplodia maydis* y *F. verticillioides* (Reyes, 1990). Estudios realizados para evaluar la micoflora presente en semillas de maíz reportan que *F. verticillioides* es el principal género que se aísla del maíz en climas templados (Abbas *et al*; 1988, Desjardins *et al*; 1994, Kedera *et al*; 1999, Almeida *et al*; 2002.).

#### F.1. Características generales de *F. verticillioides*

*F. verticillioides* (sinónimo de *Fusarium moniliforme*) es un hongo fitopatógeno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y está asociado principalmente al maíz, aunque también se ha reportado en otras especies de plantas como el sorgo, trigo, frijol y soya (Glenn *et al*; 2001). *F. verticillioides* es un hongo filamentoso y pertenece a la subdivisión *Deuteromycotina*. El género al que pertenece este hongo se caracteriza por la producción de estructuras de reproducción asexual denominadas macroconidias y que son producidas en forma de racimos, llamadas esporodoquios. Además de esta característica, *F. verticillioides* produce esporas

unicelulares en el micelio aéreo llamadas microconidias. *F. verticillioides* es productor de una gran variedad de micotoxinas que pueden tener efectos nocivos tanto en la salud de humanos como en la de animales que consumen granos o alimentos contaminados (Bakan *et al*; 2002).

### F.2. Proceso de infección en maíz

*F. verticillioides* puede infectar cualquier parte de la planta de maíz y causar pudrición de la raíz, el tallo, la mazorca y los granos. A través del aislamiento de este hongo en ciertas partes de la planta y por estudios histológicos y citológicos se han propuesto las vías de entrada de este patógeno en la planta de maíz. Las conidias de *F. verticillioides* pueden ser depositadas en la superficie de la hoja por acción del viento, la lluvia o también por medio de vectores como los insectos, para luego entrar en contacto con los nodos y así penetrar al tallo causando pudrición de éste (Nelson, 1992).

Para infectar a la mazorca, la vía de entrada es a través del estigma para entonces crecer y colonizar el pericarpio y ocasionalmente se ha encontrado en el embrión y endospermo. Las rutas que se han propuesto para la penetración de la hifa en el interior del grano son:

- a) Por fisuras en la superficie del pericarpio. Al dar origen a la plántula el micelio tendrá acceso directo al tejido del embrión.
- b) A través de pliegues y depresiones del tejido del pedicelo (Nelson, 1992):

La infección de la mazorca y el grano también ocurre como resultado de una infección sistémica. La combinación de una infección sistémica y local del hongo se puede presentar a través de los tejidos vasculares que se dirigen del tallo a las mazorcas. Cuando una semilla infectada germina, el hongo puede acceder a otros tejidos de la plántula en desarrollo y, dependiendo de las condiciones, matar a la planta o infectarla sistémicamente (Nelson, 1992). Un estudio con una cepa transgénica de *F. verticillioides* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), permitió rastrear al hongo en el tejido vegetal durante las etapas tempranas de la infección de la semilla en germinación y establecimiento de la plántula de maíz (Oren *et al*; 2003). El hongo invade todos los tejidos subterráneos de la planta pues se localiza principalmente en las

células del mesocotilo donde esporula. Asimismo, el micelio se detectó en otros tejidos de la planta, incluyendo el tallo, produciendo así una infección sistémica. Otro aspecto que hace del hongo un patógeno altamente exitoso es que durante su ciclo de vida, puede comportarse como parásito o saprófito. Durante su desarrollo saprofítico puede obtener nutrientes a partir de tejidos de maíz seco y posee una alta capacidad para sobrevivir en el suelo.

### F.3. *Fusarium verticillioides* y producción de toxinas

Una de característica fundamental de muchas cepas de *F. verticillioides* es su capacidad de producir micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios que frecuentemente tienen actividad fitotóxica y representan riesgo para animales y humanos cuando el maíz es empleado como alimento. Entre las toxinas que produce *F. verticillioides* se encuentran el ácido fusárico, la moniliformina, fusarinas y fumonisinas, siendo estas últimas las más abundantes e importantes por su toxicidad. La estructura química base de las fumonisinas consiste en un esqueleto de 20 carbonos con un origen poliétido, sustituido en varias posiciones por un grupo amino, de uno a tres grupos hidroxilos, 2 grupos metilo y 1 ó 2 grupos de ácido tricarbálico esterificado. La principal fumonisina, por la abundancia con que la producen las cepas de *F. verticillioides* es la B1 (Figura 11), ya que representa hasta el 70% de la producción total de fumonisinas (Seo *et al*; 2001). La capacidad de producir fumonisina B1 (FB1) es una característica muy variable entre las cepas de *F. verticillioides*. Por ejemplo, en el maíz en México se han aislado cepas que no producen la toxina, cepas que producen niveles bajos (0.1 µg/g de sustrato) y cepas que producen niveles muy altos de la toxina (5,800 µg/g de sustrato) (Sánchez-Rangel *et al*; 2005).

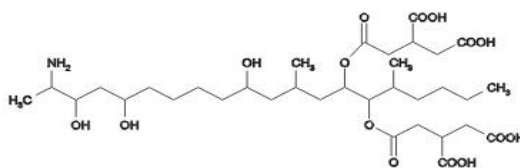


Figura 11. Estructura química de la fumonisina B1.

#### F.3.1. Toxicidad y mecanismo de acción de la FB1.

La FB1 muestra toxicidad tanto en plantas como animales y esta toxicidad se ha relacionado con la capacidad que tiene la FB1 en alterar la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos. La FB1 muestra una relación estructural con las bases esfingoideas y se sabe que es un inhibidor de la enzima esfinganina-N-acil-transferasa que cataliza la acilación de la esfinganina, con una  $IC_{50}$  de  $0.1 \mu\text{M}$  en preparaciones microsomales de hígado de rata (Wang *et al*; 1991). De esta forma, las consecuencias de la acción de la FB1 es un incremento en la cantidad de bases esfingoideas libres, al mismo tiempo que se presenta una reducción en los niveles de ceramida y de esfingolípidos complejos.

Se ha observado que la FB1 causa degeneración encefálica en equinos, edema pulmonar en cerdos, efectos hepatotóxicos en ratas y su consumo en maíz contaminado se ha asociado con cáncer esofágico en humanos (Marasas *et al*; 1988; Harrison *et al*; 1990; Gelderblom *et al*; 1991). En plantas también se ha demostrado su efecto fitotóxico, pues en semillas de maíz inhibe la elongación radicular durante la germinación (Dohelert *et al*; 1994), en hojas de la maleza *Datura stamonium* produce fuga de electrolitos, necrosis y una reducción en el contenido de clorofila (Abbas *et al*; 1992) y en embriones de maíz inhibe la actividad de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática, y causa un incremento en la fluidez de ésta (Gutiérrez-Nájera *et al*; 2005). Además, la FB1, a una concentración  $10 \mu\text{M}$ , induce la expresión de genes de defensa, como el gen de la HRGP (proteína rica en hidroxiprolina) y el gen de la quitinasa en ejes embrionarios de maíz durante la germinación (SanJuan, 2001; Greaves, 2005).

#### **F.4. Biosíntesis de FB1 en *Fusarium verticillioides*.**

Los genes involucrados en la biosíntesis de fumonisinas están agrupados en una región de aproximadamente 75 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y se han identificado hasta el momento 15 genes (*FUM1-FUM15*) en este locus (Proctor *et al*; 2003). Entre las funciones de estos genes se encuentran aminotransferasas, deshidrogenasas, reductasas y citocromo P450 monooxigenasas. El análisis de la expresión de los 15 genes involucrados muestra una asociación directa con la producción de fumonisinas durante el crecimiento del hongo en medio de cultivo apoyando la hipótesis de su participación en la biosíntesis de la toxina (Seo *et al*; 2001 y Proctor *et al*; 2003).

El primer gen que se caracterizó fue el gen *FUM1* (syn *FUM 5*) que codifica para una policétido sintasa, aunque también tiene dominios de metiltransferasa. El producto de este gen es fundamental para la producción de fumonisina, pues cuando se interrumpe, hay una disminución en la producción de fumonisinas en un 99% (Proctor *et al*; 1999).

### **F.5. Factores que afectan la producción de FB1**

#### **F.5.1. Genes específicos reguladores de la producción de FB1.**

La expresión de los genes de locus FUM parece estar regulada por otras proteínas cuyos genes no se encuentran en el cromosoma 1. Por ejemplo, los genes *FCC1* y *FCK1* son necesarios para la formación de las conidias y producción de FB1, el primer gen codifica para una proteína tipo ciclina mientras que el segundo gen codifica para una cinasa dependiente de ciclina y se demostró, por ensayos de doble híbrido, que los productos de estos dos genes interactúan físicamente (Bluhm y Woloshuk, 2006). Cuando las mutante  $\Delta fcc1$  y  $\Delta fck1$  crecen en granos de maíz como sustrato, producen menos conidias y niveles menores de FB1 que la cepa silvestre, aunque este fenotipo no es tan acentuado cuando la mutante crece en un medio definido y a un pH bajo. Aunque no se les ha atribuido claramente su mecanismo de acción a estas proteínas, se sabe por analogía con *S. cerevisiae* que proteínas de este tipo interactúan para formar una subunidad activa que fosforila el dominio C- terminal de la holoenzima RNA polimerasa II. Este complejo ciclina-CDK puede reprimir o activar la expresión de genes involucrados en metabolismo secundario (Shim y Woloshuk, 2001; Bluhm y Woloshuk, 2006). Otro gen, *ZFR1*, codifica para un polipéptido que contiene un motivo de unión a DNA del tipo Zn(II)2Cys6 y muestra identidad con una familia de proteínas que son reguladores del metabolismo secundario en hongos filamentosos. La delección de *ZFR1* reduce la producción de FB1 en un 10%, y la sobreexpresión de *ZFR1* en mutantes  $\Delta zfr1$  restaura la producción de FB1, sin embargo en mutantes  $\Delta fcc1$  no se restaura la producción de FB1, sugiriendo que *ZFR1* funciona como un regulador positivo para la biosíntesis de FB1 y que requiere *FCC1* para llevar a cabo su función (Flaherty y Woloshuk, 2004). Finalmente, el gen *PAC1*, es un regulador transcripcional de genes que responden al pH del medio en otros hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum* y se ha sugerido que en *F. verticillioides* funciona como

represor de la biosíntesis de fumonisinas bajo condiciones de pH alcalinos (Flaherty *et al*; 2003).

#### **F.5.2. Otros factores que regulan la producción de FB1.**

*F. verticillioides* infecta en todas las etapas de desarrollo del grano; sin embargo, la producción de FB1 se favorece en algunas de ellas, como la fase de dentado (Warfield y Gilchrist, 1999). Además, cuando *F. verticillioides* crece en presencia de amilopectina, un producto de la hidrólisis del almidón, se incrementa un 50% la producción de FB1. Es posible que la diferencia en la producción de FB1 en los diferentes estados de maduración del grano se deba a la composición del sustrato pues a medida que los granos alcanzan la madurez fisiológica, disminuye su contenido de humedad y se concentra el almidón que queda más accesible para el establecimiento de *F. verticillioides* (Bluhm y Woloshuk,2005).



---

## II. HIPÓTESIS

Las bases esfingoideas participan en la respuesta de defensa inducida en embriones de maíz por la infección de *Fusarium verticillioides*.

## III. OBJETIVOS

### □ **Objetivo general**

Determinar la asociación entre los niveles de bases esfingoideas y la respuesta de defensa en la interacción *Fusarium verticillioides* – maíz.

### □ **Objetivos particulares**

- 1) Establecer las condiciones para la inoculación de *F. verticillioides* en embriones de maíz durante la germinación.
- 2) Analizar la expresión del gen *ZmPR-1* durante la germinación de embriones de maíz y en respuesta a la infección de *F. verticillioides*.
- 3) Analizar la expresión del gen *ZmLCB2* de la serina palmitoil transferasa durante la germinación de embriones de maíz y en respuesta a la infección de *F. verticillioides*.
- 4) Determinar los niveles de bases esfingoideas en embriones de maíz en respuesta a la infección de *F. verticillioides*.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material Biológico

Se emplearon semillas de maíz (*Zea mays*) raza Chalqueño cosechado en 2003 y 2005. De cada semilla se extrajo manualmente el embrión con una navaja. Tanto las semillas como los embriones de maíz se almacenaron a 4°C.

Se utilizaron dos cepas, MY3 y CHQ1, del hongo patógeno *F. verticillioides* previamente aisladas de semillas de maíz y caracterizadas por su producción de fumonisina B1 y por la presencia del gen *FUM1*. El gen *FUM1* codifica para una policétido sintasa, enzima que cataliza el primer paso en la biosíntesis de fumonisinas y cuando se interrumpe este gen, la producción de FB1 se abate un 99% (Proctor *et al*; 1999). La cepa MY3 produce 1,700 µg de FB1/ g de sustrato y tiene el gen *FUM1*, mientras que en la cepa CHQ1 no se detectó ni producción de la toxina ni el gen *FUM1* en su genoma (Sánchez-Rangel *et al*; 2005).

### 2. Inoculación de embriones de maíz con *Fusarium verticillioides*.

#### 2.1. Obtención de una suspensión de conidias de *Fusarium verticillioides*.

Las cepas de los hongos se mantuvieron en congelación (-20° C) en tierra estéril (Windels *et al*; 1988) y aproximadamente 200 mg de este sustrato se sembraron en medio PDA (Sigma). Los cultivos se incubaron durante 5 a 7 días a temperatura ambiente en presencia de luz blanca fluorescente para promover la esporulación. Para colectar las esporas, se agregaron 10 mL de solución Tween 20 (0.5% v/v) a cada caja y se agitaron en un agitador orbital durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se colectó y se transfirió a un tubo de centrifuga estéril de 25 mL. Éste se centrifugó en una centrifuga marca Jouan, modelo MR1812, durante 20 min a 600 g a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y el botón (esporas) se lavó con 10 mL de agua estéril. El tubo se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y el procedimiento se repitió dos veces más.

El botón se resuspendió en 1 mL de H<sub>2</sub>O estéril y se transfirió a tubos Eppendorf estériles de 2 mL. El número de esporas se determinó en la suspensión con un hemacitómetro (Sigma) y la cuenta se hizo directamente con un microscopio óptico en un aumento de 40X (Olympus, modelo CH30). La concentración de esporas se

determinó a partir de una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  y con una dilución 1:100 ó 1:1000 y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Células por mL} = \text{células promedio} \times \text{factor dilución} \times 10^4$$

## **2.2. Inoculación de los embriones de maíz con esporas de *Fusarium verticillioides*.**

Los embriones de maíz se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (0.5 %, v/v) que se agitó vigorosamente por 2 min, seguido de 3 ó 4 lavados de 2 min cada uno con agua estéril. Los embriones se dejaron secar sobre papel filtro y se distribuyeron aproximadamente 45 embriones por caja Petri (14 cm de diámetro) con agar (1.5%, p/v). Las cajas se incubaron a 29°C por 12 horas bajo luz blanca fluorescente. Después de este periodo los embriones se transfirieron a un matraz estéril de 100 mL con 50-60 mL de una suspensión de conidias ( $6 - 7 \times 10^5$  conidias/mL). Para los embriones control, el matraz sólo contenía agua estéril. Los embriones se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación orbital ( $\approx 200$  rpm) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se distribuyeron de 12 a 20 embriones de maíz en cada placa con agar Murashige-Skoog suplementado con sacarosa (3%, p/v) (Sigma) y se incubaron a 29°C, bajo luz blanca fluorescente durante 24 h. Se tomaron muestras de embriones para la extracción de RNA total o de compuestos lipídicos (bases esfingoideas), a las 3, 6, 9, 12, 15 y 24 h.

## **2.3. Incremento de peso húmedo.**

A cada uno de los tiempos indicados se retiraron los embriones de la caja Petri y se registró su peso en balanza analítica (Explorer Ohaus). Para construir la gráfica de acumulación de peso húmedo (%) con respecto al tiempo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Incremento de Peso Húmedo (\%)} = \frac{(\text{Peso germinado} - \text{Peso Seco}) * 100}{\text{Peso Seco}}$$

### 3. Purificación de RNA y cuantificación de transcritos

#### 3.1 Extracción de RNA total. (Modificado de Rochester *et al.*; 1986) (ver Apéndice)

Para procesar cada muestra se congelaron con nitrógeno líquido en un mortero entre 10 y 12 embriones (aproximadamente 1.5 g) y se pulverizó el tejido hasta obtener un polvo fino. A este polvo se le añadió 1 mL de TRIzol (Invitrogen) y se mezcló cuidadosamente. Esta suspensión se transfirió con una espátula a un tubo Eppendorf de 2 mL y se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 min. El tubo se centrifugó a 11000 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Jouan MR1812. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 200 µL de una mezcla de fenol:cloroformo ácido (Sigma) (1:1; v/v) y se agitó durante 15 s. Se centrifugó a 11000 g durante 10 min a 4°C nuevamente para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para precipitar el RNA se agregaron 500 µL de isopropanol y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó a 11000 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Jouan MR1812 y el sobrenadante se eliminó por decantación. El botón de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% (preparado con H<sub>2</sub>O-DEPC). Se centrifugó a 600 g durante 5 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación para resuspender el botón en 500 µL de H<sub>2</sub>O -DEPC. Se agregaron 167 µL de cloruro de litio 8M para obtener una concentración final de 2M de LiCl y se incubó a 4°C durante toda una noche. Al día siguiente se centrifugó a 11000 g 15 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación y se disolvió el botón en H<sub>2</sub>O-DEPC (100-200 µL) y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol frío. Se incubó a -70°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 11000 g por 15 min a 0°C. Finalmente el botón se resuspendió en 50-100 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC.

#### 3.2. Cuantificación y calibración del RNA total. (Ausubel *et al.*, 1992)

Para cuantificar el RNA total extraído de cada muestra se realizaron diluciones 1:50 en H<sub>2</sub>O-DEPC y se cuantificaron en un espectrofotómetro (Shimadzu modelo UV160U) a una λ de 260 nm. Los datos de absorbancia se procesaron con la siguiente fórmula:

$$\text{mg RNA total/mL} = \frac{\text{Abs}_{260\text{nm}} (40 \text{ mg/mL}) (\text{Factor dilución}) (1 \text{ mL})}{1 \text{ DO} \cdot 1000 \text{ mL}}$$

Para evaluar la calidad de la muestra también se obtuvo su espectro de absorbancia en el intervalo de longitud de onda de 200-380 nm (ver apéndice). Además de la cuantificación espectrofotométrica se calibró el RNA de cada muestra por análisis densitométrico de la banda correspondiente al RNAr 18S resuelto por electroforesis horizontal. La densitometría de las bandas de los RNAr 18S se realizó en el analizador de imágenes FluorS (BioRad) para su cuantificación relativa. La diferencia entre las muestras no debía ser mayor del 10%.

### 3.3. Diseño de cebadores para amplificar secuencias parciales de cDNAs de *ZmPR-1* y *ZmLCB2*.

Con base a la secuencia reportada por Casacuberta *et al.* (1991) de la proteína PR-1 de maíz, (GenBank X54325) se diseñaron un par de cebadores con el programa Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) para la amplificación de un fragmento de 196 pb.

Dado que no hay secuencias publicadas de *ZmLCB2*, se realizó una búsqueda en la base de datos del genoma de maíz, ZmDatabase (<http://www.zmdb.iastate.edu/>) para encontrar secuencias expresadas (secuencia EST) de bancos de cDNA. Sin embargo, no se encontró ninguna secuencia que incluyera el dominio de unión a piridoxal fosfato, por lo que no se tenía la certeza de que se tratase de la subunidad *LCB2*. Por lo tanto, se buscaron secuencias EST completas en el genoma de arroz (*Oryza sativa*), que al ser una gramínea muestra mayor identidad con maíz. La secuencia CA766093 de arroz corresponde a un cDNA de *LCB2* por lo que se aprovechó para diseñar un par de cebadores en el programa Primer 3. Las secuencias de los cebadores cDNA se muestran en la Tabla 3.

**Tabla3.** Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de *ZmPR-1* y *ZmLCB2*.

Cebador	Secuencia	Tm (°C)
<b>ZmPR-1 Fw</b>	5'-AGAGAAGTACGCCGCACAGA-3'	62
<b>ZmPR-1 Rv</b>	5'-GTAGTGGCCACACACCTTGC-3'	64
<b>ZmLCB2 Fw</b>	5'-ACGAGGCACACAGTATTGGAG-3'	64
<b>ZmLCB2 Rv</b>	5'-CAATCCTGCTGAAATACCTGC-3'	62

### 3.4. Síntesis de cDNAs por transcripción reversa.

Todos los cDNAs se sintetizaron a partir de una mezcla de muestras de RNA total extraído de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides* de 9, 12 y 24 horas post-inoculación, empleando el oligonucleótido reverse (Rv) correspondiente. El cDNA de *LCB2* también se sintetizó a partir de RNA extraído de hoja de arroz como control. Los cDNAs de *ZmPR-1* y *ZmLCB2* se sintetizaron con la transcriptasa reversa ImProm II (Promega) a partir de 2 µg de RNA total y se siguió el protocolo sugerido por el proveedor. En un tubo Eppendorf de 0.5 mL estéril se combinó el RNA molde con 20 pmoles del cebador *ZmPR1Rv* o *ZmLCB2Rv* en un volumen final de 5 µL. La muestra se incubó a 70°C por 5 min y posteriormente se enfrió en baño de hielo por el tiempo que se requería para preparar la mezcla de reacción (5-10 min). Los componentes de la mezcla de reacción para la transcripción reversa se describen en la Tabla 4. Los 15 µL de la mezcla de reacción se combinaron con los 5 µL del RNA molde y el cebador Rv respectivo. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó a 42-45°C durante una hora y finalmente se incubó a 70°C durante 15 min para inactivar a la transcriptasa reversa.

**Tabla 4.** Componentes de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa.

Reactivo	Volumen (mL)	Concentración final
H <sub>2</sub> O-DEPC	6.6	
Buffer de reacción ImPromII™ 5X	4	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.4	3 mM
Mezcla de dNTPs 10 mM	1	0.5 mM
Enzima transcriptasa reversa	1	1
<b>VOLUMEN FINAL</b>	<b>20</b>	

### 3.5. Amplificación por PCR del cDNA obtenido por RT.

A partir de 1 µL de cDNA de *ZmPR-1* y *ZmLCB2* se realizó la amplificación por PCR en un volumen final de 20 µL con los reactivos y concentraciones indicadas en la Tabla 5. La amplificación se realizó en un termociclador marca Applied Biosystems, modelo GeneAmp97000, con un ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 30 ciclos con la siguiente programación 40 s a 94°C, 40 s a 57°C y 40 s a 72°C, para finalizar con un ciclo de 7 min a 72°C. Los productos de amplificación de DNA se separaron por



electroforesis horizontal, en un gel de agarosa (1.5%, p/v) disuelta en solución amortiguadora TAE (Acetato Tris 40 mM, EDTA 2 mM) con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y usando TAE como amortiguador de corrida. Las bandas de DNA se observaron con un transiluminador de luz UV Hoefer Scientific Instruments modelo UVTM-10 y usando una cámara marca Fisher Scientific EPH-6 se tomó una fotografía para el registro de datos.

