

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

**ACTIVIDAD METABÓLICA DE LA
VÍA LOX EN CARIOPSIS DE
ZEA MAYS L. SSP. MAYS,
EN RESPUESTA A COVs EMITIDOS POR
FUSARIUM VERTICILLIOIDES (SACC.)
NIRENBERG**

Tesinista: **Jacquat, Andrés Gustavo**

Firma:

Directora: **Prof. Dra. Zunino, María Paula**

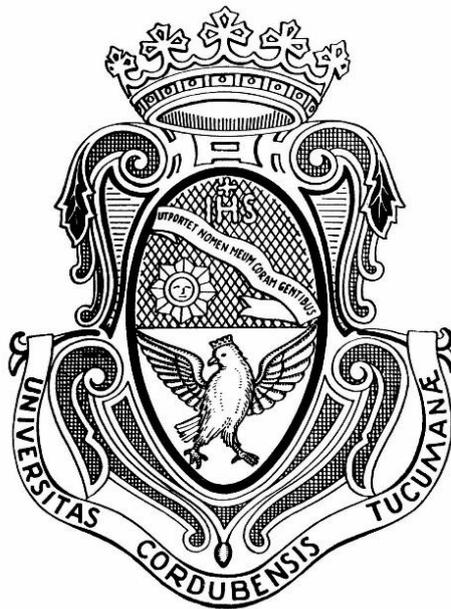
Firma:

Codirector: **Dr. Dambolena, José Sebastián**

Firma:

Lugar de trabajo: **Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Universidad Nacional de Córdoba (UNC) e Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Área: Aromas y Pigmentos - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC.**

**ACTIVIDAD METABÓLICA DE LA VÍA LOX EN CARIOPSIS
DE *ZEA MAYS* L. SSP. *MAYS*, EN RESPUESTA A COVs
EMITIDOS POR *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* (SACC.)
NIRENBERG**



Tribunal Examinador

Nombre y Apellido:

Firma:

Nombre y Apellido:

Firma:

Nombre y Apellido:

Firma:

Calificación:

Fecha:

*Este trabajo es dedicado a
mi familia y en especial a mis padres, que también es el fruto de su esfuerzo.*

Resumen

Argentina es tanto exportador como consumidor de granos de maíz. Una práctica muy extendida entre los productores es el almacenamiento en silo-bolsas. Pero esta etapa en la cadena del maíz está ligada a problemas de pérdida de la calidad del mismo debido al desarrollo de mohos, que además de pudrir al material, lo contaminan con micotoxinas, moléculas muy tóxicas para personas y animales. Un ej. muy común en nuestro país es la contaminación, a campo, por el fitopatógeno micotoxigénico *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. En el mundo, hay creciente interés por las interacciones inter-específicas, vía Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs), tales como las que se dan entre patógenos y huéspedes. Así, el interés por elicitores naturales volátiles del metabolismo de las Lipoxigenasas (LOXs; relacionado a oxilipinas defensivas) en cariopsis de maíz es lo que llevó a desarrollar el presente trabajo. En este estudio se evaluó la implicancia que tienen los COVs en la modulación mutua entre el metabolismo del maíz y el crecimiento del moho. Los resultados fueron que los COVs fúngicos (COVFs) tienen efecto estimulador de las enzimas LOXs en granos de maíz (resultado coherente con su perfil polipeptídico: aumento significativo en la intensidad de una probable banda de LOXs). A su vez, los maíces que previamente han sido expuestos a COVFs, emiten volátiles propios con posible efecto inhibitorio sobre el crecimiento del mismo hongo micotoxigénico. Éstos resultados son concordantes con datos de una amplia bibliografía consultada, y prometen una valiosa herramienta de conocimiento para futuros desarrollos de métodos alternativos de control de plagas, valiéndose de sistemas naturales.

Abstract

Argentina is both an exporter as a consumer of corn grains. A widespread practice among producers is storage in silo-bags. But this stage in the corn chain is linked to quality loss problems due to the development of molds which, in addition to rotting the material, contaminates it with mycotoxins, very toxic molecules for people and animals. A very common example in our country is contamination, in the field, by the phytopathogen mycotoxigenic *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Worldwide, there is an increasing interest in the inter-specific interactions, via Volatile organic compounds (VOCs), between organisms, such as those occurring between pathogens and hosts. Thus, interest in volatile natural elicitors of the Lipoxygenases (LOXs; related to defensive oxilipins) metabolism in maize cariopsis led to the development of the present study. In this work, VOCs implication in corn metabolism and mold growth mutual modulation was evaluated. The results indicates that fungal VOCs (FVOCs) enhances LOXs activity in exposed corn grains (Coherent result with their polypeptide profile; significant intensity increase in a probably LOXs band.) At the same time, the corns previously exposed to FVOCs, emits their own volatiles with a possible inhibitory effect in the same mycotoxigenic fungal growth. These results are consistent with data from a large consulted bibliography and promise a valuable knowledge tool for future developments of alternative pest control methods, using natural systems.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Dra. María Paula Zunino y codirector Dr. José Sebastián Dambolena. Al director de la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Dr. Julio A. Zygodlo. A la Dr. Alicia Lamarque por enseñarme la técnica SDS-PAGE. A todo el grupo de trabajo y compañeros de laboratorio. Y las instituciones financiadoras Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt-UNC) y Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FonCyT).