**Tabla 5.** Preparación de la mezcla para PCR

<b>Solución Stock</b>	<b><i>ZmPR-1</i> [ ] final</b>	<b><i>ZmLCB2</i> [ ] final</b>
<b>Buffer PCR 10X</b>	1X	1X
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	2 mM	2 mM
<b>dNTPs 10 ó 2.5 mM</b>	0.2 mM	0.2 mM
<b>Cebador Fw 20 mM</b>	0.2 µM*	0.5 µM*
<b>Cebador Rv 20 mM</b>	0.2 µM*	0.5 µM*
<b>Taq DNA polimerasa (5U/ml)</b>	1 U	1 U
<b>H<sub>2</sub>O</b>	cbp 20 µL	cbp 20 µL

### **3.6. RT-PCR semicuantitativo.**

Para determinar los niveles de los transcritos de *ZmPR-1* y *ZmLCB2* por RT-PCR semicuantitativo se siguió el mismo protocolo descrito en el apartado 3.4 para la síntesis de cDNA. Para la amplificación del cDNA por PCR se ajustaron dos parámetros, la concentración de cebadores y el número de ciclos de tal manera que los niveles del producto de amplificación representaran los niveles del ARNm. Los detalles de esta estrategia se describen en el capítulo de resultados (Figura 18 y 25)

## **4. Clonación y Secuenciación**

### **4.1. Aislamiento y clonación de fragmentos de cDNA de *ZmPR-1* y *ZmLCB2***

#### **4.1.2. Secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados de *ZmPR-1* y *ZmLCB2*.**

Con el fin de obtener suficiente DNA para secuenciar el fragmento de PCR de 196 pb y 412 pb de *ZmPR-1* y *ZmLCB2* respectivamente, éstos se purificaron y se clonaron en el vector plasmídico pGEM-T easy, como se describe a continuación.

### **4.1.3. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

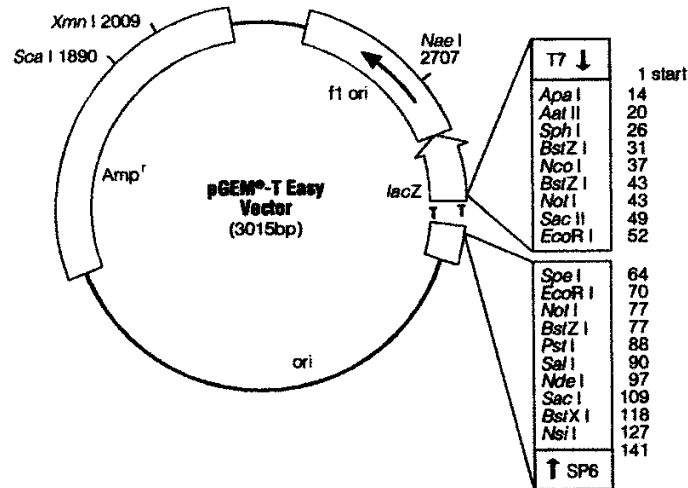
Se utilizó el kit GeneClean III de Bio 101.

Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa (1.5%) preparado con TAE y teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). La banda del tamaño indicado se cortó y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL previamente pesado y se registró de nuevo el peso para obtener por diferencia, el peso de la agarosa. Para calcular el volumen de agarosa se establece que 0.1 g equivale a 100 µL. Se agregaron 3 volúmenes (con respecto al volumen de agarosa) de la solución de NaI y se colocó en un baño de 45 - 55 °C durante 5 min, procurando mezclar cada minuto y de esta manera la agarosa se disolvió completamente.

La resina Glass Milk® se agitó vigorosamente y se agregaron 5 µL de ésta resina al tubo Eppendorf con el DNA. Se mezcló la suspensión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, agitando el tubo cada minuto, después se centrifugó a velocidad máxima en una microcentrífuga Sorvall modelo MC12 durante 5 s y se decantó el sobrenadante. El botón se resuspendió en 700 µL de solución New-Wash y este lavado se repitió 2 veces más eliminando completamente la solución en el último lavado. El botón (DNA) se resuspendió en 15 µL de H<sub>2</sub>O estéril, se incubó a 50 °C por 3 min y se centrifugó a 10000 g por 30 s. El sobrenadante que contiene al DNA se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 0.5 mL.

### **4.1.4. Ligación de los insertos.**

Los fragmentos de DNA se clonaron en el vector pGEM-T easy Vector (Promega) (Figura 12). Se mezclaron 3 µL de DNA purificado, con 5 µL de buffer de ligación 2X), 1 µL de DNA del vector pGEM-T y 1 µL de DNA ligasa T4 (3U/µL). La mezcla se homogenizó cuidadosamente y se incubó 1 h a temperatura ambiente.



**Figura 12. Plásmido pGEM-T Easy Vector de Promega.** Este plásmido contiene el marcador de resistencia a la ampicilina y un sitio múltiple de clonación, dentro del gen *lacZ*, con varias secuencias específicas para las enzimas de restricción.

#### 1.1.5. Transformación de células competentes (Inoue et al. 1990).

A 100  $\mu\text{L}$  de células competentes de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  se les agregó los 10  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación, se mezcló suavemente y se incubó por 30 min en un baño de hielo. Transcurrido este tiempo se realizó un choque térmico a 42  $^{\circ}\text{C}$  por 2 min e inmediatamente se incubó en un baño de hielo por 2 min. Posteriormente se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de medio TB y se incubó 2 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Una vez concluida la incubación se distribuyeron 50, 200 y 450  $\mu\text{L}$  en cada caja Petri con medio Agar LB suplementado con ampicilina (75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), X-Gal (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IPTG (0.5 mM) Las cajas se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 18 h y se seleccionaron las colonias blancas que tiene interrumpido el gen *lac Z* por lo que presumiblemente son transformantes con el fragmento de DNA insertado en el plásmido. Para comprobar la transformación, se purificó el DNA plasmídico y se digirió como se señala en el apartado 4.1.9. Para almacenar las células transformadas se sembraron en medio líquido LB-ampicilina y se incubaron a 37  $^{\circ}\text{C}$  con agitación continua de 150 rpm durante 14-16 h, se tomaron 640  $\mu\text{L}$  de este cultivo y se agregaron 360  $\mu\text{L}$  de una solución de glicerol al 50% estéril (la concentración final de glicerol es de 18%) y esta muestra se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.6. Purificación del DNA plasmídico (Miniprep).**

Las células transformadas se inocularon en 3 mL de medio TB (Sigma) y se incubaron durante 14-16 h a 37 °C con agitación constante. Este cultivo se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL, se centrifugó por 20 s a 10000 g en una microcentrífuga Sorvall MC12 y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 0.2 mL de Buffer GTE (glucosa 50 mM, Tris pH 8.0 25 mM y EDTA 10 mM pH: 8.0).

Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y después se agregaron 0.3 mL de la solución de lisis fresca (NaOH 0.2 M, SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Se agregaron 0.3 mL de acetato de potasio 3 M, pH: 4.8 y se agitó por inversión, después se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó por 10 min a 10000 g y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril, y se agregaron 5 µL de RNAsaA (15 mg/mL) y se incubó por lo menos 30 min a 37 °C.

Se agregaron 0.4 mL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se agitó por 5 s en vórtex. Después se centrifugó 4 min a 10000 g y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo limpio al cual se le agregaron 0.4 mL de cloroformo y se agitó 5 s en vórtex, se centrifugó 4 min a 10000 g y se transfirió de nuevo la parte acuosa a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. El DNA se precipitó con 0.7 mL de isopropanol a -20 °C y se mezcló el tubo por inversión y se centrifugó a 10000 g por 10 min, para eliminar el sobrenadante y el botón de DNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó 4 min a 10000 g, y después se eliminó el sobrenadante, dejando el tubo abierto por unos minutos para evaporar el etanol. El botón de DNA se resuspendió en 20 µL de agua estéril.

#### **4.1.7. Digestión del plásmido.**

Después de purificar el plásmido, se llevó a cabo una digestión con una enzima de restricción para comprobar que se encontraba el inserto. La reacción de digestión se realizó mezclando 5µL de DNA con 1 µL de buffer 3x (Invitrogen), 1 µL de enzima EcoR1 (10 U/µL) y 3 µL de agua. Esta mezcla se incubó 1 h a 37 °C. Para visualizar los insertos liberados se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% preparado con TAE y bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

#### **4.1.8. Aislamiento y secuenciación.**

Para el aislamiento del plásmido se utilizó el sistema de purificación QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y se siguió el protocolo del proveedor. La secuenciación del

DNA se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en un secuenciador automático ABIPRISM 310 (Perkin Elmer).

#### 4.1.9. Digestión con una Enzima de Restricción del cDNA de *ZmPR-1*.

Para confirmar la identidad del producto de 196 pb de *ZmPR-1* además de la secuenciación también éste se analizó por corte con enzimas de restricción. De acuerdo al programa BCM Search Launcher, (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>), se identificó 1 sitio de corte tanto para la enzima *AluI* como para la enzima *MboI* en la secuencia de 196 pb de *ZmPR-1*.

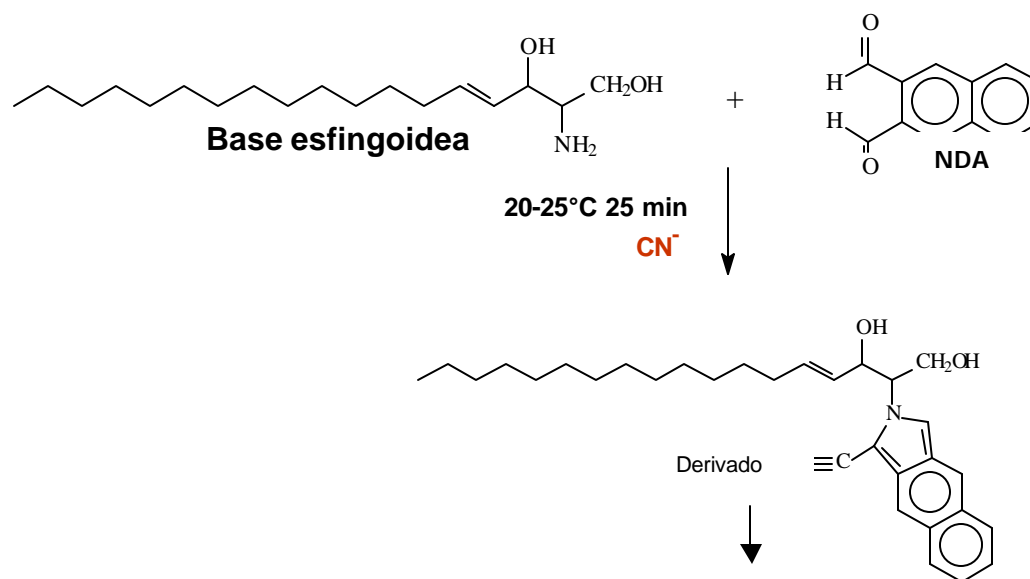
A partir del producto de amplificación de 196 pb purificado (apartado 4.1.6) se realizó mezclando 5  $\mu\text{L}$  de éste con 1  $\mu\text{L}$  de buffer para la enzima *AluI* ó *MboI*, 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *AluI* ó *MboI* (10 U/mL) según fuera el caso y 3  $\mu\text{L}$  de agua. La reacción de digestión se incubó 1 h a 37 °C y los productos de digestión se visualizaron en un gel de agarosa al 2% preparado con TAE y bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Se utilizó un marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pb, para poder definir el tamaño de los productos de la digestión. El corte con la enzima de restricción *AluI* genera dos productos de 166 y 30 pb respectivamente, mientras que la enzima *MboI* genera dos productos de restricción de 130 y 76 pb

### 5. Extracción de bases esfingoideas (Castegnaro *et al*; 1998; Rivas San Vicente, 2001).

Se congelaron en el mortero con nitrógeno líquido de 10 a 12 embriones de maíz (aproximadamente 1.5 g de tejido) y se pulverizaron hasta obtener un polvo fino. El tejido se rehidrató con buffer de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH  $\approx$  7, añadiendo 400  $\mu\text{L}$  por cada 200 mg de tejido. Se transfirió el homogeneizado a un tubo de plástico con tapón de rosca. Para extraer los lípidos se añadieron 1.5 mL de solución de KCl al 0.8%, 50  $\mu\text{L}$  de KOH 1M y 4  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo. El tubo se agitó suavemente durante 30 min y posteriormente las fases se separaron por centrifugación 300 g durante 15 min en una centrífuga Sorvall RT6000D. La fase orgánica (fase superior) se transfirió a un tubo de ensayo y se realizó la evaporación bajo corriente de nitrógeno y cuando el volumen fue menor o igual a 1.5 mL se transfirió a un vial de vidrio y se continuó la evaporación a sequedad. Los extractos se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se sonicó durante 10 min. Este extracto se analizó para cuantificar bases esfingoideas por HPLC.

## 6. Formación de derivados de bases esfingoideas con NDA y análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

Se implementó una técnica de HPLC en basada en dos reportes previos (Cho *et al*; 2002 y Marra *et al*; 2002). Esta técnica consiste en la generación de un cianobenzoisindol, formado entre la base esfingoidea con el naftalen 2,3-dicarboxialdehído (NDA) en presencia de cianuro, el cual es separado isocráticamente en una columna de fase reversa y detectado por su capacidad de absorber luz UV a 254 nm. La reacción y generación de los derivados se muestra es la Figura 13.



**Figura 13.** Formación de los derivados de las bases esfingoideas con naftalen 2,3-dicarboxialdehído en presencia de cianuro.

Para este análisis cuantitativo se utilizó un cromatógrafo Shimadzu compuesto por una bomba modelo LC-10AD, detector de UV modelo SPD-10AV y procesador de datos modelo C-R5a. La separación de las muestras se realizó por fase reversa en una columna SuperCosil LC-18-Si de 15 cm × 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol grado HPLC y buffer de fosfatos (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM), en una proporción 93.5:6.5 (v/v) con un flujo de 1 mL/ min. Los derivados formados pre-columna con NDA se realizaron mezclando 2-15 μL extracto, que representan entre 2 a 5 mg de tejido, + 30 μL de KCN 5% (p/v) + 140 μL de buffer

de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.05 M, pH = 9.5 y ACN grado HPLC c.b.p 300  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de solución NDA 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se incubó por 20 min protegido de la luz, y posteriormente se inyectó en el HPLC ó se almacenó en hielo hasta su análisis.

Se construyeron curvas patrón de estándares de fitoesfingosina y esfinganina en el rango de 1 a 6 pmoles y se registró la respuesta de altura (Apéndice).



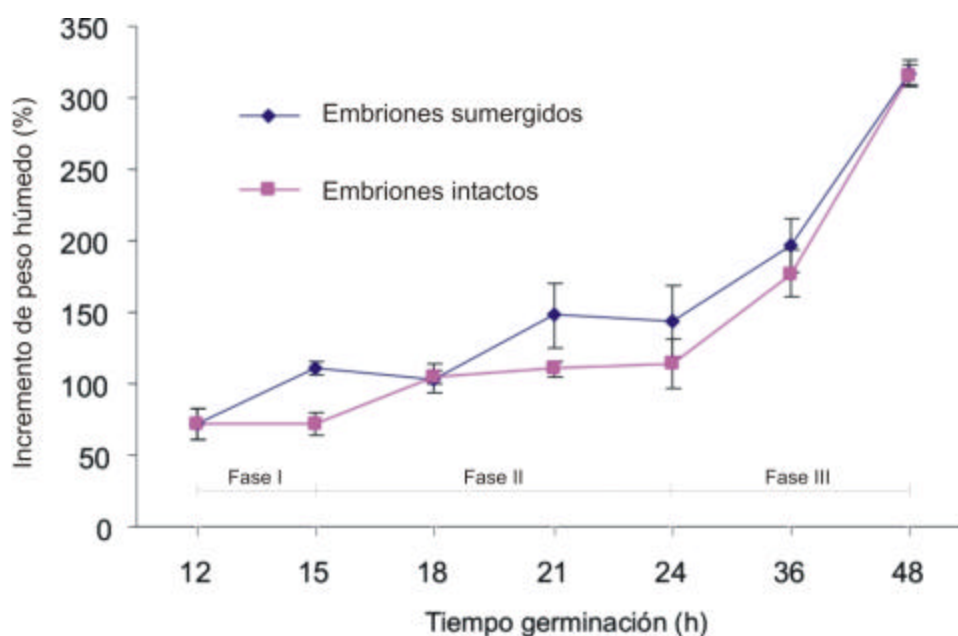


## V. RESULTADOS

## ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN.

1.1. Efecto del método de inoculación utilizado en la acumulación de peso húmedo en embriones de maíz infectados con *F. verticillioides*.

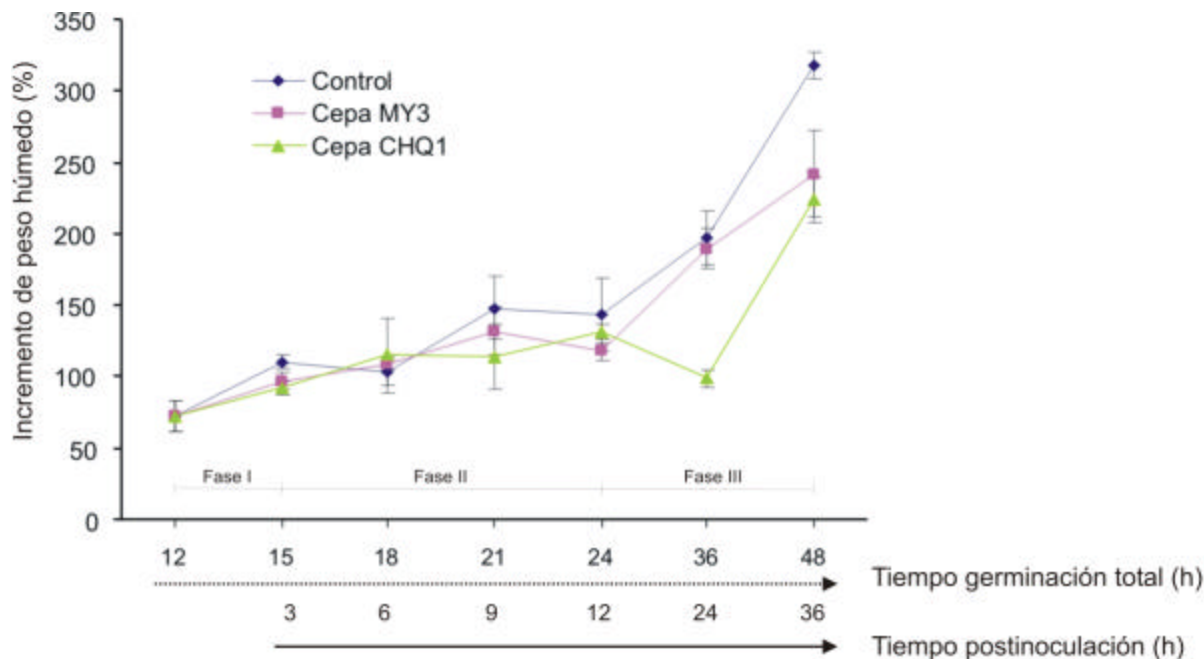
El método de inoculación consistió en transferir embriones de 12 h de germinación en un matraz que contenía la suspensión de esporas para mantenerlos en agitación orbital por 30 min. Posteriormente los embriones se distribuyeron en medio MS y se incubaron a 29°C por el tiempo requerido (ver apartado 2.2 de materiales y métodos). Con la finalidad de analizar si el método de inoculación empleado influía en la toma de agua de los embriones de maíz durante la germinación, se compararon las curvas de incremento de peso húmedo (%), entre embriones de maíz que siguieron el tratamiento basado en el método de inoculación (para realizar este experimento el matraz sólo contenía agua estéril) y un lote de embriones que se mantuvo intacto en el medio a lo largo de este periodo. Para calcular el porcentaje de peso húmedo se consideró el peso de los embriones secos que en promedio fue de  $0.057 \text{ g} \pm 0.005$  ( $n=40$ ).



**Figura 14. Efecto del método de inoculación en la toma de agua de los embriones de maíz durante la germinación.** El tratamiento para la inoculación consistió en tomar embriones que llevaban 12 h de germinación en agar, y colocarlos en un matraz Erlen Meyer que contenía agua estéril. Estos se incubaron en agitación por 30 min y posteriormente se sembraron en cajas con medio MS, para colectarlos en el tiempo de germinación indicado.

Como se muestra en la Figura 14, durante las 12 primeras horas de germinación aumentó significativamente el peso húmedo (75%) que corresponde al periodo final de la Fase I de la germinación. Durante la fase II, que se presentó aproximadamente entre las 15 y 24 h de germinación, la toma de agua fue mucho más lenta. Las curvas de ambos lotes mostraron un perfil comparable, aunque a las 15 h se observó que los embriones que se colocaron en agua por 30 min tuvieron un pronunciado incremento en la toma de agua. Sin embargo, tres horas después ambos lotes alcanzaron el mismo incremento en peso húmedo. A partir de las 24 h inició la Fase III de la germinación que se caracteriza por un nuevo incremento en la toma de agua y no se observaron diferencias entre los tratamientos.

Una vez establecido que la inmersión de embriones en agua no tuvo un efecto significativo sobre la toma de agua durante la germinación se elaboraron las curvas de toma de agua de los embriones de maíz inoculados con las cepas MY3 (cepa productora de FB1) y CHQ1 (cepa no productora) de *F. verticillioides*. La inoculación con las cepas de *Fusarium* no provocó cambios significativos durante las Fases I y II de la toma de agua de embriones (Figura 15). La fase II abarca el intervalo de tiempo que corresponde a 3, 6, 9 y 12 h postinoculación. Después de 12 h de postinoculación inicia la Fase III y solamente a partir de las 24 h postinoculación se observó una disminución significativa en el peso húmedo en los embriones inoculados con respecto a los embriones control. Para los embriones inoculados con la cepa MY3 la mayor diferencia se observó a las 36 h postinoculación siendo ésta aproximadamente del 30%, mientras que para CHQ1 ocurrió a las 24 h y se observó una disminución del 50% en la toma de agua.



**Figura 15.** Incremento de peso húmedo en los embriones de maíz infectados con las cepas MY3 y CHQ1 de *F. verticillioides*.

## 1.2. Estudio de un marcador de defensa en el sistema de interacción planta patógeno establecido.

Durante la respuesta de defensa de las plantas se induce la expresión de una serie de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) que, en conjunto, son efectivas para inhibir el crecimiento del patógeno y su multiplicación. De las 17 familias de PRs descritas (Van Loon *et al*; 1999), la familia PR-1 se ha caracterizado extensivamente por su expresión, aunque su función precisa no se conoce. Se ha demostrado que algunas de estas proteínas de tabaco y jitomate inhiben el crecimiento de oomicetos, aunque su mecanismo de acción se desconoce (Niderman *et al*; 1995). Se estudió la expresión del gen de la proteína PR-1 de maíz pues ya se ha reportado que se induce en semillas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* (Casacuberta *et al*; 1991).

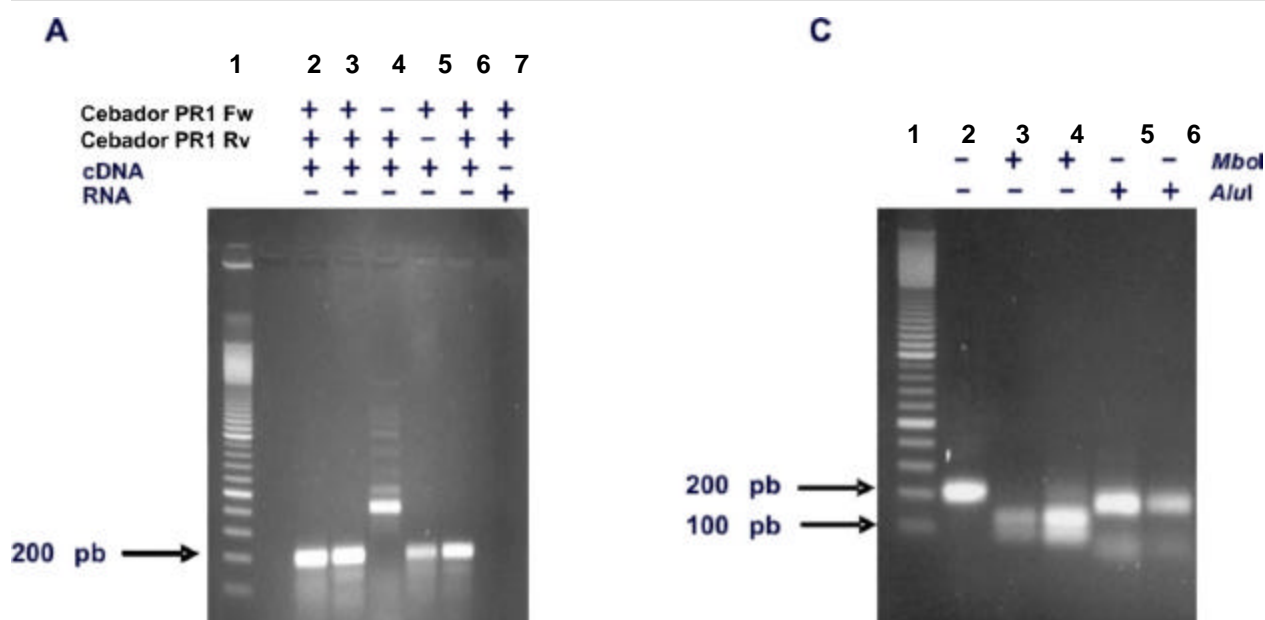
Para obtener la sonda de cDNA de *PR-1*, se amplificó por RT-PCR con los cebadores ZmPR-1 (Fw y Rv) y RNA de embriones de maíz infectados con *F. verticillioides*. Se obtuvo un único fragmento de aproximadamente 200 pb (Figura 16A carriles 2, 3 y 6).

También se realizaron controles negativos que fueron la amplificación del cDNA con el cebador Rv ó Fw y la amplificación a partir de RNA.

Cuando se empleó solamente el cebador Rv se obtuvo un fragmento de aproximadamente 400 pb que probablemente es un producto inespecífico pues no se amplificó en presencia de los dos cebadores (Figura 16A carril 4). Cuando se usó el cebador Fw se obtuvo un producto de 200 pb (Figura 16A carril 5), similar al obtenido en los carriles 2 y 3, esto se debe a que el cDNA que es utilizado como molde tiene trazas del cebador Rv utilizado en la reacción de la síntesis de cDNA con la transcriptasa reversa. Finalmente, cuando se usó RNA de embriones de maíz como molde y los dos cebadores (Fw y Rv) no se obtuvo ningún producto de amplificación, lo que aseguró que la banda de 200 pb proviene del cDNA y no de DNA genómico que podría estar como contaminante en la preparación (Figura 16A carril 7).

Para confirmar la identidad del producto, éste se analizó por el corte específico con enzimas de restricción y por secuenciación. Para el primer experimento se analizó la secuencia de 196 pb (Casacuberta *et al*; 1991) y se encontraron dos sitios de corte para 2 enzimas de restricción diferentes: *AluI* y *MboI* que se indican en la Figura 16B. El corte con la enzima de restricción *MboI* generó dos productos de restricción de 130 y 76 pb (Figura 16C carriles 3 y 4), mientras que la enzima *AluI* generó dos productos de 166 y 30 pb respectivamente (Figura 16C carriles 5 y 6).

La secuencia a nivel de nucleótidos mostró un 100% de identidad con la secuencia de *PR-1* de maíz (X54325). Esta secuencia tenía un marco de lectura abierto, cuya secuencia se analizó usando el programa Blast que reportó exclusivamente secuencias de *PR-1* de plantas. Con esta secuencia reportada de la proteína PR-1 de maíz se realizó el alineamiento a nivel de aminoácidos con otras proteína PR-1 de otras especies vegetales Se encontró una identidad de 75-80% con proteínas PR-1 de especies monocotiledóneas, como arroz y cebada y un 53-56% de identidad con proteínas PR-1 de especies dicotiledóneas, como tabaco y *Arabidopsis* (Figura 17).



**B**

agagaagtacgcccgcacagagggccggcgactgcccgtctccagcactcgggggggcctacgggggagaacatcttctg

gggggtccgcccggcttcgattggaaggcggtggacgcagtgccgatcgtgggtagacgagaaacagtggtacaactac

gccaccaacagctgcccgcggcaaggtgtgtggccactac

*MboI* site: **gatc**

*AluI* site: **agct**

**Figura 16. Obtención e identificación de *ZmPR-1*.** **A.** Amplificación del fragmento de 196 pb de *ZmPR-1*. **B.** Secuencia de nucleótidos del producto amplificado de 196 pb. Se muestran los sitios de corte de las dos enzimas de restricción: *MboI* y *AluI*. Las secuencias en negritas corresponden a los oligonucleótidos. **C.** Productos de la digestión del fragmento amplificado de 196 pb con las enzimas de restricción *AluI* y *MboI*.

<i>Z. mays</i>	MEASNKL	AVLLLWL	VMA	AATAVHPSYS	ENSPODYLTP	ONSARA	AVGV	GPVTWSTKLQ	OFAEKYAAOR	
<i>H. vulgare</i>	MQTPKL	AILLA-	LAMA	AAM-VNLSQA	QNSPODYVSP	HNAARS	AVGV	GAVSWSTKLQ	AFANQYANQR	
<i>O. sativa</i>	MEVSKL	AIAL---	AMV	AAMAL-PSQA	QNSPODYVRL	HNAARA	AVGV	GPVTWDTSVQ	AFAYENYASQR	
<i>N. tabacum</i>	MGFVLF	FSQLP	SFLLVSTLLL	FLVISHSCRA	QNSQQDYLLDA	HNTARAD	VG	EPLTWDDQVA	AYAQNYSQQL	
<i>A. thaliana</i>	MNFTGYS	RFLIVF	VALV	GALVLP	S-KA	QDSPQDYLRV	HNQARG	AVGV	GPMQWDERVA	AYARSYAEQL

<i>Z. mays</i>	AGDCRLQHS	GP--YGENIF	WGSAGFDWKA	VDAVRSWVDE	KQWYNYATNS	CAAGKVC	GHY	TOVVWR	ATTS
<i>H. vulgare</i>	INDCKLQHS	GP--YGENIF	WGSAGADWKA	SDAVNSWVSE	KKDYYDYSNT	CAAGKVC	GHY	TOVVWR	ASTS
<i>O. sativa</i>	SGDCSLIHS	NRNNLGENLF	WGSAGGDWTA	ASAVQSWVGE	KSDYDYASNS	CAQKVC	GHY	TOVVWR	ASTS
<i>N. tabacum</i>	AADCNLVHSH	GQ--YGENLA	EGS-GDFMTA	AKAVEMWVDE	KQYYDHDSNT	CAQQQVC	GHY	TOVVWR	NSVR
<i>A. thaliana</i>	RGNCRLIHS	GP--YGENLA	WGS-GD-LSG	VSAVNMWVSE	KANYNYAANT	C-NGVC	GHY	TOVVWR	KSVR

<i>Z. mays</i>	IGCARVVC	NRGVFIICNY	EPRGNIA	GPK	PY	
<i>H. vulgare</i>	IGCARVVC	NRGVFITCNY	EPRGNII	GOK	PY	
<i>O. sativa</i>	IGCARVVC	NRGVFITCNY	KPAGNFV	GQR	PY	
<i>N. tabacum</i>	VGCA	VQC	NRGVFIICNY	DPPGNYR	GES	PY
<i>A. thaliana</i>	LGC	AKVRC	NRGVFIICNY	DPRGNYV	NEK	PY

**Figura 17. Alineamiento a nivel de aminoácidos de proteínas PR-1 de diferentes especies vegetales.** *Zea mays* (No. Acceso: X54325), *Oryza sativa* (No. Acceso U89895), *Hordeum vulgare* (No. Acceso Z21494), *Nicotiana tabacum* (No. Acceso X06361) y *Arabidopsis thaliana* (No. Acceso NM\_127025).

Una vez confirmada la identidad del fragmento de cDNA amplificado, se ajustaron la concentración de oligonucleótidos y el número de ciclos para realizar el análisis semicuantitativo de los niveles de transcrito. Los productos se resolvieron en un gel de agarosa (1.5%, p/v), y se realizó el análisis densitométrico de cada una de las bandas.

Como se muestra en la Figura 18A, a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  de cebadores y 30 ciclos de amplificación apenas se observó una banda tenue de amplificación correspondiente al transcrito y la cantidad de ésta aumentó linealmente conforme se incrementó la concentración de cebadores hasta 0.4  $\mu\text{M}$ . A partir de esta concentración no se registraron incrementos significativos en los valores de densitometría. Por lo tanto, para la amplificación de este cDNA, se eligió una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  de cebadores que se encuentra en el rango lineal de respuesta. También se probaron diferentes ciclos de amplificación, y los resultados se muestran en la Figura 18B. Se observó un comportamiento lineal cuando se corrieron 24, 26 y 28 ciclos, pero a partir de 30 ciclos ya no hubo incrementos en los valores de densitometría, pues se alcanzó la saturación de la señal. A partir de estos datos se seleccionó trabajar con 27 ciclos de amplificación para el estudio de este gen.

Para este ensayo también fue necesario establecer las condiciones óptimas para la amplificación del transcrito de 306 pb de *ZmUBQ* que se utilizó como control de cargado (Figuras 18C y 18D). Se eligió este gen debido a que los niveles de transcrito son abundantes y se mantienen constantes a lo largo de la germinación (Rivas SanVicente, 2003). Con 30 ciclos de amplificación se probaron diferentes concentraciones de cebadores y se detectó al producto a partir de 0.08  $\mu\text{M}$  y una respuesta lineal hasta el valor de 0.2  $\mu\text{M}$ . De esta manera se eligió una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  y se probaron diferentes ciclos de amplificación desde 22 hasta 30 ciclos. Sólo a partir de 26 ciclos se detectó el producto de amplificación y se observó una tendencia lineal hasta los 30 ciclos. Las condiciones finales para el ensayo de RT-PCR semicuantitativo se resumen en la Tabla 6.

**Tabla6.** Condiciones de la reacción de RT-PCR para la amplificación de *ZmPR-1*. y *ZmUBQ*.

Parámetros	<i>ZmPR-1</i>	<i>ZmUBQ</i>
RNA	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$
[ ] cebadores	0.2 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$
Número de ciclos	28	26
Tem de alineamiento	57°C	57°C

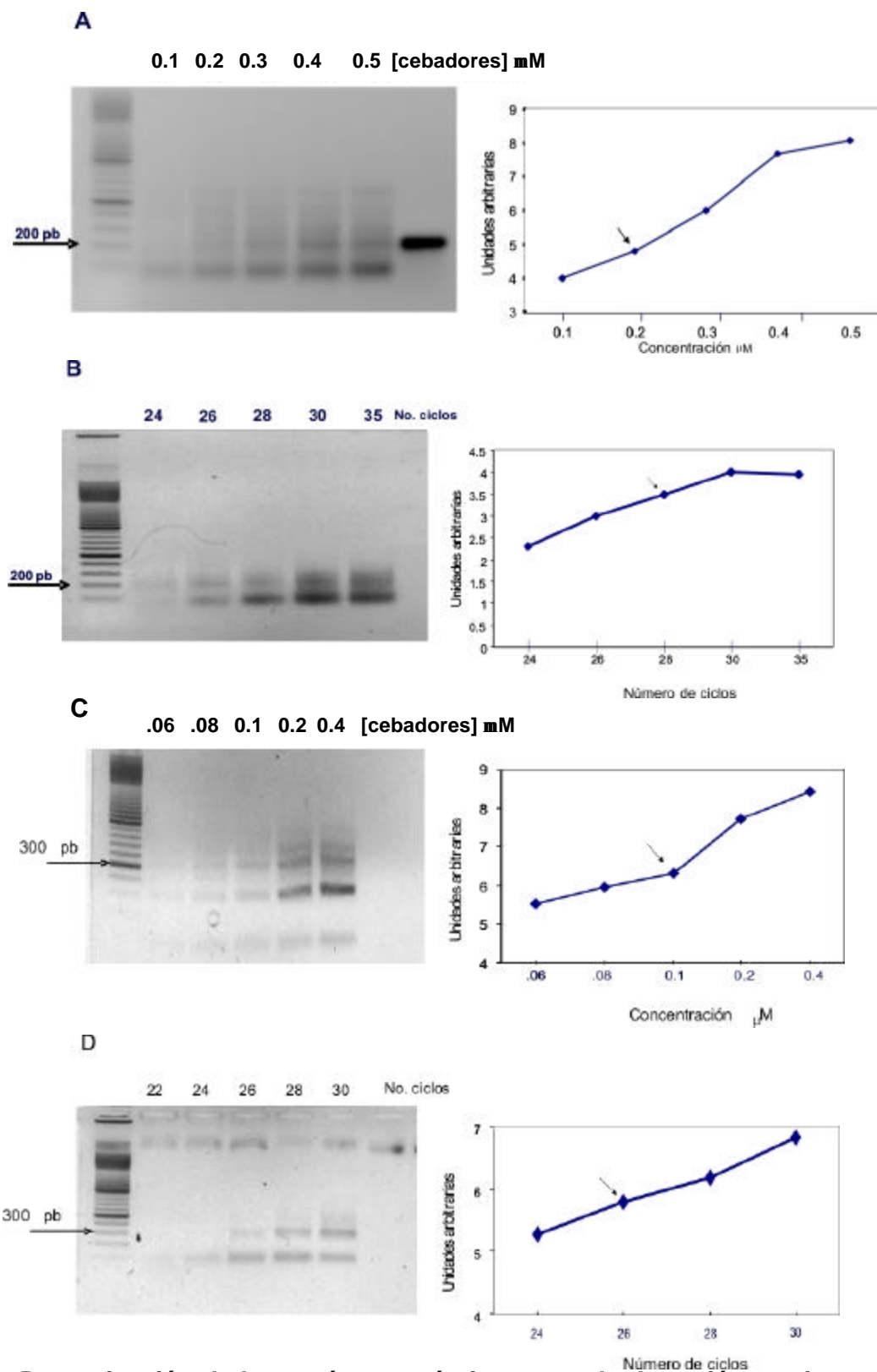
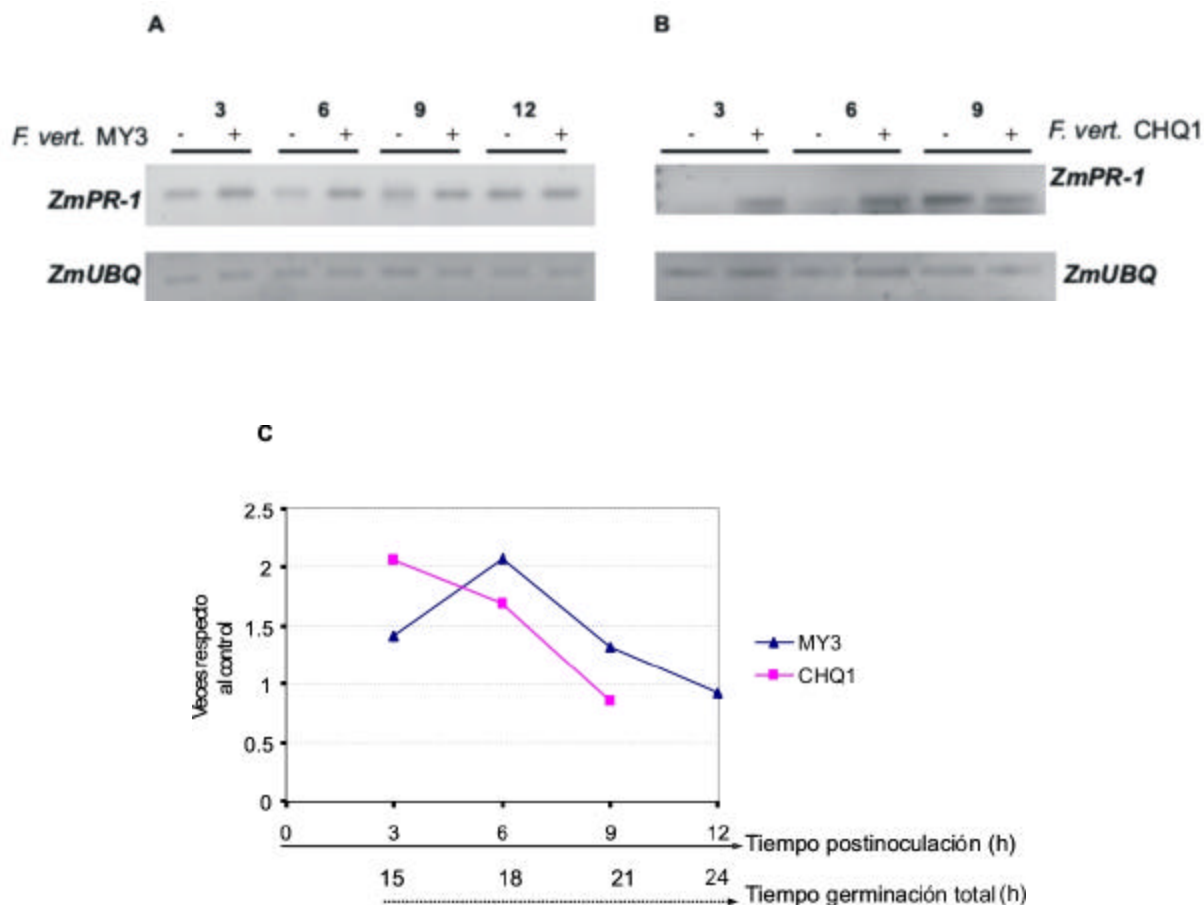


Figura 18. Determinación de los parámetros óptimos para la detección semicuantitativa de los transcritos de *ZmPR-1* (A y B) y *ZmUBQ* (C y D) por RT-PCR. Se realizaron pruebas variando la concentración de cebadores y número de ciclos.

Una vez establecidas las condiciones se realizó por duplicado un ensayo de RT-PCR semicuantitativo para evaluar la expresión de *ZmPR-1* en embriones de maíz durante la germinación cuando son infectados por *F. verticillioides* (Figura 19).



**Figura 19. Niveles de *ZmPR1* en embriones de maíz infectados con *F. verticillioides*.** **A.** Embriones infectados con la cepa MY3. **B.** Embriones infectados con la cepa Chalqueño1. **C.** Análisis densitométrico de la banda de cDNA correspondiente al producto de amplificación de 196 pb de *ZmPR-1*.

Los niveles del transcrito *ZmPR-1* se incrementaron durante las primeras horas después de la inoculación con ambas cepas de *F. verticillioides* (Figura 19). Este aumento fue más rápido cuando se inoculó con la cepa CHQ1 pues se observó un incremento del 100% a las 3 h, mientras que estos niveles se detectaron a las 6 h con la cepa MY3. Posteriormente a las 9 y 12 h, los niveles del transcrito se asemejaron a los de los embriones control que no fueron inoculados



## 2. NIVELES DE ESFINGANINA EN EMBRIONES DE MAÍZ DURANTE LA INFECCIÓN CON *F. verticillioides*.

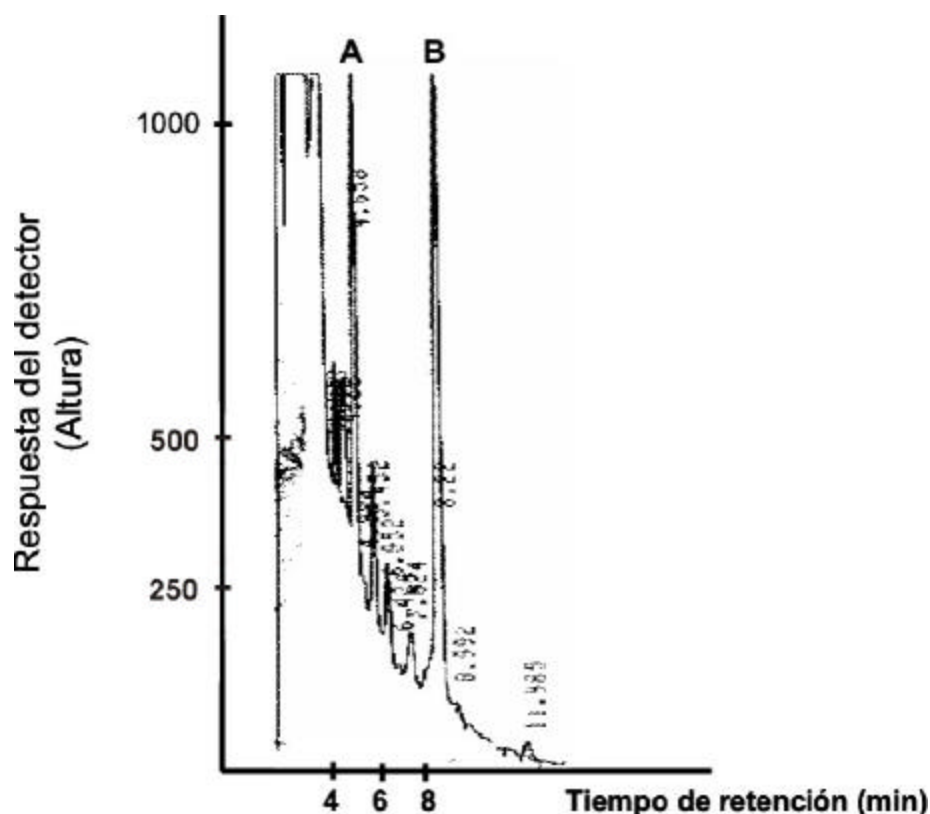
El principal objetivo de este trabajo era estudiar la alteración del metabolismo de esfingolípidos en embriones de maíz durante la infección de un hongo patógeno. La SPT cataliza el primer paso en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos y forma la 3-cetoesfinganina la cual es reducida en la base esfingoidea esfinganina por la 3-cetoesfinganina reductasa. La esfinganina es hidroxilada por una 4-hidroxilasa para generar fitoesfingosina (Sperling *et al*; 2003, Dunn *et al*; 2004). En este trabajo se cuantificaron los niveles de esfinganina y fitoesfingosina como intermediarios del metabolismo de esfingolípidos.