Al fin del presente escrito daré agradecimientos más personalmente.

ÍNDICE

PARTE 1: Breve Revisión Sobre el Maíz y el Fitopatógeno *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg **15**

<i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mays</i>	15
Anatomía y composición química del cariopsis del maíz en la madurez.	17
Producción, almacenamiento e industrialización del grano de maíz, en Argentina.	21
Deterioro de la calidad del grano por mohos, durante su almacenamiento.	24
Fitopatógeno <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg	26
<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	28
Fitopatosistema: Hongo – Maíz – Ambiente.	30
Fumonicinas: toxicidad, incidencia y niveles máximos permitidos.	33
Oxilipinas vegetales	37
Vía Lipoxigenasas (LOXs).	37
Estructura molecular y catálisis de las LOX.	37
Ramificaciones de la vía LOX.	39
LOX en <i>Z. mays</i> L. ssp. <i>mays</i> .	43
Compuestos orgánicos volátiles	45

PARTE 2: Actividad Metabólica de la Vía Lipoxigenasa en Cariopsis de *Zea mays* L. ssp. *mays*, en Respuesta a Compuestos Orgánicos Volátiles Emitidos por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg **49**

Introducción	49
Hipótesis	50
Objetivos	50
Objetivo general.	50
Objetivos específicos.	50
Materiales y métodos	51
i. Obtención de organismos estudiados.	51
ii. Incubación de <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	51
iii. Acondicionamiento de granos de maíz por COVs emitidos por <i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	52
iv. Purificación parcial de las LOXs de cariopsis de <i>Zea mays</i> L. ssp. <i>mays</i> .	53
v. Cuantificación de proteínas solubles.	54
vi. Medición de la actividad lipoxigenasa.	54
vii. SDS-PAGE.	57
viii. Suspensión de conidias de <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	59
ix. Ensayo de actividad antifúngica	60

x. Análisis estadísticos.	60
Resultados	61
Objetivo específico I: Evaluación de la actividad lipoxigenasa de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por <i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	61
Objetivo específico II: Evaluación del perfil polipeptídico de albúminas y globulinas de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por <i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	63
Objetivo específico III: Evaluación del efecto de los COVs emitidos por cariopsis de maíz acondicionados sobre el crecimiento vegetativo de <i>F. verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg.	65
Discusión	66
Conclusión	68
Perspectivas	69
ANEXO: FIGURAS	71
ANEXO: TABLAS	79
LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	83

PARTE 1: Breve Revisión Sobre el Maíz y el Fitopatógeno *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

Zea mays L. ssp. *mays*

El maíz (*Zea mays* L. ssp. *mays*) es una herbáceas monocotiledóneas perteneciente a la Familia botánica Poaceae (Orden Poales; Chase & Reveal, 2009), grupo al cual pertenecen también otras plantas de gran importancia alimentaria – de manera directa o indirecta – para el hombre, como lo son arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) etc. (Zhang, 2000).

La descripción de esta especie ineludiblemente cae en la de los caracteres morfológicos y fisiológicos / metabólicos comunes a todas las poaceas, pero con ciertas particularidades, tanto del desarrollo vegetativo como reproductivo (figura 1.1 y 1.2), que hacen del maíz una entidad irrepetible.

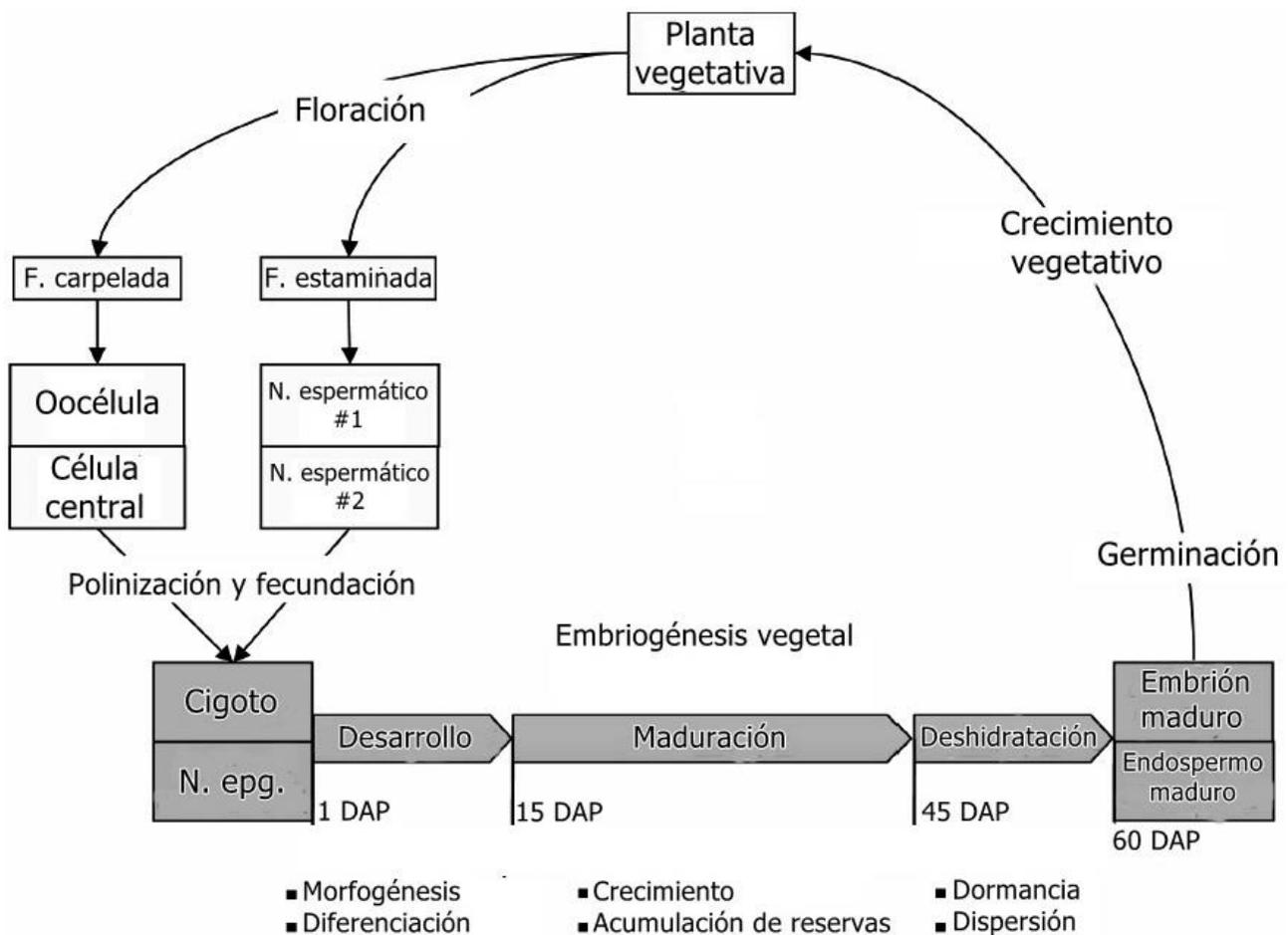


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Z. mays* L. ssp. *mays*.

El esquema representa los eventos más destacados del ciclo biológico de *Z. mays* L. ssp. *mays*: F.: flor; N.: núcleo; N. epg.: núcleo endospermogénico; DAP: días post-polinización. Adaptado de Vernoud, V. y cols. (2005).

Tales atributos se deben no solo a procesos evolutivos naturales, sino también a una fuerte selección direccional propiciada por el hombre (tanto consciente como inconscientemente), iniciada probablemente, cuanto mucho, hace 12.000 años en Centro y Sur de México, a partir de una población silvestre ancestral: el teosinte *Z. mays* L. ssp. *parviglumis* Iltis & Doebley (Buckler & Stevens, 2006). Fehacientemente esta especie ya formaba parte de la dieta humana hace alrededor de 8.700 años, en el mismo lugar de origen (Piperno *et al.*, 2009) y hace 5.300 años sus caracteres morfológicos y genéticos ya se presentaban a medio camino de convertirse en lo que es hoy uno de los cereales más cultivado y productivos (Ramos-Madrugal *et al.*, 2016), y fuente de aprox. el 83% del almidón consumido mundialmente (Tovar-Benitez, 2008). Dicha selección artificial ha generado una enorme cantidad de variedades y razas de maíces que se diferencian principalmente en caracteres como el número, longitud y la anchura de las hojas, longitud del tallo, el número y lugares en que aparecen las mazorcas, el número de semillas por mazorca, tamaño del grano, proporción de compuestos químicos del grano, la velocidad de maduración y duración del llenado de los granos etc. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 1993; Buckler & Stevens, 2006).