La extracción de las bases esfingoideas a partir de los embriones de maíz se realizó con acetato de etilo y para su cuantificación, se formó un derivado con NDA que se separó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) con detección por absorción de luz UV (254 nm).

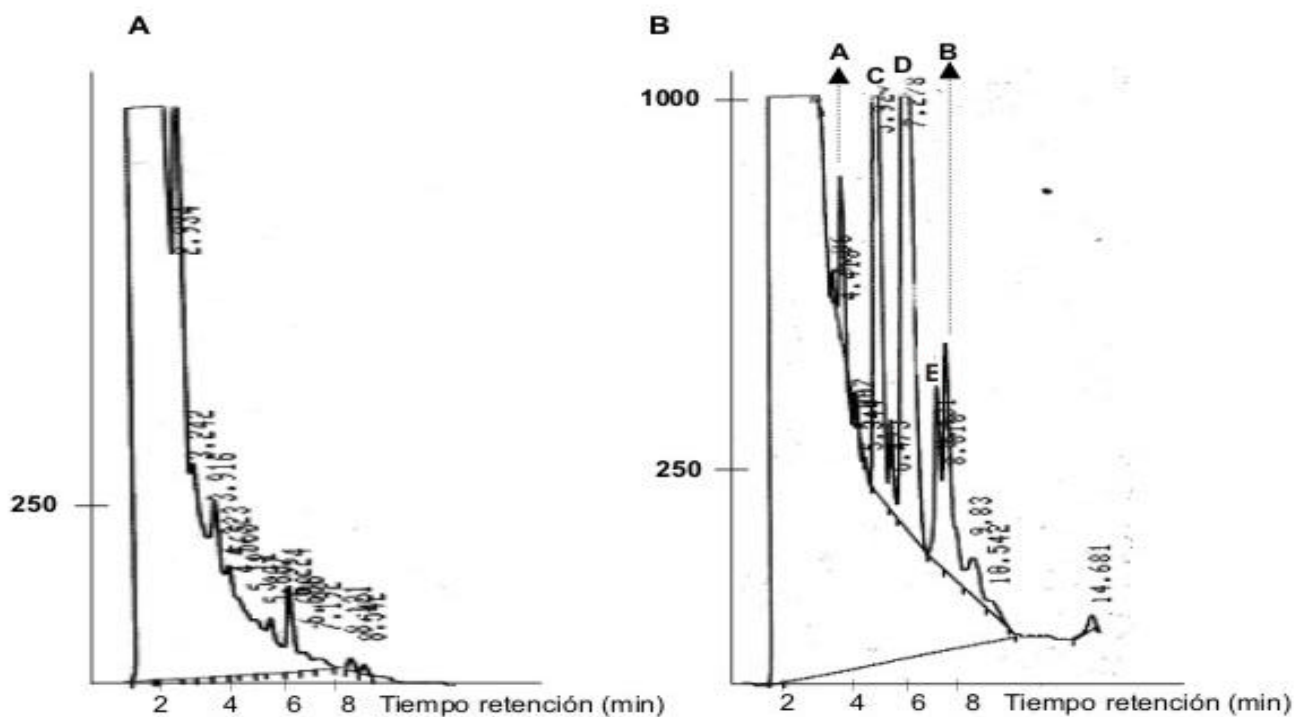
Bajo estas condiciones las dos bases esfingoideas que se pudieron identificar y cuantificar fueron, la esfinganina y fitoesfingosina que se resolvieron satisfactoriamente con tiempos de retención promedio de 8.42 min ( $\pm$  0.18 interensayo) y 4.8 min ( $\pm$  0.12 interensayo) respectivamente. La Figura 20 muestra un cromatograma de una coinyección de 5 pmoles de estándares de estas dos bases esfingoideas. Para poder realizar la cuantificación se obtuvo el rango de linealidad de la respuesta y se determinó que fue de 1 a 4 pmoles para ambas bases, lo que permitió realizar curvas de calibración (Apéndice).

La extracción y cuantificación de las bases esfingoideas se realizó a partir de tres muestras independientes. Además de corroborar los tiempos de retención de la esfinganina y fitoesfingosina en los extractos lipídicos con los estándares, se realizó otra prueba para confirmar su identidad. Esta prueba consistió en inyectar el extracto lipídico omitiendo el agente derivatizante (Figura 21A), y como se muestra, no se observó ningún compuesto que absorba luz UV de forma significativa en este extracto en los tiempos de elución de las bases esfingoideas. En contraste, al hacer la reacción, se formaron varios compuestos que absorben luz UV, y entre éstos se detectaron los picos correspondientes a la fitoesfingosina ( $Tr=4.794$  min) y esfinganina ( $Tr=8.361$ ).

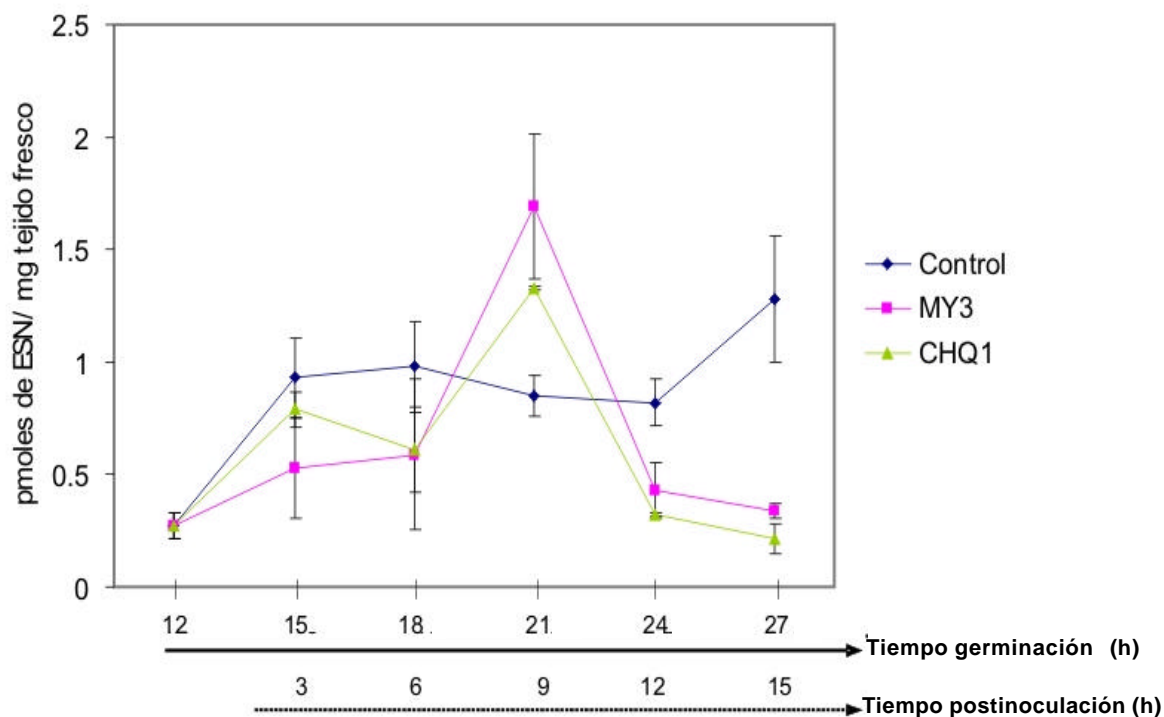
Además, se detectaron otros compuestos que reaccionaron con el NDA y algunos de ellos muy abundantes en los picos C, D y E que se indican en el cromatograma y que tuvieron tiempos de retención 5.6 – 6 min, 6.8 – 7.2 min y 7.8 – 8.1 min respectivamente (Figura 21B). Estos intervalos en los tiempos de retención que se reportan correspondieron a variaciones de muestras corridas en distintos días. Sin embargo, la variación en  $T_R$  fue de apenas (0.06 min) para la esfinganina y de manera similar para los otros compuestos.



**Figura 20. Separación de los derivados de NDA de fitoesfingosina (A) y esfinganina (B) por cromatografía en fase reversa.** Los derivados se detectaron por absorción de luz UV (254 nm). Se inyectaron 5 pmoles de ambos estándares en 20  $\mu$ L. Fase móvil: metanol :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM) (93.5 : 6.5). Flujo: 1 mL/min.



**Figura 21. Cromatogramas de la detección de bases esfingoides por HPLC A.** Cromatograma de un extracto que corresponde a un control de 3 h sin NDA. **B.** Cromatograma que corresponde a una muestra control de 6 h con NDA. Para ambos cromatogramas se inyectaron 2.5 mg equivalentes de tejido en 20  $\mu$ L. A. Fitoesfingosina, B. Esfinganina. Fase móvil: metanol :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM) (93.5 : 6.5). Flujo: 1 mL/min.



**Figura 22. Niveles de esfinganina en embriones de maíz infectados con *F. Verticillioides*.** La esfinganina se analizó por HPLC a partir de los derivados formados con el reactivo NDA que absorben UV.

La Figura 22 muestra los niveles de esfinganina en los embriones de maíz antes de ser inoculados y a varios tiempos después de la inoculación. Se observó un bajo contenido de esfinganina (0.27 pmoles ESN/mg tejido fresco) a las 12 h de germinación y un incremento importante tres horas después del tratamiento. Este aumento comparable en los niveles de esfinganina se observó incluso en los embriones no inoculados, lo que implica que el tratamiento de sumergirlos en agua y la manipulación producen probablemente un estrés osmótico y mecánico respectivamente que causan esta elevación. Una vez adaptados al medio de cultivo no se observaron cambios en los niveles de esfinganina 6 h post inoculación pero a las 9 h se observó un incremento del 100% y 56% ( $p < 0.01$ ) en el contenido de esta base esfingoidea con las cepas MY3 y

CHQ1 respectivamente. Este aumento fue transitorio pues a los dos tiempos posteriores (12 y 15 h.p.i.) los niveles de esfinganina fueron significativamente menores que en los embriones no inoculados ( $p < 0.05$ ).

La cuantificación de la fitoesfingosina se dificultó debido a que esta base esfingoidea se encontró en niveles menores que la esfinganina y al ser un compuesto más polar tuvo un tiempo de retención muy corto que evitó una adecuada resolución en el extracto. Solamente en las muestras de 9 h se pudo detectar la fitoesfingosina y se observó un incremento de 3 veces en los embriones inoculados con la cepa MY3 ( $1.18 \pm 0.37$  pmoles/mg tejido fresco) con respecto al control ( $0.40 \pm 0.25$  pmoles/mg tejido fresco). En los embriones inoculados con la cepa CHQ1 no se observaron cambios significativos en los niveles de esta base esfingoidea ( $0.51 \pm 0.15$  pmoles/mg tejido fresco).

Aunque no conocemos la identidad de los compuestos que eluyen en los otros picos, también se analizó su abundancia relativa en los embriones control y en los embriones inoculados pues, de acuerdo a las condiciones de extracción y formación del derivado, se puede inferir que son bases esfingoideas con un grupo amino libre. Esto resulta interesante pues podrían ser posibles bases esfingoideas, pues se sabe que en plantas existe una gran heterogeneidad estructural entre estos compuestos, principalmente por la inserción de instauraciones o hidroxilaciones sobre el esqueleto de esfinganina (Dunn *et al*; 2004). Los resultados se muestran en la Tabla 7 donde se reporta el tiempo de retención y el área/mg de tejido en muestras de 9 h.p.i., tiempo en el cual se observó la mayor acumulación de la esfinganina. El pico C, con tiempo de retención entre 5.6 y 6 min mostró una gran variabilidad por lo que fue difícil determinar su perfil de acumulación. En cambio, el área de los picos D y E si se pudo cuantificar adecuadamente y mostraron un perfil similar al de la esfinganina. Se observó un incremento del 117% y 126% de los compuestos eluyendo en los picos D y E respectivamente en los embriones inoculados con la cepa MY3. Un incremento del 78% y 118% de los picos D y E también se observó en los embriones inoculados con la cepa CHQ1. Asimismo, a las 12 h.p.i. los valores de área/mg de tejido de estos tejidos no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

**Tabla 7.** Análisis de dos picos que fueron identificados en los cromatogramas para el análisis de bases esfingoideas.

Pico	Tiempo retención (min)	Área/mg tejido		
		Embriones Control	Embriones inoculados con MY3 por 9 h.p.i.	Embriones inoculados con CHQ1 por 9 h.p.i.
D	6.8-7.2	4052 ± 856 <sup>a</sup>	8823 ± 1749 <sup>b</sup>	7240 ± 987 <sup>b</sup>
E	7.8-8.1	4809 ± 1955 <sup>c</sup>	10897 ± 2648 <sup>d</sup>	10516 ± 923 <sup>d</sup>

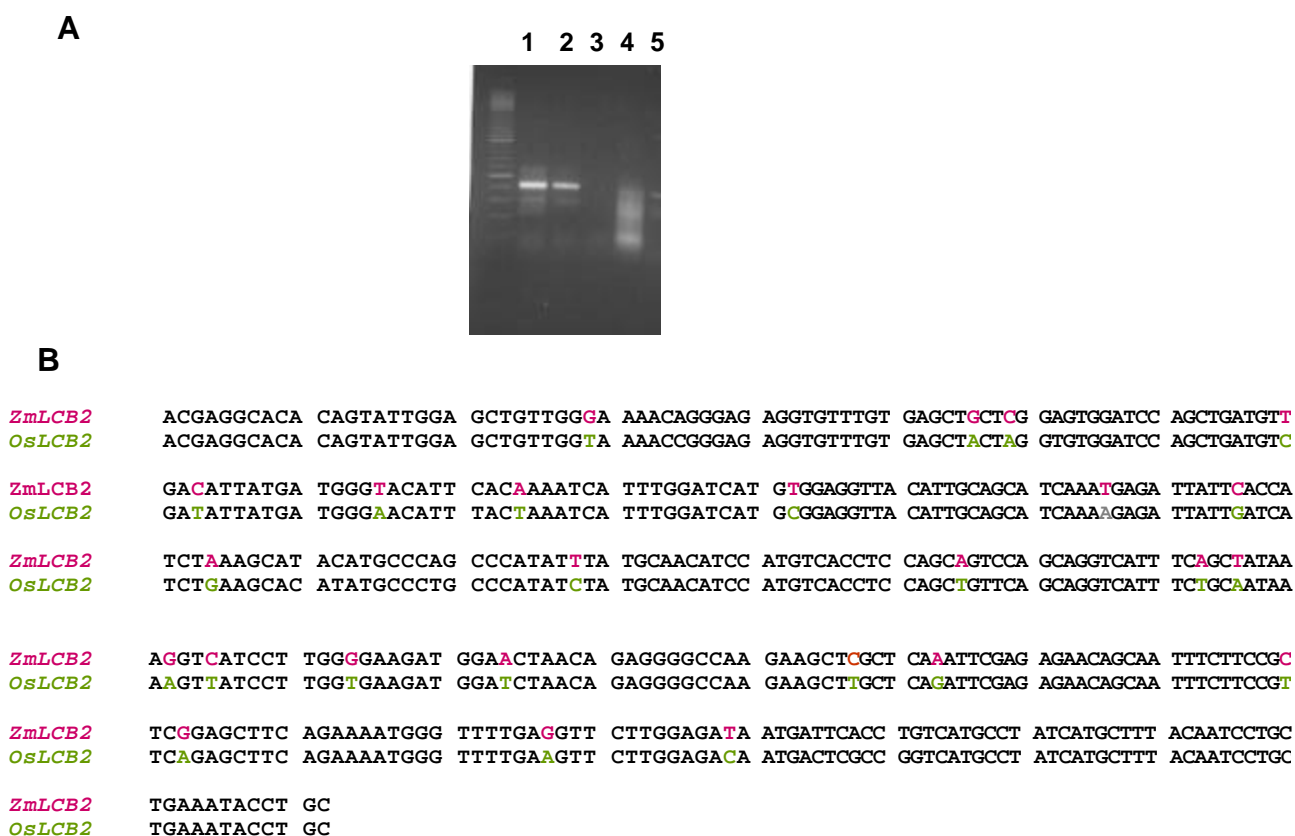
<sup>a</sup>Las medias seguidas con la misma letra en el mismo renglón no difieren significativamente.

### 3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITO DEL GEN *LCB2* DE LA SPT DE MAÍZ EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *F. verticillioides*.

#### 3.1 Clonación e identificación de *ZmLCB2*.

Para saber si la acumulación de esfinganina era resultado de una inducción transcripcional en la expresión de genes de la SPT, se evaluaron los niveles del transcrito de la subunidad catalítica (LCB2) de esta enzima.

Dado que se diseñaron cebadores heterólogos basados en la secuencia de arroz se realizó un ensayo de RT-PCR utilizando RNA de hoja de arroz como molde control y un pool de RNA de embriones de maíz de diferentes horas de germinación (6, 12, 24 y 48 horas). Con ambos moldes se obtuvo un producto de amplificación que migró arriba del marcador de 400 pb (Figura 23A carriles 2 y 3) y no se observó ningún otro producto de amplificación inespecífica en los controles negativos, que fueron la amplificación con el cebador Rv (Figura 23A carril 4) y la amplificación directa a partir de RNA (Figura 23A carril 5).



**Figura 23. Amplificación e identificación de *ZmLCB2*.** **A.** Amplificación del fragmento de 412 pb de la subunidad LCB2 de la SPT. Carril 1: Marcador PM 100 pb. Carril 2: cDNA de arroz + Fw + Rv. Carril 3: cDNA de embriones de maíz + Fw. Carril 4: cDNA de embriones de maíz + Rv. Carril 5: RNA de embriones de maíz **B.** Alineamiento a nivel de nucleótidos de la secuencia obtenida de *Zea mays* con la secuencia de *Oryza sativa* (No. Acceso CA766093)

Para confirmar la identidad del producto, éste se clonó en el vector p-GEM que se usó para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Se purificó el plásmido y se secuenció el inserto de 412 pb que se comparó con el cDNA de arroz (Figura 23B).

Se obtuvo un porcentaje de identidad del 91% a nivel de nucleótidos con esta secuencia. La traducción de la secuencia de nucleótidos generó un sólo marco abierto de lectura cuya secuencia se analizó usando el programa Blast que reportó exclusivamente secuencias de LCB2 de distintas especies y al alinear esta secuencia con las secuencias de las proteínas de arroz, papa y *A. thaliana* se encontró una alta identidad del 97 87 % y 86 % respectivamente. Además, se identificó en la secuencia de *ZmLCB2* el sitio de unión a piridoxal fosfato -GTFTKSFG-, motivo que está

conservado en todas las proteínas LCB2 de otras especies, incluyendo mamíferos y levadura (Figura 24).

		Región amino terminal									
A. thaliana.	MITIPYLTA	STYFSYGLLF	AFGQLRDFFR	RFIDWWF---	-----TSNLQ	GYAPICLQHE	DFYIRRLYHR	IQDCFERPIS			
S. tuberosum.	MITIPYLTAL	TYFSYGLLF	AFGQFREFFR	KIFDWR---	-----GNLQ	GYAPICLQLE	DFYIRRLYLR	IQDCFGRPIC			
O. sativa.	MVRVPFVTA	TVFSYGVIF	GFGHLRDWFR	ALLRSLFSGH	SPAAAGTNLK	GYAPICGGQE	DFYVRRFVRR	VQDCFWRPIA			
Z. mays.											
A. thaliana	SAPDAWFDVV	ERYSDNNKNT	LKRRTKTSRC	LNLGSYNYLG	FGSFDEYCTP	RVIESLKKFS	ASTCSRVDA	GTISVHAELE			
S. tuberosum	SPPDAWFDVV	ERLSNDNNKT	LKRRTKVSRC	LNLGSYNYLG	FAASDEYCTP	RVIESLKKYS	ASTCSARVDG	GTTSIHMELE			
O. sativa	SKPDAWFDVV	ERYSDNSNKT	LHRTTKTSRC	LNLGSYNYLG	FAAADEYCTP	RVIESLKKYS	ASTCSVRVDG	GNIKLHVELE			
Z. mays.											
A. thaliana	ECVTRFVVGKP	AAVVFMGYA	TNSAIIPVLI	GKGGLIISDS	LNHSSIVNGA	RGSGATIRVF	QHNTPSHLER	VLREQIAEQG			
S. tuberosum	ECVANFVGKP	AAIVTGMGYV	TNSAILPVLII	GKGGLIISDS	LNHNSIVNGA	RGSGATIRVF	QHNTPSHLEK	VLREHIAEQG			
O. sativa	ELVARFVGKP	AAILFGMGYV	TNSAIIPALI	GKGGLIISDS	LNHNSIVNGA	RGSGASVQVF	QHNPAPHLEE	VLREQIAGGQ P			
Z. mays											
A. thaliana	PRTHR PWKKI	IVVEGIYSM	EGEI CHLPEV	VAICKKYKAY	VYLDEAHSIG	AIGKTGKGIC	ELLGVDTADV	DVMGTFTKS			
S. tuberosum	PRTHR PWKKI	IVIVEGIYSM	EGELCQLPEI	VAICKKYKVY	VYLDEAHSIG	AVGKSGRGVC	ELLGVDTADV	DIMMGTFTKS			
O. sativa	RTHRRWKKI	IVIVEGIYSM	EGELCKLPEI	VAVCKKYKAY	TYLDEAHSIG	AVGKTGRGVC	ELLGVDPADV	DIMMGTFTKS			
Z. mays.											
A. thaliana	FGSCGGYIAG	SKELIQYLKH	QCPAHLIYATS	IPTPSAQQII	SAIKVILGED	GSNRGAQKLA	RIRENSNFFR	AELQKMGFEV			
S. tuberosum	FGSCGGYIAG	SKELIEYLKY	SCP AHLIYATS	ISPPAAQQII	SAIKVILGED	GTSRGAQKLA	RIRENSNFFR	SELQKMGFEV			
O. sativa	FGSCGGYIAA	SKEIIDHLKH	ICPAHIYATS	MSPPAVQQVI	SAIEVILGED	GSDRGAKKLA	QIRENSNFFR	SELEKMGFEV			
Z. mays	FGSCGGYIAA	SNEIIHHLKH	TCPAHIYATS	MSPPAVQQVI	SAIKVILGED	GTNRGAKKLA	QIRENSNFFR	SELQKMGFEV			
A. thaliana	LGDNDSPVMP	IMLYNPAKIP	AFSRECLRQK	VAVVVGFPFA	TPLLLARARI	CISASHSRED	LIRALKVISK	VGDLSGIKYF			
S. tuberosum	LGDNDSPVMP	IMIYNPGKIP	AFSRECLKRS	VAVVIVGFPFA	TPLLLARARI	CISAAHSRED	LNIALEVISK	VGDLTGIKYF			
O. sativa	LGDNDSPVMP	IMLYNPAKMP	AFSRECLRQK	VAIVTVSFPFA	TPLLLARARI	CISASHSRED	LKGLLEVISK	VGDLVGIKYL			
Z. mays	LGDNDSPVMP	IMLYNPAEIP									
A. thaliana	PAEPKIEQS	KNDIKLD									
S. tuberosum	PAEPKQQVE	ESRVKLE									
O. sativa	PVEHEKTTSA	EKLKKIQ									
Z. mays											

#### Región carboxilo terminal

**Figura 24. Alineamiento a nivel de aminoácidos de la secuencia de LCB2 obtenida de maíz (*Zea mays*) con la secuencia de LCB2 de otras especies vegetales.** *Arabidopsis thaliana* (No. Acceso NM\_122272), *Solanum tuberosum* (No. Acceso AJ242659) y *Oryza sativa* (No. Acceso NP914892). La región de unión a piridoxal fosfato se encuentra remarcada y la secuencia obtenida de *Zea mays* se encuentra subrayada.

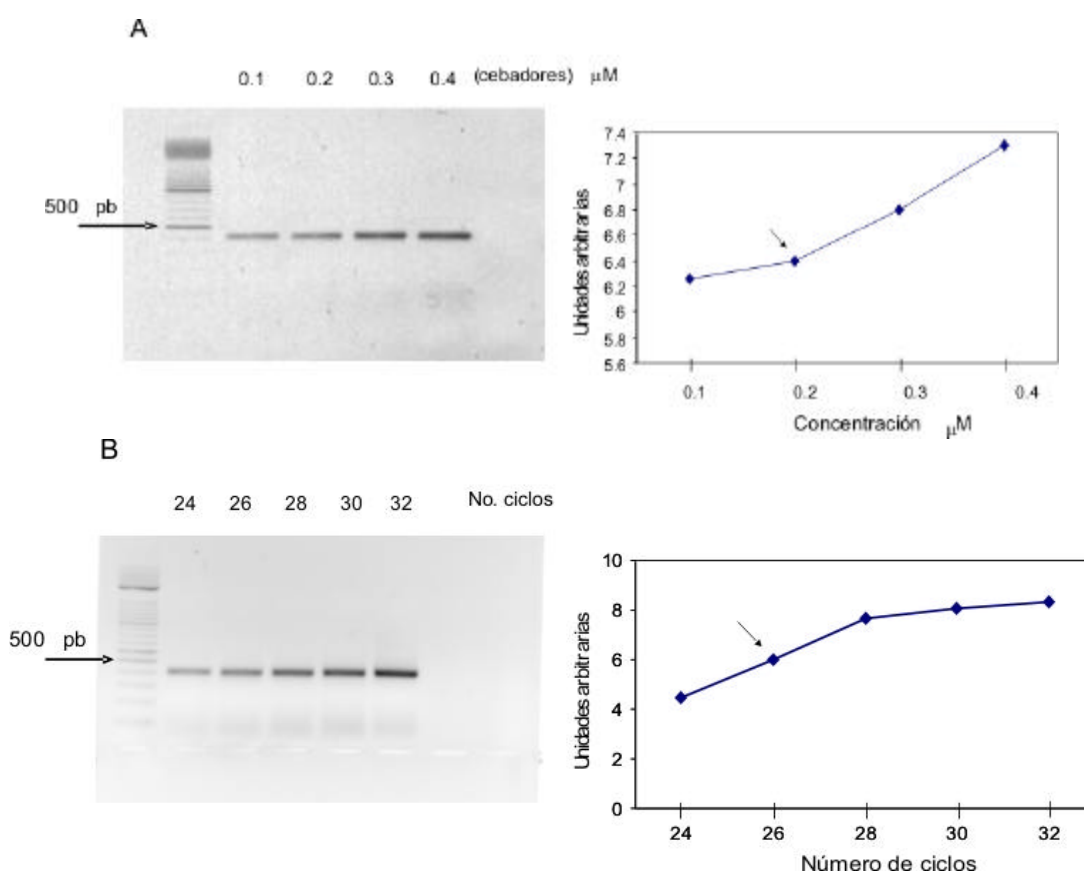
### 3.2. Optimización del ensayo semicuantitativo para el análisis del transcrito *ZmLCB2* por RT-PCR.

Para elegir la concentración de cebadores y el número de ciclos óptimos para la amplificación del producto de 412 pb de *ZmLCB2*, se realizaron diferentes ensayos de PCR a partir del cDNA obtenido por RT y se realizó el análisis densitométrico de la banda de 412 pb. Se probaron concentraciones de oligonucleótidos que variaron entre 0.1 y 0.4  $\mu$ M con 30 ciclos de amplificación. En la Figura 25A se observa que desde la



concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  se amplificó cuantitativamente el producto de 412 pb, y la intensidad de la banda incrementó en forma proporcional a la concentración de los cebadores. Se seleccionó una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$  para los análisis subsecuentes. A partir de esta concentración se probaron diferentes números de ciclos.

En la Figura 25B se observa una respuesta lineal entre 24, 26 y 28 ciclos, pero a partir de 28 ciclos la respuesta de la señal no fue significativamente diferente. Por lo que se eligió trabajar con 26 ciclos. De esta manera las condiciones de reacción de RT-PCR para la amplificación de *ZmLCB2* fueron: 57°C de temperatura de alineamiento, 0.2  $\mu\text{M}$  de concentración de oligonucleótidos y 26 ciclos de amplificación.



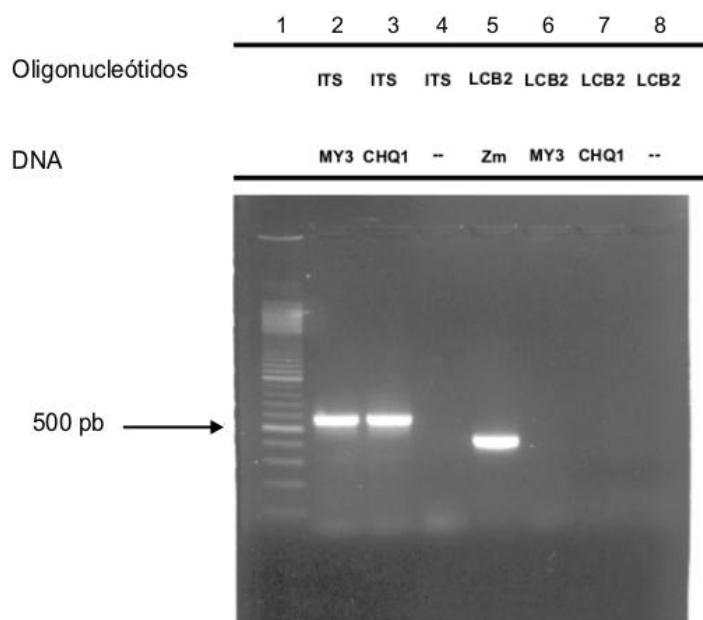
**Figura 25. Condiciones para la reacción de PCR para la amplificación de un producto de 412pb *ZmLCB2*. A. Concentración óptima de cebadores. B. Número de ciclos óptimos para la amplificación del producto de *ZmLCB2*.**

### 3.3. Prueba de especificidad de los oligonucleótidos que amplifican *ZmLCB2*.

La SPT es una proteína que se encuentra conservada en los organismos eucariontes mostrando, entre plantas y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una identidad entre el 40 y 50%. Por lo que se decidió realizar un ensayo para analizar si los oligonucleótidos diseñados para amplificar el fragmento de 412 pb de *ZmLCB2* podrían amplificar algún producto específico del gen *LCB2* del hongo patógeno utilizado. De esta manera se aseguraría que en el ensayo de RT-PCR semicuantitativo solamente se detectaría al transcrito de maíz.

Para esto se extrajo DNA genómico de las cepas MY3 y CHQ1 y éste se empleó para la amplificación por PCR de la región espaciadora intergénica transcribible (ITS) de 600 pb lo que permitió evaluar la calidad del DNA extraído y estar seguros que se puede realizar confiablemente un ensayo de PCR a partir de ese molde (Figura 26 carriles 2 y 3 ).

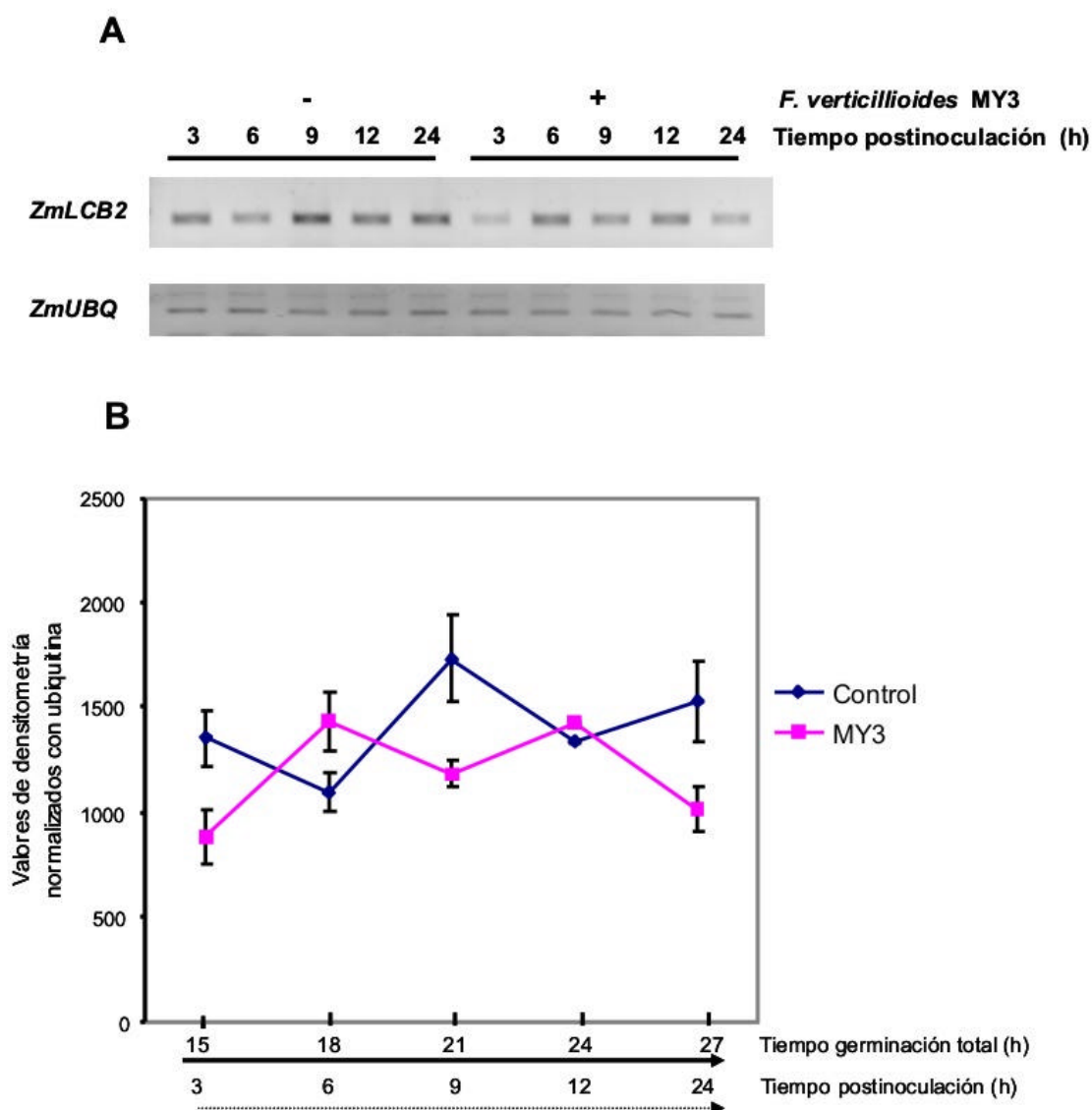
Se realizó entonces el ensayo de PCR para evaluar si los cebadores *LCB2* podrían amplificar un fragmento del gen *LCB2* de *F. verticillioides*. Se utilizaron las mismas condiciones ya establecidas para la amplificación de *ZmLCB2* y, como se muestra en la Figura 26 (carriles 6 y 7), no hubo ningún producto de amplificación, por lo que el fragmento de 412 pb de *LCB2* proviene exclusivamente del transcrito de maíz.



**Figura 26. Prueba de especificidad de los oligonucleótidos para amplificar *ZmLCB2*.** Para cada uno de las reacciones se utilizó 100 ng de molde, Zm=Zea mays, -- no se agregó DNA.

### 3.4. Ensayo de RT-PCR para el análisis de *ZmLCB2* en embriones de maíz durante la infección con *F. verticillioides*.

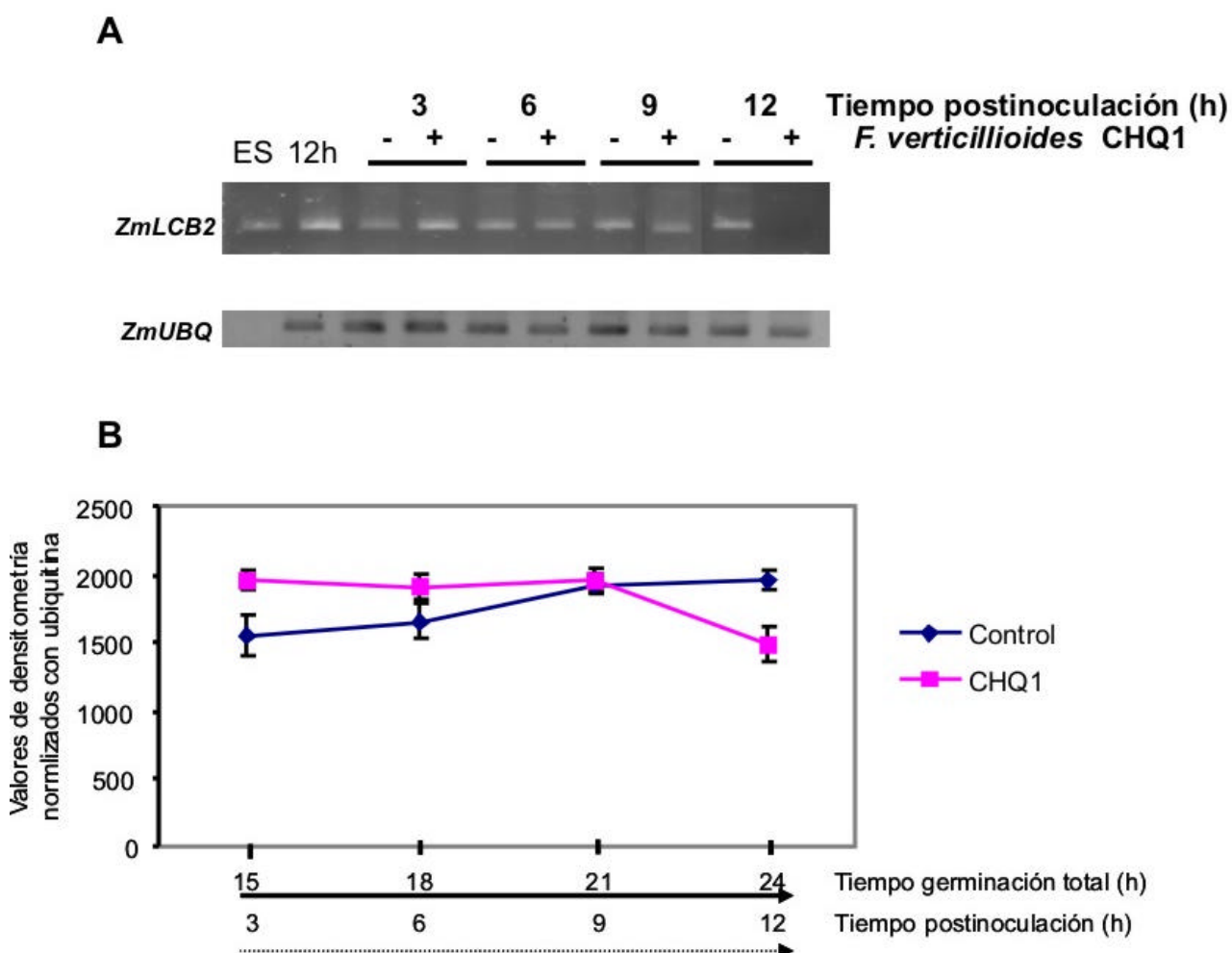
Una vez establecidas las condiciones para el ensayo de RT-PCR semicuantitativo, se analizaron los niveles del transcrito *ZmLCB2* en los embriones de maíz durante la infección con el hongo patógeno utilizando *ZmUBQ* como ya se describió (Figura 18C y 18D). Se realizó el análisis densitométrico del producto de amplificación de 412 pb en cada carril y se hizo una relación de los valores de cada tiempo con respecto al control.



**Figura 27.** Niveles del transcrito *ZmLCB2* en embriones de maíz durante la infección con la cepa MY3 de *F. verticillioides*. A. Niveles de expresión de *ZmLCB2* y *ZmUBQ* por RT-PCR semicuantitativo. B. Análisis densitométrico del transcrito *ZmLCB2* respecto al control corregidos con *ZmUBQ*.

Los niveles del transcrito *LCB2* fueron constantes a lo largo de la germinación (Figura 27A) y no se modificaron significativamente en los embriones inoculados con la cepa MY3 de *F. verticillioides*. Se observaron cambios discretos de alrededor del 25% que difícilmente se pueden considerar significativos, por la limitación de esta técnica.

Tampoco en los embriones inoculados con la cepa CHQ1 se observó un cambio significativo en los niveles del transcrito *ZmLCB2*, pues también se presentaron variaciones de alrededor del 25% con respecto al control (Figura 28A). En este experimento se incluyeron muestras también de embriones secos y de embriones de 12 h de germinación justo antes de la inoculación y se observa que los niveles de este transcrito fueron muy similares a los que se observa en las otras muestras.



**Figura 28. Niveles del transcrito *ZmLCB2* en embriones de maíz durante la infección con la cepa CHQ1 de *F. verticillioides*.** A. Niveles de expresión de *ZmLCB2* y *ZmUBQ* por RT-PCR semicuantitativo. B. Análisis densitométrico del transcrito *ZmLCB2* respecto al control y valores corregidos con los datos de *ZmUBQ*.

## VI. DISCUSIÓN

### **Interacción maíz-*Fusarium verticillioides*.**

El sistema de interacción planta patógeno que se estudió en este trabajo fue a través de la inoculación de embriones de maíz con *Fusarium verticillioides* (syn. *moniliforme*) durante la germinación. Este modelo representa una interacción natural dado que este hongo es uno de los fitopatógenos que frecuentemente se encuentra asociado a la semilla de maíz. La incidencia de esta especie en granos de maíz representa hasta el 80% del total de las cepas de hongos aislados (Cortez-Rocha *et al*; 2003; Sánchez-Rangel *et al*; 2005). Además, puede colonizar a la planta de maíz durante distintas etapas de desarrollo y en diferentes órganos como la raíz, tallo, mazorca y granos, causando la pudrición de éstos (Nelson, 1992).

*F. verticillioides* puede acceder a la semilla en formación a través de la infección del pistilo y crecer por el pericarpio del grano. Otras vías de entrada del hongo a la semilla son las fisuras y heridas causadas por acción del viento, lluvia ó insectos en la superficie del pericarpio (Nelson, 1992). La entrada por estos mecanismos en este tejido implica que el hongo queda estratégicamente posicionado para infectar una nueva planta durante los eventos de germinación y post-germinación. Aún en estas etapas tempranas del desarrollo, en las semillas se induce una serie de respuestas de defensa conducentes a contrarrestar el ataque del patógeno.

Se han establecido diversas estrategias para la inoculación de semillas de maíz con el hongo *F. verticillioides*. En todos los casos se utiliza una suspensión de conidias colectada a partir de un cultivo sólido de *F. verticillioides* en agar PDA de aproximadamente 1 semana de crecimiento. Las conidias son cuantificadas en un hemacitómetro y en la mayoría de los casos se utiliza una suspensión de conidias del orden de magnitud  $10^5$  (50  $\mu$ L en cada semilla). Lo que difiere en las distintas estrategias es la parte de la semilla utilizada así como el método de inoculación. En este trabajo se estableció la infección de embriones de maíz de 12 h de germinación que se mantuvieron por 30 min en una suspensión de conidias y posteriormente se sembraron en agar sólido. La principal diferencia de este sistema con el reportado por otros autores (Casacuberta *et al*; 1991) es que se utilizaron embriones de maíz en vez de semilla completa. La ventaja que ofrece el sistema establecido es que permite

estudiar las respuestas tempranas de las células del embrión a la presencia del patógeno, pues se observó inducción del gen ZmPR1 a partir de las 6 horas post-inoculación (h.p.i). En contraste, cuando se ha usado semilla completa, esta respuesta se observa a partir de las 48 h.p.i. (Casacuberta et al; 1991). Aunque el uso del embrión implica eliminar las barreras de defensa como el pericarpio y capa de aleurona, resultó útil este sistema pues, al disectar el endospermo y pericarpio, se eliminó la posibilidad de trabajar con semillas infectadas naturalmente con *F. verticillioides*. Como ya se indicó, este es un hongo muy ubicuo en maíz y se encuentra en el pericarpio de más del 80% de semillas de maíz (Sánchez-Rangel, 2003). Otra estrategia de inoculación que se ha utilizado es la establecida por Bluhm y Woloshuk (2005), en la cual utilizan semilla completa perforada con una aguja para facilitar la entrada y posterior colonización de conidias del hongo patógeno. Sin embargo este sistema no es óptimo para el estudio de los mecanismos de defensa del maíz pues se tendría que discernir entre las respuestas inducidas por el patógeno y las inducidas por daño por herida ocasionadas por la perforación.