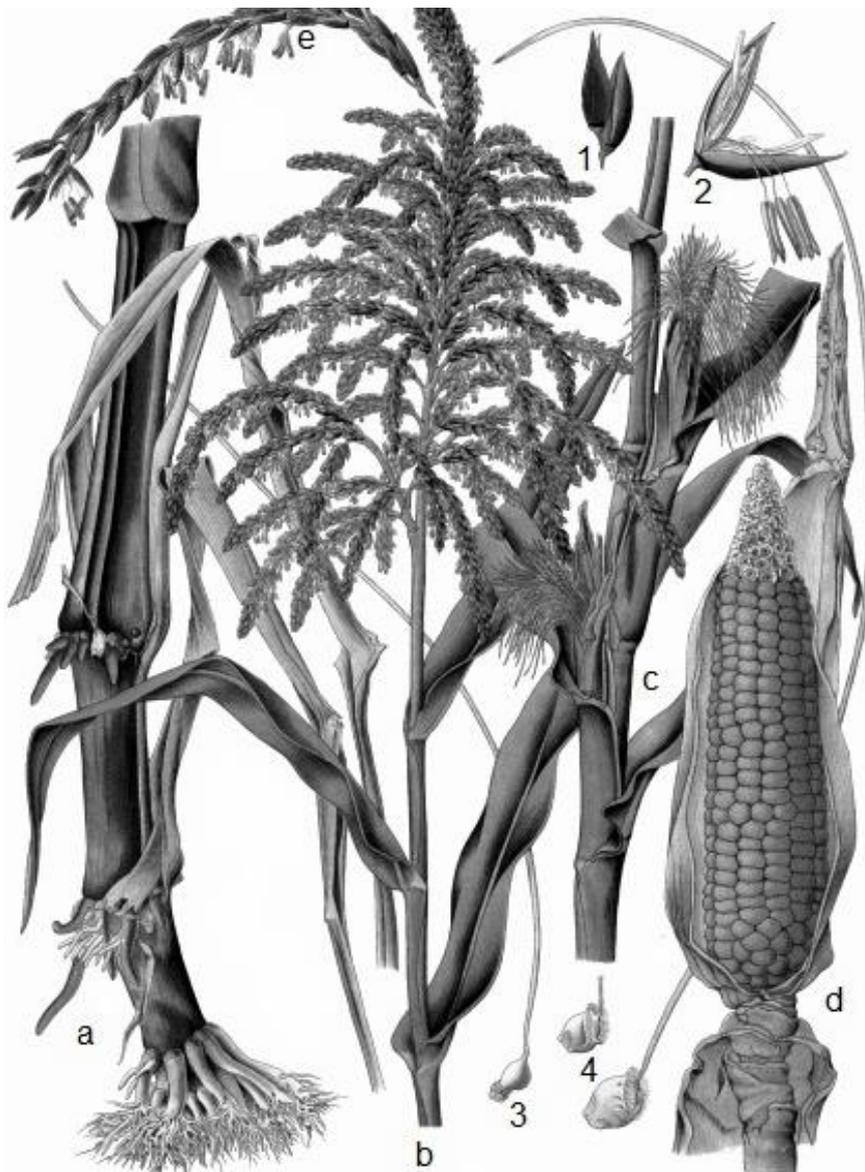


Figura 1.2. Morfología general de *Z. mays* L. ssp. *mays*.

a) Parte inferior de la planta (tallo inferior, corona y raíces adventicias); b) inflorescencia masculina; c) parte media del vástago con inflorescencia femenina; Observar la filotaxis en los esquemas b y c; d) inflorescencia femenina, mazorca o choclo; e) una ramificación de la inflorescencia masculina con todas las espiguillas; 1) dos espiguillas; 2) una espiguilla con antecio masculino abierto (estambres expuestos); 3 y 4) flores carpeladas con distintos grados de desarrollo, se aprecian largos estigmas. Adaptado de www.en.wikipedia.org.

La unidad de dispersión y germinación del maíz es el cariopse o cariopsis, fruto común a todas las poáceas. Éste es caracterizado por poseer un pericarpio seco e indehisciente, fusionado íntimamente con el espisperma, formando ambos una única estructura: cascarilla o salvado. Se caracteriza también por ser derivado de ovario unicarpelar, no soldado a un hipanto, y uniseminado (FAO, 1993; UNC, 2012). En el vulgo se los conoce con el nombre de grano, grano de cereal, semilla de cereal o simplemente cereal (FAO, 1993).