La infección de *F. verticillioides* no tuvo un efecto significativo en la toma de agua de los embriones durante las primeras 12 h.p.i. que corresponde a la fase II de la germinación. Para la cepa MY3 solamente se observó una diferencia significativa con respecto al control a las 36 h.p.i. ( $p < 0.05$ ) presentando una reducción de aproximadamente un 30% en este parámetro fisiológico. A este tiempo, el tejido de maíz fue totalmente invadido por el hongo lo cual se puede apreciar a nivel macroscópico. Para la cepa CHQ1 se observaron diferencias significativas a las 24 h.p.i. con respecto al control ( $p < 0.001$ ); 12 h antes de lo que ocurre con la cepa MY3. Esta diferencia posiblemente se debe a que bajo las condiciones de humedad y temperatura utilizadas en el estudio se favoreció particularmente la germinación de conidias de la cepa CHQ1, lo que se tradujo en un mayor y rápido crecimiento de micelio en el tejido de maíz, o que en la suspensión de esporas existieran restos de micelio. Sin embargo, es relevante señalar que en las primeras horas postinoculación (3 a 15 h) en los cuales se centró este trabajo, es un intervalo que corresponde a la fase II de la germinación en donde ya existe un metabolismo celular muy activo como eventos de respiración, síntesis de ATP, síntesis de ARNm y de proteínas (Bewley & Black, 1986, Bewley, 1997). Además que

durante este periodo de tiempo no se observó un retraso en la germinación del embrión, lo que permitió el estudio de las respuestas celulares de éste.

Se analizó la expresión de *ZmPR-1*, un gen que codifica una proteína relacionada con la patogénesis (proteína PR). El análisis de la expresión de genes PR es muy útil ya que funcionan como marcadores de defensa y que en conjunto tienen la función de contrarrestar el ataque y diseminación del agente patógeno (Van Loon *et al*; 1999). La inducción de la expresión del transcrito de la proteína PR-1 se ha estudiado extensivamente en respuestas de defensa, sin embargo, su función es ambigua. Alexander y colaboradores (1993) observaron que plantas transgénicas de tabaco que expresan constitutivamente el gen *PR-1a* muestran una mayor tolerancia a la infección del oomiceto *Phytophthora parasitica*. También se ha demostrado directamente la actividad antifúngica de PR-1 de tomate pues, *in vitro*, esta proteína reduce la germinación de zoosporas de *Phytophthora infestans*, e *in vivo* reduce el área de infección en hojas de tomate ocasionadas por este hongo (Niderman *et al*; 1995).

En este trabajo se clonó un fragmento de *ZmPR-1* en base a una secuencia reportada de un transcrito de una proteína PR del grupo 1 que se induce en semillas de maíz con 3 días de imbibición infectadas con el hongo *F. verticillioides* (Casacuberta *et al*; 1991). A partir de la secuencia clonada de *ZmPR-1* se realizó un alineamiento múltiple de la proteína ZmPR-1 con proteínas PR-1 de otras especies vegetales y se encontró una identidad de 75-80% con proteínas PR-1 de especies monocotiledóneas, como arroz y cebada y un 53-56% de identidad con proteínas PR-1 de especies dicotiledóneas, como tabaco y *Arabidopsis*.

Se encontraron niveles elevados de *ZmPR-1* en los embriones de maíz infectados con ambas cepas de *F. verticillioides* y la inducción es clara y aproximadamente 2 veces con respecto a los embriones no inoculados a las 3 y 6 h.p.i. Esta inducción, es similar a lo observado por Casacuberta *et al*; 1991 en semillas completas de maíz inoculadas con una suspensión de conidias de *F. verticillioides* (2000-3000 conidias/mL). Estos autores encuentran una fuerte inducción a las 48 h.p.i., aunque no muestran resultados a tiempos más tempranos. La inducción de *ZmPR-1* observada también coincide con un reporte anterior en donde utilizaron un anticuerpo específico para determinar la localización celular y subcelular de PRms en tejidos de semillas de maíz infectadas con *F. verticillioides*. A las 24 h.p.i. se encontró una

acumulación de PRms en los tejidos que se encuentran en contacto con el patógeno como la capa de aleurona y el escutelo del embrión de maíz; así como en tejidos que no han estado en contacto directo con el patógeno (Murillo *et al*; 1999).

Es claro que en los controles de las 3 y 6 h.p.i de los embriones de maíz que corresponden al ensayo de la infección con la cepa MY3 (Figura 19A) contienen niveles detectables de *ZmPR-1*, a diferencia de los controles de los embriones infectados con la cepa CHQ1. Esto se puede deber a que los embriones utilizados, si bien provienen del mismo tipo de maíz, corresponden a lotes diferentes, por lo que posiblemente los embriones control que presentan niveles de *ZmPR-1* se encontraban previamente infectados. Los niveles del transcrito *ZmPR-1* a las 9 y 12 h.p.i. son comparables a los que se encuentran en los embriones no infectados. Esto no es sorprendente ya que se ha demostrado que durante la germinación de semillas de maíz, los niveles del transcrito de esta proteína se incrementan a medida que avanza la germinación (Casacuberta *et al*; 1991). Se ha postulado esto como un mecanismo de defensa preformado y, si ocurriera la infección durante ó inmediatamente después de la germinación, las células vegetales serán capaces de responder rápidamente ante el ataque de un patógeno. En nuestro laboratorio hemos observado la presencia de transcritos de otras PRs como quitinasas y glucanasas (SanJuan Badillo, 2001) así como el transcrito de la HRGP en ejes embrionarios de maíz durante la germinación (Greaves, 2005).

Es evidente que además de *ZmPR-1* se pueden inducir otro tipo de proteínas de defensa en esta interacción. Por ejemplo, se sabe por técnicas de proteómica que en embriones de maíz germinados por 20 horas e inoculados con esporas de *F. verticillioides* se inducen proteínas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa y catalasa, proteínas de choque térmico, factores de iniciación de la traducción y otras PRs como glucanasas y quitinasas (Campo *et al*; 2004).

### **Características de las cepas MY3 y CHQ1 de *Fusarium verticillioides*.**

*F. verticillioides* es una especie que produce varios metabolitos secundarios, y uno de los más abundantes es la FB1 que exhibe toxicidad tanto en animales como en plantas. Esta toxicidad se ha relacionado con la capacidad que tiene la FB1 en alterar el metabolismo de los esfingolípidos complejos pues es un inhibidor de la enzima



esfingánina-N-acil-transferasa que cataliza la acilación de la esfingánina, con una  $IC_{50}$  de 0.1  $\mu$ M en preparaciones microsomales de hígado de rata (Wang *et al*; 1991). Se ha observado que la FB1 causa degeneración encefálica en equinos, edema pulmonar en cerdos, efectos hepatotóxicos en ratas, y su consumo en maíz contaminado se ha asociado con cáncer esofágico en humanos (Marasas *et al*; 1988; Harrison *et al*; 1990; Gelderblom *et al*; 1991). En plantas, también se ha demostrado su efecto fitotóxico, pues en semillas de maíz inhibe la elongación radicular durante la germinación (Dohelert *et al*; 1994), en hojas de la maleza *Datura stramonium* produce fuga de electrolitos, necrosis y una reducción en el contenido de clorofila (Abbas *et al*; 1992), y en embriones de maíz inhibe la ATPasa de protones de la membrana plasmática y causa un incremento en la fluidez de ésta (Gutiérrez-Nájera *et al*; 2005).

Dado que en este trabajo se estudió la alteración del metabolismo de esfingolípidos asociados a la respuesta de defensa, abordamos la pregunta sobre si los cambios observados en el metabolismo de los esfingolípidos durante la interacción embriones de maíz-*F. verticillioides* era debido a la producción de FB1. Para responder este cuestionamiento usamos una cepa de *F. verticillioides* que no produce FB1 y analizamos tiempos muy tempranos en la infección en los cuales no hay establecimiento propio del hongo y probablemente no hay producción de FB1.

Los 15 genes de la ruta biosintética de la FB1 están estrechamente ligados en el cromosoma 1. Uno de estos genes, *FUM1* codifica para una policétido sintasa la cual participa en la primera reacción de la biosíntesis al catalizar la formación del esqueleto carbonado a partir de acetato. La función de este gen, se ha determinada al interrumpirlo pues ocurre una disminución en la producción de fumonisinas en un 99% (Proctor *et al*; 1999; Seo *et al*; 2001). La presencia de este gen se ha asociado a producción de altos niveles de la toxina en algunas cepas de *F. verticillioides* ya que 13 cepas que producen FB1 en niveles mayores a 500  $\mu$ g/g de sustrato se encuentra presente el gen (Sánchez-Rangel *et al*; 2005). La cepa MY3 produce altos niveles de FB1 (1.7 mg FB1/g sustrato) a los 28 días de incubación, mientras que en la cepa CHQ1 no se encuentra el gen, y en las mismas condiciones de incubación no se detecta FB1 (Sánchez-Rangel *et al*; 2005).

Además, para que ocurra la producción de FB1, el hongo debe estar bien establecido es decir que las conidias germinen y formen el micelio. Cuando *F.*

*verticillioides* crece sobre granos de maíz como sustrato a una temperatura de 30°C y una  $a_w$  de 0.98 se observa que las esporas germinan aproximadamente a las 10 h y las hifas se elongan entre las 16 y 20 h de incubación (Torres *et al*; 2003). En semillas infectadas con una suspensión de conidias de *F. verticillioides* se detectan niveles de FB1 a partir de las 72 h post-inoculación (Bluhm y Woloshuk, 2005). Esto sugiere que en el intervalo de tiempo analizado en este trabajo (3 a 15 h.p.i.) la cepa MY3 no produce FB1 pues las conidias se encuentran en etapas muy tempranas de su germinación. A partir de embriones de maíz infectados por 9, 12 y 24 h por la cepa MY3 se realizó una extracción de FB1 y un análisis por TLC con un límite de detección aproximado de 500  $\mu$ g FB1/g sustrato (Sánchez Rangel *et al.* 2005). Este ensayo no mostró ninguna mancha con un  $R_f$  similar o igual al RF que presentó el estándar de FB1 utilizado (resultados no mostrados).

La biosíntesis de fumonisina no solo depende de los genes en el cromosoma 1 sino de condiciones ambientales como pH, disponibilidad de nitrógeno y composición bioquímica del grano de maíz. Además, también depende de productos de genes que no se encuentran en el cromosoma 1, como la ciclina Fcc1 que interactúa con Fck1, una cinasa dependiente de ciclina que regula la producción de fumonisina y la formación de conidias (Flaherty *et al*; 2004; Bluhm y Woloshuk, 2006). Otro gen, *PAC1* que se sugiere es un represor transcripcional de los genes *FUM* (Flaherty *et al*; 2004) y *ZFR1* que codifica para un polipéptido que contiene un motivo de unión a DNA y que pertenece a una familia de reguladores del metabolismo secundario de hongos.

### **Elevación de esfinganina en embriones de maíz durante la infección de *Fusarium verticillioides*.**

Debido a que los esfingolípidos, además de formar parte de las membranas celulares, tienen funciones de señalización, se exploró si ocurre alteración en los niveles de estos lípidos cuando la planta es retada con *F. verticillioides*. Se cuantificaron los niveles de esfinganina y fitoesfingosina debido a que la primera base esfingoidea es un intermediario en la biosíntesis de esfingolípidos complejos, y la segunda es un producto de hidroxilación de esfinganina (Dunn *et al*; 2004; Sperling *et al*; 2003).

En la Figura 22 se muestran los niveles de esfinganina a las 3, 6, 9, 12 y 15 h.p.i. y en este intervalo de tiempo se observaron niveles constantes en las muestras control mientras que en los embriones infectados 9 h.p.i. se observó un incremento del 100% y 56% en los niveles de esta base con las cepas MY3 y CHQ1 respectivamente. A los dos tiempos posteriores (12 y 15 h.p.i.) los niveles de esfinganina fueron significativamente menores que en los embriones no inoculados. La fitoesfingosina se encontró en niveles muy bajos por lo que se dificultó su cuantificación y análisis. Solamente en las muestras de 9 h.p.i. se pudo detectar esta base y se observó un incremento de 3 veces en los embriones inoculados con la cepa MY3 ( $1.18 \pm 0.37$  pmoles/mg tejido fresco) con respecto al control ( $0.40 \pm 0.25$  pmoles/mg tejido fresco). En los embriones inoculados con la cepa CHQ1 no se observaron cambios significativos en los niveles de esta base esfingoidea ( $0.51 \pm 0.15$  pmoles/mg tejido fresco) lo que se deba posiblemente a que el incremento en la esfinganina es 50% menor que el incremento que se presenta con la cepa MY3. Estos resultados corresponden a un incremento real en los niveles de esfinganina pues, como ya se demostró, durante estos tiempos no ocurrió ningún cambio en la masa del embrión inoculado con respecto al control. El incremento en los niveles de esfinganina puede tener significado fisiológico relevante pues los niveles de esta base esfingoidea se mantienen constantes durante la germinación, esto evaluado desde las 12 hasta las 60 horas de germinación total (Rivas SanVicente, 2001).

También se identificaron otros picos de elución en los cromatogramas obtenidos para el análisis de bases esfingoideas que resultaron de nuestro interés por la abundancia en la que se presentan, un primer pico con un tiempo de retención entre 6.8 - 7.2 min y un segundo pico con tiempo de retención entre 7.8 - 8.1min. De acuerdo al principio de la técnica de extracción y posterior reacción de derivatización utilizadas, se puede inferir que los picos corresponden a compuestos de naturaleza lipídica con un grupo amino libre que reacciona con el NDA; por lo que posiblemente son también bases esfingoideas. Además, el patrón de acumulación de los compuestos que eluyen en ambos picos, a las 9 y 12 h.p.i, es similar al de la esfinganina y, por los tiempos de retención pudieran corresponder a bases más polares que la esfinganina, por ejemplo podría ser una base esfingoidea dihidroxilada con una o dos insaturaciones. Se sabe que en plantas, a diferencia de mamíferos y *S. cerevisiae*, la composición de las bases esfingoideas es más variable. La mayoría se derivan de la D-eritro-esfinganina (DHS)

como los isómeros *cis* y *trans* de la 4,8-esfingadienina (d18:2), 4-dihidroxi-8-esfingenina (t18:1) y la 8-esfingenina (d18:1) las cuales son las más abundantes y que se muestran en la Figura 8. Para formar estas bases derivadas de la DHS se requiere de la actividad de tres enzimas: la LCB  $\Delta^4$ -desaturasa, LCB  $\Delta^8$ -desaturasa y LCB 4-hidroxilasa. La LCB  $\Delta^8$ -desaturasa no es estereo específica ya que forma isómeros *cis* y *trans* en la posición  $\Delta^8$ -, además que reconoce tanto di y tri-hidroxi LCBs; por lo que se ha atribuido que la heterogeneidad estructural de los esfingolípidos en plantas se debe en gran medida a la actividad de esta enzima. (Sperling et al; 2002).

Resulta interesante el incremento en los niveles de esfinganina observados tres horas después de sumergir a los embriones en agua o en la suspensión de esporas. Este incremento se pudiera atribuir al estrés osmótico y/o mecánico que sufren los embriones durante el proceso de inoculación y no asociado al desarrollo durante la germinación pues sabemos que los niveles de esfinganina se mantienen constantes a lo largo de la germinación (Rivas SanVicente, 2001). Aunado a este primer incremento, los niveles de esfinganina se duplicaron en los embriones inoculados con *F. verticillioides*. Esta elevación súbita del intermediario de la biosíntesis de esfingolípidos resulta muy interesante pues sugiere que esta molécula pudiera estar participando en una cascada de señalización pues cumple las características principales de un segundo mensajero (Nelson, 2001): 1) es una molécula de bajo peso molecular que puede difundir libremente en la célula, 2) bajo condiciones de homeostasis celular, que en este caso son los embriones no inoculados se encuentra en niveles bajos y constantes (Dickson et al; 1997, Meier et al; 2006) y 3) su elevación es transitoria. En este estudio se tomaron muestras cada tres horas pero será interesante determinar en el intervalo entre 6 y 9 h.p.i, el tiempo preciso de mayor acumulación de este metabolito.

De acuerdo a la temporalidad de la acumulación de esfinganina y al tipo de estímulo, esta base esfingoidea podría estar participando en eventos tempranos de la respuesta de defensa iniciados posiblemente por el reconocimiento, vía receptores de membrana plasmática, de algún componente de la pared celular de las conidias del hongo. En embriones de maíz tanto la esfinganina como la fitoesfingosina aplicadas exógenamente, inducen un aumento en los niveles de ácido salicílico, que es una

molécula de señalización que participa en la respuesta de defensa y en la resistencia sistémica adquirida. Este incremento en los niveles de ácido salicílico se puede explicar porque la esfinganina exógena induce la expresión del transcrito de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), la primera enzima de la ruta biosintética de fenilpropanoides para la producción de fitoalexinas y ácido salicílico (Rivas San Vicente, 2004). Asimismo, la esfinganina (20  $\mu$ M) induce la producción del radical superóxido por una NADPH oxidasa, medido por reducción de NBT, en embriones de maíz (Rodríguez-Mejía, 2006).

La elevación en los niveles de bases esfingoideas, como parte de una respuesta a estrés, también se ha demostrado en otros organismos. En *Saccharomyces cerevisiae* sometida a estrés por calor (37-39°C) se observa un incremento en los primeros 20 min en los niveles de esfinganina y fitoesfingosina de 2 a 3 veces con respecto al control. Este incremento es transitorio pues aproximadamente a los 40 min se alcanzan niveles similares al control (Dickson *et al*; 1997). Se ha propuesto esta elevación transitoria de bases esfingoideas como un mecanismo de señalización para activar un metabolismo termoprotector. Entre los blancos celulares propuestos está la activación, por esfinganina exógena, del gen *TPS2* que codifica para la subunidad de la trealosa sintasa, enzima que cataliza la formación del disacárido trealosa, un termoprotector de proteínas y membranas durante el estrés por calor (Dickson *et al*; 1997). Por otra parte, la fitoesfingosina exógena activa la vía proteolítica dependiente de ubiquitina del proteasoma 26S. En la mutante condicional *lcb1-100*, que es incapaz de sintetizar esfingolípidos *de novo* a altas temperaturas, se reduce la proteólisis durante el estrés por calor (Chung *et al*; 2000). Asimismo, se ha demostrado que se requieren bases esfingoideas para el inicio de la traducción de proteínas durante la respuesta a estrés por calor en *S. cerevisiae*. La mutante *lcb1-100* presenta una reducción de más del 50% en la incorporación de [<sup>35</sup>S]-Met en las proteínas durante el choque térmico, sugiriendo que la síntesis de bases esfingoideas influye en el inicio de la traducción, regulando de alguna forma la unión del complejo iniciador en 5'-cap. Esta reducción no se observó en cepas mutantes incapaces de fosforilar a las bases esfingoideas, ni en cepas incapaces de producir ceramida, por lo que el efecto observado se debe al déficit de bases esfingoideas. (Meier *et al*; 2006).

La actividad biológica de las bases esfingoideas también se ha demostrado en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*. Tanto la esfinganina como la fitoesfingosina exógenas inducen eventos característicos de muerte celular apoptótica, pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, condensación de DNA y fragmentación de DNA (Cheng *et al*; 2003). En la planta *Commelina communis* el incremento en los niveles de ABA durante el estrés por sequía estimula la producción de esfingosina 1-fosfato (S1P) que induce un incremento en la concentración de  $Ca^{2+}_{cit}$  en las células guardia y la consecuente reducción de la apertura del estoma (Ng *et al*; 2001).

La literatura sobre esfingolípidos como moléculas de señalización en plantas contrasta con lo que se conoce sobre fosfolípidos, por lo que es interesante comparar ambos campos. El catabolismo de fosfolípidos membranales propiciado por la acción de fosfolipasas, origina moléculas con actividad biológica, como el ácido fosfatídico (PA) y ácidos grasos libres. En células en suspensión de tomate (*Lycopersicon esculentum*) tratados con elicitores inespecíficos, como quitotetraosa, xilanasas ó flg22, se induce un incremento de PA en los primeros 2 min, alcanzando un máximo alrededor de los 10 min y regresando a un estado basal aproximadamente a los 80 min (van der Luit *et al*; 2000). Los niveles de PA registrados fueron de 2 a 4 veces mayores que en los controles, y este incremento fue transitorio, al igual que el comportamiento que se observó en los niveles de esfinganina en embriones de maíz durante la infección con *F. verticillioides*.

Otro producto de la actividad de fosfolipasas (PLA) son los ácidos grasos libres que pueden funcionar como sustratos para generar oxilipinas, que se ha postulado, tienen actividad antimicrobiana (Mueller *et al*; 1993). En plantas de *Eschscholtzia californica* tratadas con un elicitador de levadura se incrementan los niveles de ácido linolénico alcanzando un máximo entre las 2 y 3 horas después del tratamiento y los niveles se mantienen a lo largo de 3 h posteriores. El mayor incremento presentado fue de 2 a 3 veces respecto al control y a tiempos muy tempranos, sin embargo no se sabe si es transitorio debido a que no se monitorearon tiempos posteriores (Mueller, 1993). La función de los ácidos grasos como mediadores de una respuesta de defensa, se ha propuesto de acuerdo a experimentos realizados con la mutante de *Arabidopsis fad7/fad8*, la cual es incapaz de sintetizar ácidos grasos trienólicos 16:3 y 18:3. Esta

mutante desarrolla una ineficiente respuesta de resistencia contra cepas avirulentas de *P. syringae* y no presenta un estallido oxidativo (Yaeno *et al.* 2004). Nuestros resultados sugieren que se requieren elevaciones discretas en los niveles endógenos de ciertos mediadores lipídicos para amplificar una respuesta de defensa a estrés por patógenos. Estas elevaciones ocurren inmediatamente o durante las primeras horas postinfección, lo que coincide con el incremento discreto de la esfinganina en los embriones de maíz infectados durante 9 h con *F. verticillioides*.

### **Niveles de *ZmLCB2* en embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides*.**

Dado el incremento en los niveles de esfinganina observado, se exploró si este evento se podría asociar a una activación transcripcional de la SPT, pues además se tiene el antecedente de que los niveles de transcrito de una de sus subunidades (*LCB2*) se elevan durante la reacción de resistencia en papa, inoculada con el hongo *Phytophthora infestans* (Birch *et al.*; 1999).

Para esto, se clonó un fragmento de 412 pb de cDNA de la subunidad *LCB2* de maíz y se analizaron los niveles de transcrito por RT-PCR semicuantitativo en embriones de maíz inoculados con *F. verticillioides*. Por esta técnica, no se observaron diferencias significativas en los niveles de transcrito de *LCB2* durante la infección con el fitopatógeno, pues sólo se observó un aumento discreto del 20–25% durante las primeras horas en los embriones inoculados con *F. verticillioides*. Esto sugiere que la esfinganina se acumula en etapas tempranas durante la respuesta de defensa, pero su acumulación no se asocia a una inducción transcripcional de la enzima SPT. Este resultado no descarta, sin embargo, que la elevación en los niveles de esfinganina sea producto de la biosíntesis *de novo*, pues la actividad de la enzima puede estar regulada a nivel post-traducciona. Este tipo de regulación se ha observado en células de mamíferos sometidos a distintos estímulos que inducen apoptosis. El tratamiento de células PCC7-Mz1 de carcinoma de ratón con ácido retinóico produce una acumulación de 3.5 veces respecto al control en los niveles de ceramida a las 24 h después del tratamiento. Esta elevación coincide temporalmente con un incremento de 2.5 veces en la actividad de la SPT sin que se presente un aumento en los niveles del ARNm (Herget *et al.*; 72000). De la misma forma, el tratamiento de células de humano Molt-4 con el agente etopósido eleva la actividad aproximadamente 2 veces respecto al control de la

SPT en las primeras 10 h así como los niveles intracelulares de ceramida sin un incremento en los niveles de ARNm de *LCB1* y *LCB2* (Perry *et al*; 2000). Finalmente, células C6 de glioma de rata tratadas con cannabinoides presentan un aumento en los niveles de ceramida que se relaciona también con una mayor actividad de la SPT mientras que los niveles de transcrito y proteína tanto de *LCB1* como *LCB2* permanecen constantes (Gómez del Pulgar *et al*; 2002).

Además de una posible activación post-traducciona de la SPT, el incremento en los niveles de esfingina puede provenir de la activación del catabolismo de esfingolípidos con la participación de las enzimas ceramidasa. Las ceramidasa son enzimas que hidrolizan la ceramida generando una base esfingoida y un ácido graso. Aunque no se ha caracterizado la actividad de ceramidasa en plantas, el genoma de *Arabidopsis* contiene secuencias de los ortólogos *YDC1* y *YPC1* de levadura que codifican ceramidasa alcalinas con pH óptimo de 9.5 y que muestran especificidad por fito y dihidroceramida *in vitro* (Dunn *et al*; 2004; Mao *et al*; 2000).

El catabolismo de esfingolípidos como una vía regulada en eventos celulares ha sido estudiado en mamíferos principalmente en el ciclo de la esfingomielina. Los catabolitos biológicamente activos de la esfingomielina son la esfingosina 1-fosfato (S1P), esfingosina y ceramida. La esfingomielina es el esfingolípido complejo más abundante en células de mamífero y las primeras enzimas que participan en esta vía son fosfolipasas denominadas esfingomielinasas. Estas enzimas hidrolizan esfingomielina para producir ceramida y fosfocolina. Las esfingomielinasas pueden ser activadas por varios estímulos, como el factor TNF $\alpha$ , lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Ox-LDL) y factores de crecimiento. Una vez que se ha formado la ceramida, el metabolito biológicamente activo, éste también puede ser hidrolizado por ceramidasa para formar esfingosina e inmediatamente ésta puede ser fosforilada para producir esfingosina 1-fosfato, un importante segundo mensajero en mamíferos (Alewijns *et al*; 2004, Futerman y Hannun, 2004).

Aunque en este trabajo no se midieron los niveles de *LCB1*, sería importante conocer el perfil de expresión en el sistema en estudio pues se ha sugerido que esta subunidad tiene un papel regulatorio. En experimentos de expresión transitoria en



células CHO, la acumulación de LCB2 solamente ocurre si hay co-expresión de LCB1. En cambio, los niveles de LCB1 se pueden incrementar en ausencia de LCB2 (Yasuda *et al*; 2003).

De esta forma se puede plantear que el incremento en los niveles de esfinganina puede provenir principalmente de dos vías que se ilustran en la Figura 29: 1) mecanismos que no dependen de la acción de la toxina FB1 y 2) un mecanismo que depende de la actividad de la toxina FB1. Entre los mecanismos que no dependen de la producción de FB1 por parte del hongo patógeno, se encuentran la activación de la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos, que de acuerdo a los resultados obtenidos, no se debe a una activación transcripcional, probablemente se deba a una activación a nivel traduccional o post traduccional de la primera enzima involucrada en la biosíntesis. También, los niveles de esfinganina pueden provenir de la actividad de una ceramidasa que hidrolizará a su sustrato ceramida para generar la base esfingoidea (esfinganina) y su correspondiente ácido graso.

Por otro lado, aunque menos probable, se puede presentar un mecanismo dependiente de la producción de FB1 por el hongo. Si el hongo produce fumonisina B1, la cual es un inhibidor competitivo de la esfinganina N-acil transferasa, causa una acumulación de esfinganina y un decremento en los niveles de ceramida y esfingolípidos complejos (Wang *et al*; 1991, Abbas *et al*; 1992). Una vez que se ha provocado un aumento en los niveles de esfinganina, probablemente ésta participe como mediador en una respuesta de defensa activando la transcripción específica de genes relacionados con un metabolismo de defensa como genes PR e intermediarios de la biosíntesis de fenilpropanoides como el SA (Rivas SanVicente, 2004), y especies reactivas de oxígeno (Rodríguez-Mejía, 2006).

Este trabajo aportó evidencia de la acumulación de un intermediario de la biosíntesis de esfingolípidos durante los eventos tempranos de una respuesta de defensa en plantas. Esto se estudió estableciendo la interacción embriones de maíz en germinación - *Fusarium verticillioides* que resultó un sistema interesante y atractivo para estudiar la participación de los esfingolípidos en la respuesta de defensa y la comunicación química entre el patógeno y la planta pues *F. verticillioides* es un patógeno ubicuo del maíz y su presencia en la semilla es una forma de acceder a la

plántula. En trabajos futuros sería interesante explorar las posibilidades que se plantean en la Figura 29 con respecto al origen de la acumulación de esfinganina. En primer lugar para discernir entre la biosíntesis *de novo* y el catabolismo de esfingolípidos se podrían seguir las siguientes estrategias. Utilizar un inhibidor altamente específico de la biosíntesis *de novo*, como es el compuesto miriocina, que se sabe que a una concentración 1  $\mu\text{M}$  inhibe completamente la síntesis *de novo* de los esfingolípidos en células CHO (Hanada *et al*; 2000b). Los embriones serían pretratados con el inhibidor y posteriormente inoculados con *F. verticillioides*, y si aún se presenta acumulación de esfinganina entonces posiblemente el origen de la esfinganina es por el catabolismo de esfingolípidos. Entonces al tratar a los embriones de maíz con ( $^{14}\text{C}$ )-Ser, se evaluaría por cromatografía en capa fina (TLC) los niveles de esfingolípidos complejos, de ceramida y de bases esfingoideas. Si hay una reducción en los niveles de esfingolípidos complejos, así como de ceramida sugeriría que el aumento en los niveles de esfinganina es por la activación de una vía catabólica de los esfingolípidos complejos. Para evaluar la posibilidad planteada en la figura 1DB, se debería hacer un análisis más detallado de la posible producción de FB1 por *F. verticillioides*. Se podría cuantificar por una técnica más sensible, como HPLC, los niveles de fumonisina en la suspensión de conidias utilizada, así como en los embriones de maíz de 3, 6, 9, y 12 h.p.i. También se podría utilizar un patógeno incapaz de producir FB1 como *F. osyxporem* y analizar si se induce la acumulación de esfinganina. Posteriormente se deberá evaluar la función de la esfinganina en la posible activación de respuestas de defensa. Esto aplicando esfinganina exógena en embriones de maíz y estudiar su efecto en la inducción transcripcional de genes relacionados con la patogénesis o en la actividad de algún intermediario en vías de señalización como proteínas cinasas.

De esta forma se empezarán a contestar preguntas acerca del papel funcional de los esfingolípidos durante la transducción de las señales durante la invasión de un patógeno para responder rápidamente ante este ataque aumentando así las probabilidades de la planta a sobrevivir en el medio ambiente desfavorable.

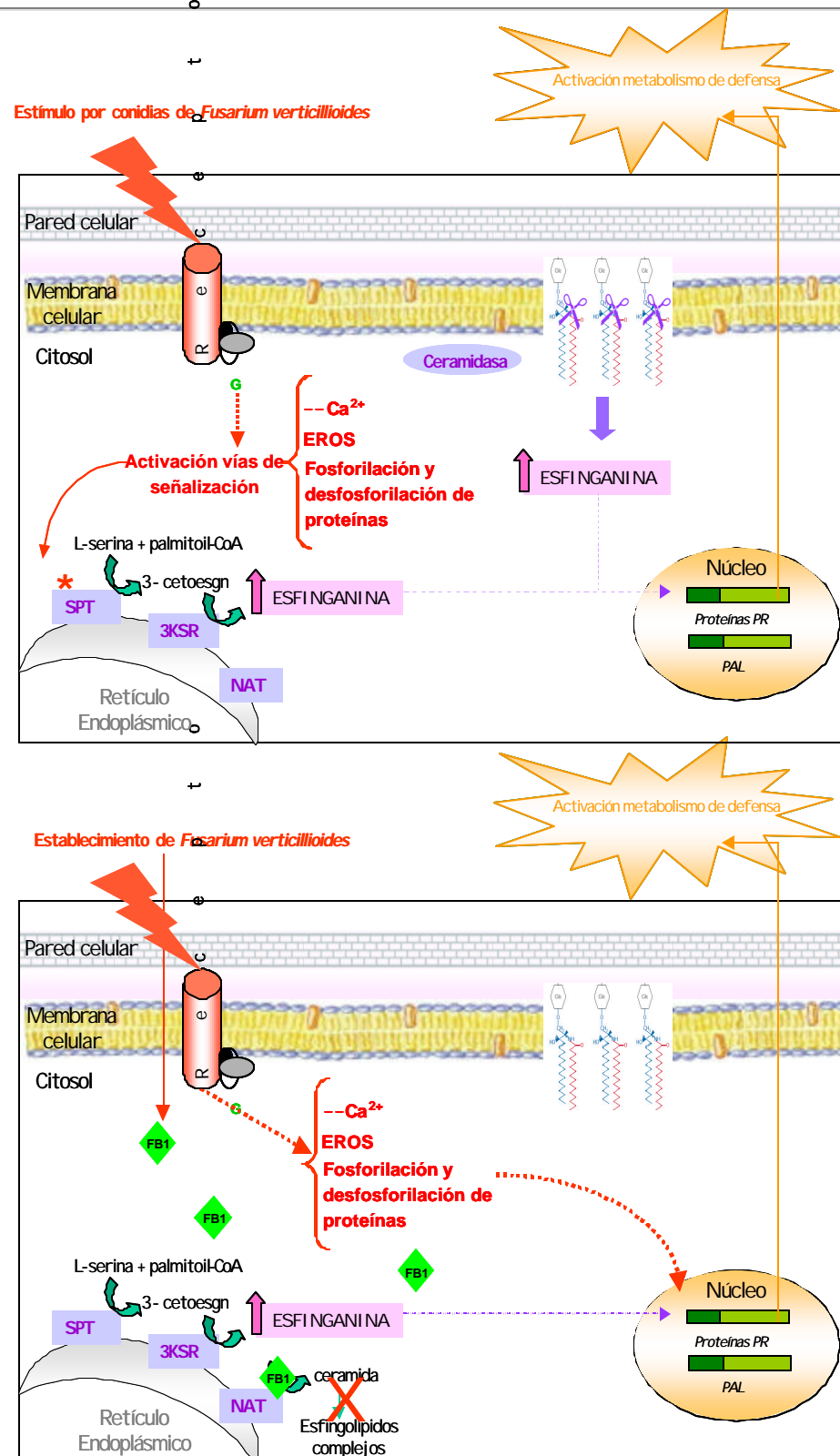


Figura 29. Mecanismo propuestos para el incremento en los niveles de esfinganiina en embriones de maíz durante la interacción con *Fusarium verticillioides*. A) Mecanismos independientes de FB1, B) Mecanismos dependientes de FB1. SPT: serina palmitoil transferasa, 3KSR: 3-cetodihidroesfinganiina reductasa, NAT: N-aciltransferasa, FB1: fumonisina B1. PR: relacionadas con la patogénesis.



## VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se estableció un sistema de inoculación reproducible para estudiar la respuesta de defensa en embriones de maíz a la infección de *Fusarium verticillioides*, hecho que se comprobó por la elevación (3 – 6 h) en los niveles del transcrito *ZmPR-1*, un gen relacionado con la patogénesis. Esta respuesta precedió a la elevación en los niveles de esfinganina que se incrementaron transitoriamente, indicando una alteración en el metabolismo de esfingolípidos como parte de la respuesta de defensa. Este incremento en los niveles de esfinganina no parece asociarse a una activación transcripcional del gen LCB2 que codifica una de las subunidades de la serina palmitoil transferasa, la primera enzima en la biosíntesis de esfingolípidos. El incremento en los niveles de esfinganina es independiente a la presencia de FB1 pues se observó en los embriones de maíz inoculados con la cepa no productora de la toxina y durante las primeras horas de la infección en las que, probablemente, no hay producción de toxina en la cepa MY3. Estos resultados sugieren que la esfinganina podría tener una función en la señalización durante la respuesta temprana de defensa del maíz al ataque de patógenos, aunque sus blancos no los hemos identificado pues la elevación del transcrito *ZmPR1* precedió a la elevación en los niveles de la base esfingoidea.



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K; Mirocha, C.J; Meronuck, R.A; Pokorny, J.D; Gould, S.L; Kommedahl, T. 1988. Mycotoxins and *Fusarium spp.* associated with infected ears of corn in Minnesota. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1930-1933.
- Abbas, H.K; Paul, R.N; Boyette, C.D; Duke, S.O. 1992. Physiological and ultrastructural effects and fumonisin on jimsonweed leaves. *Can. J. Bot.* 70: 1824-1833.
- Alewijnse, A.E; Peters, S.L; Michel, M.C. 2004. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br. J. Pharmacol.* 143: 666-684.
- Alexander, D; Goodman, R.M; Gut-Rella, M; Glascock, C; Weyman, K; Friedrich, L; Maddox, D; Ahl-Goy, P; Luntz, T; Ward, E. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 7327-7331.
- Almeida, A.P; Fonseca, H; Fancelli, A.L; Direito, G.M; Ortega, E.M; Correa, B. 2002. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 3877-3882.
- Apel, K; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Arnold, R.S; Newton, A.C. 1991. Inhibition of the insulin receptor tyrosine kinase by sphingosine. *Biochemistry* 30: 7747-7754.
- Assmann, S.M. 2002. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell.* 14: 355-373.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1992. *Short protocols in Molecular Biology*. 2<sup>a</sup> Ed. John Wiley & Sons. New York.
- Bakan, B; Melcion, D; Richard-Molard, D; Cahagnier, B. 2002. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic traditional maize and genetically modified maize grown in France and Spain. *J. Agric. Food. Chem.* 13: 728-731.
- Balandin, M; Royo, J; Gomez, E; Muniz, L.M, Molina, A; Hueron, G. 2005. A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol. Biol.* 58: 269-282
- Bewley, J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell.* 9: 1055-1066.
- Bewley, J. y Black, M. *Seeds Physiology of development and germination*. 2a Ed. Plenum Press. EUA. 1986. pp
- Birch P, Avrova A, Duncan J, Lyon G, Toth R. 1999. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. 12: 356-361.
- Bluhm, B.H; Woloshukm C.P. 2005. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18:1333-1339.
- Bluhm, B.H; Woloshuk, C.P. 2006. Fck1, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with Fcc1 to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 43: 146-154.
- Bonas, U; Lahaye, T. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 44-50.
- Bourque, S; Binet, M.N; Ponchet, M; Pugin, A; Lebrun-García, A. 1999. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 274: 34699-34705.
- Bove, J; Jullien, M; Grappin, P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biol.* 3:1002.1-1002.5
- Brodersen P, Petersen M, Pike H, Olszak B, Skov S, Odum N, Jorgensen L, Brown R, Mundy J. 2002. Knockout of Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH11 encoding a

- sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* 16: 490-502.
- Brown, R.E. 1998. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 111: 1-9.
- Brown, R.L; Kazan, K; McGrath, K.C, Maclean, D.J; Manners, J.M. 2003. A role of the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132: 1020-1032.
- Campo, S; Carrascal, M; Coca, M; Abián, J; San Segundo, B; 2004. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* 4: 383-396.
- Casacuberta, J.M; Puigdomenech, P; San Segundo, B. 1991. A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Mol. Biol.* 16: 527-536.
- Castegnaro, M; Garren, L; Galendo, D; Gelderblom, W; Chelule, P; Dutton, M; Wild, C. 1998. Analytical method for the determination of sphinganine and sphingosine in serum as a potential biomarker for fumonisin exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 720: 15-24.
- Chalfant, C.E; Rathman, K; Pinkerman, R.L; Wood, R.E; Obeid, L.M; Ogretmen, B; Hannun, Y.A. 2002. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 277: 12587-12595.
- Chalfant, C.E; Spiegel, S. 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* 118: 4605-4612.
- Cheng, J; Park, T.S; Chio, L.C; Fisch, A.S; Ye, X.S. 2003. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* 23: 163-177.
- Cho, Y; Yoo, H; Min, K; Lee, E; Hong, S; Chung, Y; Lee, Y. 2002. Comparative study of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and  $\alpha$ -phthalaldehyde fluorogenic reagents for chromatographic detection of sphingoid base. *J. Chromatography A.* 977: 69-76.
- Chung, N; Jenkins, G; Hannun, Y.A; Heitman, J; Obeid, L.M. 2000. Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem.* 275 : 17229-17232.
- Colilla, F.J; Rocher, A; Méndez, E. 1990. Gamma purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* 270:191-194.
- Cortez-Rocha, M.O; Ramírez-Astudillo, W.R; Sánchez-Marinez, R.I; Rosas-Burgos, E.C; Wong-Corral, F.J; Borboa-Flores, J; Castillon-Campana, L.G; Tequida-Meneses, M. 2003. Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 70: 668-73.
- Coursol, S; Fan, L.M; Le Stunff, H; Spiegel, S; Gilroy, S; Assman, S. 2003. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature.* 423: 651-654.
- Crawford, N.M; Guo, F. 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10:195-200.
- de Jong, C.F; Laxalt, A.M; Bargmann, B.O; de Wit, P.J; Joosten, M.H., Munnik, T. 2004. Phosphatidic acid accumulation is an early response in the *Cf-4/Avr4* interaction. *Plant J.* 39: 1-12.
- de Torres, M; Fernández-Delmond, I; Nittyla, T; Sánchez, P; Grant, M. 2002. Differential expression of genes encoding *Arabidopsis* phospholipases after challenge with virulent or avirulent *Pseudomonas* isolates. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5: 808-816.
- Delon, C; Manifava, M; Wood, E; Thompson, D; Krugmann, S; Pyne, S; Ktistakis, N.T. 2004. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 279: 44763-44774.



- Delledonne, M; Xia, Y; Dixon, R.A; Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. 394: 585-588.
- Desjardins, A.E; Plattner, R.D; Nelson, P.E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1695-1697.
- Després, C; Chubak, C; Rochon, A; Clark, R; Bethune, T; Desveaux, D; Fobert, P.R. 2003. The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*. 15: 2181-2191.
- Dhondt, S; Geoffroy, P; Stelmach, B.A; Legrand, M; Heitz, T. 2000. Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.* 23: 431-440.
- Dickson, R.C; Wells, G.B; Schmidt, A; Lester, R.L. 1990. Isolation of mutant *Saccharomyces cerevisiae* strains that survive without sphingolipids. *Mol. Cell Biol.* 1: 2176-2181.
- Dickson, R.C; Nagiec, E.E; Skrzypek, M; Tillman, P; Wells, G.B; Lester, R. 1997. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J. Biol. Chem.* 272: 30196-30200.
- Dobrowsky, R.T; Hannun, Y.A. 1992. Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 267: 5048-5051.
- Dohelert, D.C; Knutson, C.A; Vesonder, R.F. 1994. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia*. 127: 117-121.
- Dong, X. 2001. Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 309-314.
- Dunn, T.M; Lynch, D.V; Michaelson, L.V; Napier, J.A. 2004. A post-genomic approach to understanding sphingolipids metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 93: 483-497.
- Durner, J, Shah J. y Klessig, F.D. 1997. Salicylic acid in disease resistance in plants. *TRENDS in Plant Sci.* 2: 266-274.
- Durner, J; Wendehenne, D; Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10328-10333.
- Durrant, W.E; Dong, X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185-209.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31: 105-124.
- Farrell, A.M; Uchida, Y; Nagiec, M.M; Harris, I.R; Dickson, R.C; Elias, P.M; Holleran, W.M. 1998. UVB irradiation up-regulates serine palmitoyltransferase in cultured human keratinocytes. *J. Lipid Res.* 39: 2031-2038.
- Feys, B.J; Parker, J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16: 449-455.
- Fishbein, J.D; Dobrowsky, R.T; Bielawska, A; Garrett, S; Hannun, Y.A.;1993. Ceramide-mediated growth inhibition and CAPP are conserved in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268: 9255-9261.
- Flaherty, J.E; Pirttila, A.M; Bluhm, B.H; Woloshuk, C.P. 2003. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5222-5227.
- Flaherty, J.E; Woloshuk, C.P. 2004. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2653-2659.
- Fliegmann, J; Mithöfer, A; Wanner, G; Ebel, J. 2004. An ancient enzyme domain hidden in the putative  $\beta$ -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J. Biol. Chem.* 279: 1132-1140.
- Futerman, A.H; Hannun, Y.A. 2004. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO J.* 5: 777-782.

- Futerman, A.H; Riezman, H. 2005. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 15: 312-318.
- Funato, K; Lombardi, R; Vallee, B; Riezman, H. 2003. Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278: 7325-7334.
- Gable, K; Slife, H; Bacikova, D; Monaghan, E; Dunn, T.M. 2000. Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 275: 7597-7603.
- Gelderblom, W.C; Kriek, N.P; Marasas, W.F; Thiel, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis.* 12: 1247-1251.
- Glazebrook, J; Chen, W; Estes, B; Chang, H.S; Nawrath, C; Métraux, J.P; Zhu, T; Katagiri, F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derives from global expression phenotyping. *Plant J.* 34: 217-228.
- Glenn, A.E; Hinton, D.M; Yates, I.E; Bacon, C.W. 2001. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2973-2981.
- Gomez del Pulgar, T; Velasco, G; Sanchez, C; Haro, A; Guzman, M. 2002. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* 363:183-8.
- González, H.H; Resnik, S.L; Pacin, A.M. 2002. Mycoflora of freshly harvested flint corn from northwestern provinces in Argentina. *Mycopathologia.* 155: 207-211.
- Gozzo, F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 4487-4503.
- Greaves-Fernández, N. 2005. Efecto de esfingolípidos en la expresión del gen de la glicoproteína rica en hidroxiprolina de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM 125 pp.
- Gutiérrez-Nájera, N; Muñoz-Clares, R.A; Palacios-Bahena, S; Ramirez, J; Sánchez-Nieto, S; Plasencia, J; Gavilanez-Ruiz, M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 221: 589-596.
- Hait, N.C; Fujita, K; Lester, R.L; Dickson, R.C. 2002. Lcb4 sphingoid base kinase localizes to the Golgi and late endosomes. *FEBS Lett.* 532: 97-102.
- Han, G; Gable, K; Yan, L; Natarajan, M; Krishnamurthy, J; Gupta, S.D; Borovitskaya, A; Harmon, J.M, Dunn, T.M. 2004. The topology of the Lcb1p subunit of yeast serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 279: 53707-53716.
- Hanada, K; Hara, T; Nishijima, M. 2000a. Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J. Biol. Chem.* 275: 8409-8415.
- Hanada, K; Hara, T; Nishijima, M. 2000b. D-serine inhibits serine palmitoyltransferase, the enzyme catalyzing the initial step of sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett.* 474: 63-65
- Hanada K. 2003. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1632: 16-30.
- Hanada, K; Kumagai, K; Yasuda, S; Miura, Y; Kawano, M; Fukasawa, M; Nishijima, M. 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426: 803-809.
- Hannun, Y.A. Loomis, C.R. Merrill, A.H; Bell, R. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets. *J. Biol. Chem.* 261: 12604-12609.
- Hannun, Y.A; Obeid, L.M. 2002. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277: 25847-25850.
- Harrison, L.R; Colvin, B.M; Greene, J.T; Newman, L.E; Cole, J.R. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 217-21.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44: 321-334.

- Herget, T; Esdar, C; Oehrlein, S; Heinrich, M; Schütze, S; Maelicke, A; van Echten-Deckert, G. 2000. Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 275: 30344-30354.
- Hillig, I; Leipelt, M; Ott, C; Zahringer, U; Warnecke, D; Heinz, E. 2003. Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* 553:365-369.
- Hoessli, D.C, Illangumaran, S; Soltermann, A; Robinson, P.J; Borisch, B; Ud-Din, N. 2001. Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. 17: 191-197.
- Huwiler, A; Kolter, T; Pfeilschifter, J; Sandhoff, K. 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1485: 63-69.
- Ichikawa, S; Hirabayashi, Y. 1998. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* 8: 198-202.
- Igarashi, N; Okada, T; Hayashi, S; Fujita, T; Jahangeer, S; Nakamura, S. 2003. Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 278: 46832-46839.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96: 23-28.
- Ishitsuka, R; Sato, S.B; Kobayashi, T. 2005. Imaging lipid rafts. *J. Biochem.* 137: 249-254.
- Ito, Y; Kaku, H; Shibuya, N. 1997. Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J.* 12: 347-356.
- Jefferson, A; Schulman, H.1988 Sphingosine inhibits calmodulin-dependent enzymes. *J Biol Chem.* 263:15241-15244.
- Katagiri, F. 2004. A global view of defense gene expression regulation a highly interconnected signaling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 506-511.
- Kawano, T; Sahashi, N; Takahashi, K; Uozumi, N; Muto, S. 1998. Salicylic acid induced extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco cell suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell. Physiol.* 39: 721-730.
- Kedera, C.J; Plattner, R.D; Desjardins, A.E. 1999. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B1 in maize in western Kenya. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 41-44.
- Kiesselbach T.A. 1999. The structure and reproduction of corn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. pp 8-25.
- Kihara, A; Sano, T; Iwaki, S; Igarashi, Y. 2003. Transmembrane topology of sphingoid long-chain base 1-phosphate phosphatase, Lcb3p. *Genes Cells.* 8: 525-535.
- Kirsch, C; Takamiya-Wik, M; Reinold, S; Hahlbrock, K; Somssich, I.E. 1997. Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial omega-3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2079 - 2084.
- Kumar, D; Klessig, D.F. 2000. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 347-351.
- Koga, J; Yamauchi, T; Shimura, M; Ogawa, N; Oshima, K; Umemura, K; Kikuchi, M; Ogasawara, N. 1998. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem.* 273: 31985-31991.
- Kohyama-Koganeya, A; Sasamura, T; Oshima, E; Suzuki, E; Nishihara, S; Ueda, R; Hirabayashi, Y. 2004. Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J. Biol. Chem.* 279: 35995-356002.
- Laxalt, A.M; ter Riet, B; Verdonk, J; Parigi, L; Tameling, W.I; Vossen, J; Haring, M; Musgrave, A; Munnik, T. 2001. Characterization of five tomato phospholipase D cDNAs: rapid and specific expression of LePLDbeta1 on elicitation with xylanase. *Plant J.* 26: 237-247.
- Lay, F.T; Anderson, M.A. 2005. Defensins. Components of the innate immune system in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 85-101.

- Lecourieux, D; Mazars, C; Pauly, N; Ranjeva, R; Pugin, A. 2002. Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell*. 14: 2627-2641.
- Lee, S; Suh, S; Kim, S; Crain, R, Kwak, J.M; Nam, H.G; Lee, Y. 1997. Systemic elevation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J*. 12: 547-556.
- Lee, J; Klessig D.F; Nürnberger T. 2001. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*. 13: 1079-1093.
- Liang, H; Yao, N; Song J.T; Luo, S; Lu, H; Greenberg, J.T. 2003. Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev*. 17: 2636-2641.
- Lieberherr, D; Thao, N.P; Nakashima, A; Umemura, K; Kawasaki, T; Shimamoto, K. 2005. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol*. 138: 1644-1652.
- Lynch, D.V; Fairfield, S.R. 1993. Sphingolipid long-chain base synthesis in plants: characterization of serine palmitoyltransferase activity in squash fruit microsomes. *Plant Physiol*. 103: 1421-1429.
- Mandon, E.C; Heces, I; Rother, J; van Echten, G; Sandhoff, K. 1992. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J. Biol.Chem*. 5: 11144-11148.
- Mao, C; Wadleigh, M; Jenkins, G.M; Hannun, Y.A; Obeid, L.M. 1997. Identification and characterization of *Sacharomyces cerevisiae* dihydrosphingosine-1-phosphate phosphatase. *J. Biol. Chem* 272: 28690-28694.
- Mao, C; Xu, R; Bielawska, A; Szulc, Z.M; Obeid, L.M. 2000. Cloning and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* alkaline ceramidase with specificity for dihydroceramide. *J. Biol. Chem*. 276: 31369-31378.
- Marasas, W.F.O; Kellermarn, T.S; Gelderblom, J.A.W; Thiel, P.G; Van Der Lungt, J.J. 1988. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1, isolated from *Fusarium moniliforme*. *J. Vet*. 55: 197-203.
- Mathias, S; Dressler, K.A; Kolesnick, R.N. 1991. Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 10009-10013.
- Mayrose, M; Bronshtien, A; Sessa, G. 2004. LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *J. Biol.Chem*. 279: 14819-14827.
- McDonald, O.B; Hannun, Y.A; Reynolds, C.H; Sahyoun, N. 1991. Activation of casein kinase II by sphingosine. *J Biol Chem*. 266: 21773-21776.
- Megidish, T; White, T; Takio, K; Titani, K; Igarashi, Y; Hakomori, S. 1995. The signal modulator protein 14-3-3 is a target of sphingosine- or N,N-dimethylsphingosine-dependent kinase in 3T3(A31) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 216: 739-747.
- Megidish, T; Cooper, J; Zhang, L; Fu H, Hakomori, S. 1998. A novel sphingosine-dependent protein kinase (SDK1) specifically phosphorylates certain isoforms of 14-3-3 protein. *J. Biol. Chem*. 273: 21834-21845.
- Megidish, T; Takio, K; Titani, K; Iwabuchi, K; Hamaguchi, A; Igarashi, Y; Hakomori, S. 1999. Endogenous substrates of sphingosine-dependent kinases (SDKs) are chaperone proteins: heat shock proteins, glucose-regulated proteins, protein disulfide isomerase, and calreticulin. *Biochemistry*. 38: 3369-3378.
- Meijer, H.J; Munnik, T. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. 54: 265-306.
- Meier, K.D; Deloche, O; Kajiwara, K. Funato, K; Riezman, H. 2006. Sphingoid base is required for translation initiation during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 17: 1164- 1175.

- Memon, R.A; Holleran, W.M; Moser, A.H; Seki, T; Uchida, Y; Fuller, J; Shigenaga, J.K; Grunfeld, C; Feingold, K.R. 1998. Endotoxin and cytokines increase hepatic sphingolipid biosynthesis and produce lipoproteins enriched in ceramides and sphingomyelin. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1257-1265.
- Méndez, E; Moreno, A; Colilla, F; Pelaez, F; Limas, C.G; Méndez, R; Soriano, F; Salinas, M; de Haro, C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194: 533-539.
- Mittler, R; Vanderauwera, S; Gollery, M; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- Mongrand, S; Morel, J; Laroche, J; Claverol, S; Carde, J.P; Hartmann, M.A; Bonneau, M; Simon-Plas, F; Lessire, R; Bessoule, J.J. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 279: 36277-36286.
- Morkunas, I; Bednarski, W; Kozłowska, M. 2004. Response of embryo axes of germinating seeds of yellow lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 493-499.
- Mueller, M.J; Brodschelm, W; Spannagl, E; Zenk, M.H. 1993. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15: 7490-7494.
- Munnik, T; Meijer, H.J; Ter Riet, b; Hirt, H; Frank, W; Bartels, D; Musgrave, A. 2000. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22: 147-154.
- Munnik, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6: 227-233.
- Murillo, I; Cavallarin, L; San Segundo, B. 1999. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology.* 89: 737-747.
- Nagiec, M.M; Baltisberger, J.A; Wells, G.B; Lester, R.L; Dickson, R.C. 1994. The *LCB2* gene of *Saccharomyces* and the related *LCB1* gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 7899-7902.
- Nagiec, M.M; Skrzypek, M; Nagiec, E.E; Lester, R.L; Dickson, R.C.. 1998. The *LCB4* (YOR171c) and *LCB5* (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J. Biol. Chem.* 273: 19437-19442.
- Ng, C.K; Carr, K; McAinsh, M.R; Powell, B; Hetherington, A.M. 2001. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599
- Nelson, P.E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia.* 117: 29-36.
- Nelson, D; Cox, M. Lehninger principios de Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona, 2001, pp. 437-481.
- Nennstiel, D; Sceel, D; Nürnberger, T. 1998. Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett.* 431: 405-410.
- Nickels, J.T; Broach, J.R. 1996. A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10: 382-394.
- Niderman, T; Genete, I; Bruyere, T; Gees, R; Stintzi, A; Legrand, M; Fritig, B; Mösinger, E. 1995. Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiol.* 198: 17-27.
- Nürnberger, T; Brunner, F; Kemmerling, B; y Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198: 249-266.
- Obeid, L.M; Okamoto, Y; Mao, C. 2002. Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585: 163-171.

- Oren, L; Ezrati, S; Cohen, D; Sharon, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using green fluorescent protein-expressing transgenic isoalte. Appl. Environ. Microbiol. 69:1695 - 1701.
- Osborn R, de Samblanx G, Thevissen K, Goderis I, Torrekens S, Van Leuven F, Attenboroug s, Rees S, Broekaert W. 1995. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. FEBS Lett. 368: 257-262.
- Okushima, Y; Koizumi, N; Kusano, T; Sano, H. 2000. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of patogénesis-related proteins. Plant Mol. Biol. 42: 479-488.
- Petersen, M; Brodersen, P; Naested, H; Andreasson, E; Lindhart, U; Johansen, B; Nielsen, H; Lacy, M; Austin, M; Parker, J; Sharma, S; Klessig, D; Martienssen, R; Mattson, O; Jensen, A; Mundy, J. 2000. Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. Cell. 103: 1111-1120.
- Perry, D.K; Carton, J; Shah, A.K; Meredith, F; Uhlinger, D.J; Hannun, Y. 2000. Serine palmitoyltransferase regulates *de novo* ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. 275: 9078-9084.
- Pettus, B.J; Chalfant, C.E; Hannun, Y.A. 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. Biochim. Biophys. Acta 1585: 114-125.
- Proctor, R.H; Desjardins, A.E; Plattner, R.D; Hohn, T.M. 1999. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. Fungal Genet. Biol. 27: 100 - 112.
- 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.
- Pyne, S; Chapman, J; Steele, L; Pyne, N.J. 1996. Sphingomyelin derived lipids differentially regulate the extracellular signal regulated kinase 2 (ERK-2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signal cascades in airway smooth muscle. Eur. J. Biochem. 237: 819-826.
- Reyes P. El maíz y su cultivo. AGT Editor S.A. México. 1990. pp 103-156, 396-415.
- Rivas SanVicente, M. 2001. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoides en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisin B1. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM, 99p.
- Rivas SanVicente, M. 2004 Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM, 99p.
- Rochester, D.E; Winer, J.A; Shah, D.M. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. EMBO J. 5: 451-458
- Rodríguez-Mejía, P. 2006. Relación entre la actividad de la NADPH oxidasa, compuestos esfingoides y respuesta a patógenos en células vegetales. Tesis de licenciatura. Fac. de Química, UNAM 88 pp.
- Ryals, J; Neuenschwander, U.H; Willits, M.G; Molina, A; Steiner, H.Y; Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell. 8: 1809-1819.
- Ryu, S.B. 2004. Phospholipid-derived signaling mediated by phospholipase A in plants. Trends Plant Science. 9: 229-235.
- Saba, J.D; Nara, F; Bielawska, A; Garrett, S; Hannun, Y.A. 1997. The *BST1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. J. Biol. Chem. 272: 26087-26090.
- Sánchez-Rangel, D. 2003. Aislamiento y detección de *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz (*Zea mays*). Tesis de Licenciatura. Fac. de Química. UNAM, 97 pp.
- Sánchez-Rangel, D; SanJuan-Badillo, A; Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. J. Agric. Food Chem. 2005. 53: 8565-8571.

- SanJuan, B.A. 2001. Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. 110p.
- Scheer, J.M; Ryan, C. 2002. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon esculentum* is a member of the LRR receptor kinase family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 9585-9590.
- 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.
- Shah, J. 2005. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 8.1-8.32.
- Shim, W.B; Woloshuk, C.P. 2001. Regulation of fumonisin B(1) biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1607-1612.
- Shim, W.B; Woloshuk, C.P. 1999. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiol. Lett. 177: 109-116.
- Shimabukuro, M; Higa, M; Zhou, Y.T; Wang, M.Y; Newgard, C.B; Unger, R.H. 1998. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. J. Biol. Chem. 273: 32487-32490.
- Somssich, I.E; Hahlbrock, K. 1998. Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. Trends Plant Sci. 3: 86-90.
- Sperling, P; Heinz, E. 2003. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. Biochim. Biophys. Acta. 1610: 1-15.
- Spoel, S.H; Koorneef, A; Claessens, S.M; Korzelius, J.P; Van Pelt, J.A; Mueller, M.J; Buchala, A.J; Metraux, J.P; Brown, R; Kazan, K; Van Loon, L.C; Dong, X; Pieterse, C.M. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell. 15: 760-770.
- Tamura, K; Mitsuhashi, N; Hara-Nishimura, I; Imai, H. 2001. Characterization of an Arabidopsis cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. Plant Cell. Physiol. 42: 1274-1281.
- Testerink, C; Munnik, T. 2005. Phosphatidic acid a multifunctional stress signaling lipid in plants. Trends Plant Sci. 10: 368-375.
- Thevissen, K; Osborn, R.W; Acland, D.P; Broekaert, W.F. 1997. Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. J. Biol. Chem. 272: 32176-32181.
- Torres, M.R; Ramos, A.J; Soler, J; Sanchis, V; Marin, S. 2003. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. Scanning electron microscopy. Int J Food Microbiol. 81:185-193.
- Van der Luit A, Piatti T, Van Doorn A, Musgrave A, Felix G, Boller T, y Munnik T. 2000. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. Plant Physiol. 123: 1507-1515.
- 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.
- Verheij, M; Bose, R; Lin X.H; Yao, B; Jarvis, W.D; Grant, S; Birrer, M.J; Szabo, E; Zon, L.I; Kyriakis, J.M; Haimovitz-Friedman, A; Fuks, Z; Kolesnick, R.N. 1996. Requirement for ceramide initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. Nature 380: 75-79.
- Vollenweider, S; Weber, H; Stolz, S; Chételat, A; Farmer, E.E. 2000. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. Plant J. 24: 467-76.
- 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. 266: 14486-14490.

- Wang, X. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr. Opin. Plant Cell.* 5: 408-414.
- Wang, X. 2004. Lipid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 329-336.
- Warfield, C.Y; Gilchrist, D.G.1999. Influence of kernel age on fumonisin B1 production in maize by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbio.* 65: 2853-2856.
- Weber, H. 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 217-224.
- Weichert, H; Stenzel, I; Berndt, E; Wasternack, C; Feussner, I. 1999. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves-preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Lett.* 464: 133-137.
- Wendehenne, D; Durner, J; Klessig, D. 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7: 449-455.
- Westwick, J.K. Bielawska, A.E. Dbaibo, G; Hannun, Y.A. Brenner D. 1995. Ceramide activates the stress activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270: 22689-22692.
- Windels, C.E; Bunes, P.M; Kommedahl, T.J. 1988. Five - years preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology.* 78: 107-109.
- Yaeno, T; Matsuda, O; Iba, K. 2004. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* 40: 931-941.
- Yamada, K; Sakane, F; Imai, S; Takemura, H. 1993. Sphingosine activates cellular diacylglycerol kinase in intact Jurkat cells, a human T-cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* 1169:217-224.
- Yasuda, S; Nishijima, M; Hanada, K. 2003. Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 278: 4176-4183.
- Young SA, Wang X, Leach J. 1996. Change in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interaction with *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, *Plant Cell.* 8: 1079-1090.
- Zhang, S; Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid activates a 48 kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809-824.
- Zhao, J; Davis, L; Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23: 283-333.



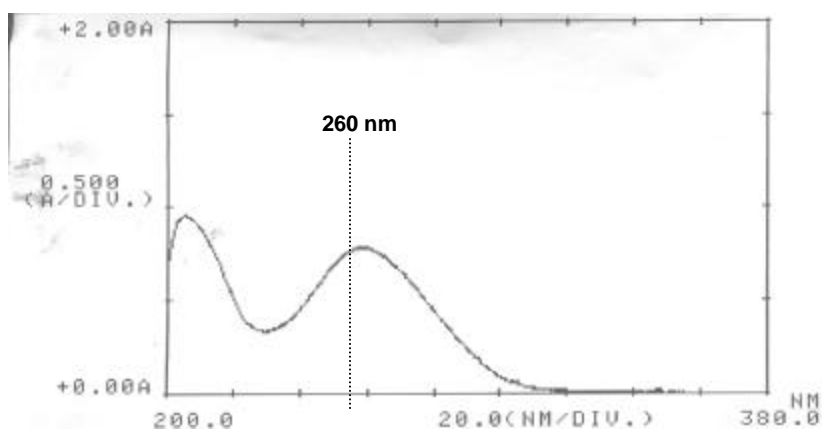


## IX. APÉNDICE

### CONSIDERACIONES IMPORTANTES PARA TRABAJAR CON RNA:

- ☞ Trabajar todo el tiempo con guantes y en un área limpia y despejada.
- ☞ Todo el material incluyendo morteros, espátulas, tubos eppendorf y cristalería se deben esterilizar por lo menos 1 h en autoclave a 120°C.
- ☞ Preparar H<sub>2</sub>O con dietilpirocarbonato (Sigma). Se agrega 1 mL de DEPC por cada litro de H<sub>2</sub>O y se esteriliza por 1 h en autoclave a 120°C.
- ☞ Todas las soluciones que se utilizan deben estar preparadas con H<sub>2</sub>O-DEPC.

Se obtuvieron los espectros de absorción de las muestras de RNA obtenidas a partir del protocolo modificado de Rochester *et al.*; 1986. Los espectros de absorción se realizaron en el intervalo de 200 a 380 nm y como se observa en la Figura 30, a 260 nm se obtiene la señal que corresponde al RNA.



**Figura 30.** Espectro de absorción de una muestra de RNA obtenida a partir del protocolo modificado de Rochester *et al.* 1986.

### CURVAS PATRÓN DE ESFINGANINA Y FITOESFINGOSINA.

Para la cuantificación de bases esfingoideas se construyeron curvas patrón de 1 a 6 pmoles de los estándares fitoesfingosina y esfinganina y se tomaron los datos de altura

que registra el integrador pues con esta respuesta existe una mayor linealidad en los resultados

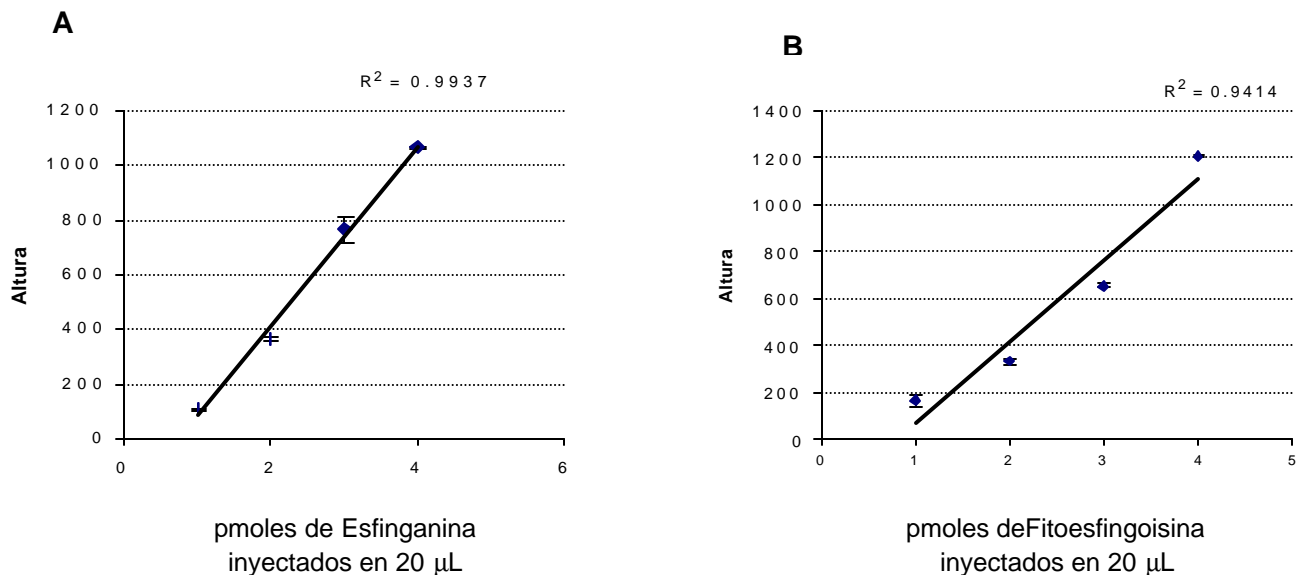


Figura 31. Curvas patrón construidas con los estándares. A. Esfinganina y B..Fitoesfingosina.

❖ SOLUCION TWEEN 20 (0.5%)

A 100 mL de agua estéril, agregar 0.5 mL de Tween 20