Anatomía y composición química del cariopsis del maíz en la madurez.

Anatómicamente, el fruto maduro del maíz se compone de tres partes principales (figura 1.3): Pericarpio, Endospermo y Embrión.

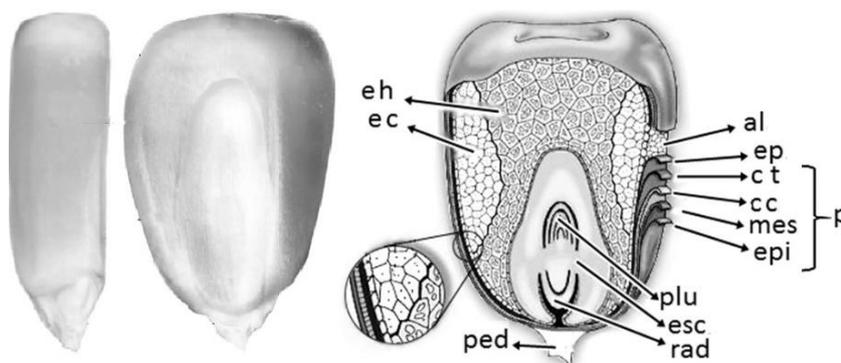


Figura 1.3. Anatomía del cariopsis de *Z. mays* L. ssp. *mays*.
Izquierda: Fotografía de perfil y de frente de un cariopse. Adaptado de Graham y cols. (2013). Derecha: Esquema de un corte: e.h.: endospermo harinoso, e.c.: endospermo coriáceo, al.: capa de células de aleuronas, ep.: espisperma, c.t.: células tubulares, c.c.: células cruzadas, mes.: mesocarpo, epi.: epidermis, p.: pericarpio, plu.: plúmula, esc.: escutelo, rad.: radícula, ped.: pedicelo. Adaptado de www.britannica.com.

El pericarpio o pared del fruto, como se dijo anteriormente, está en la madurez fusionado al espisperma (pared de la semilla o testa), tejidos derivados ontogénicamente y respectivamente de la pared del ovario y de óvulo de la flor femenina del maíz. Ambos tejidos al alcanzar la madurez sufren muerte celular programada (apoptosis) de sus células y se convierten en una estructura deshidratada, delgada, dura y resistente que cumplen la función principal de proteger a las demás estructuras internas del grano, principalmente al embrión, frente daños mecánicos, a herbívoros granívoros y a infecciones microbianas (FAO, 1993; Miquel *et al.*, 2011). Recubriendo su superficie externa se halla la cutícula vegetal, una capa no-celular de naturaleza hidrofóbica, compuesta por cutina, ceras y suberinas (Taiz & Zeiger, 2002, p. 284; Yeats & Rose, 2013).

El endospermo *sensu lato* es el órgano seminal más voluminoso y en él se puede distinguir varios tejidos internos diferenciados citológica, topológica y funcionalmente, ya sea durante la ontogenia o en la madurez fisiológica (MF). Entre ellos los más relevantes en la MF son la Capa de Células de la Aleurona (CA) y Endospermo Amiláceo (EA; FAO, 1993; Miquel *et al.*, 2011).

El primero, CA, posee un rol principal en la movilización de nutrientes durante la germinación mediante la secreción de proteasas y amilasas que hidrolizarán, respectivamente a, proteínas y almidón, almacenados tanto en sus células como en las del EA. Este tejido que tapiza al EA y de una célula de espesor, almacena primordialmente proteínas en gránulos de aleurona y lípidos en oleosomas (figura 1.4). La activación de su metabolismo después del estado de quiescencia de la

semilla está determinado por el estímulo generado por la fitohormona ácido giberélico secretada por el embrión cuando detecta las condiciones ambientales de humedad y temperatura adecuadas para la germinación (Ritchie *et al.*, 2000; Becraft & Yi, 2011; UNC, 2012). Por otro lado, el EA contiene prominentes gránulos de almidón (y también gránulos de aleuronas), cuya función principal es la de almacenamiento de carbohidratos y proteínas para proveer al embrión de C y energía durante la primera etapa de la germinación. En éste, de acuerdo a las características citológicas, se distinguen claramente una región vítrea (o coriácea) periférica y una región harinosa color blanco-opaco central (FAO, 1993; Becraft & Asuncion-Crabb, 2000; Holding, 2014).

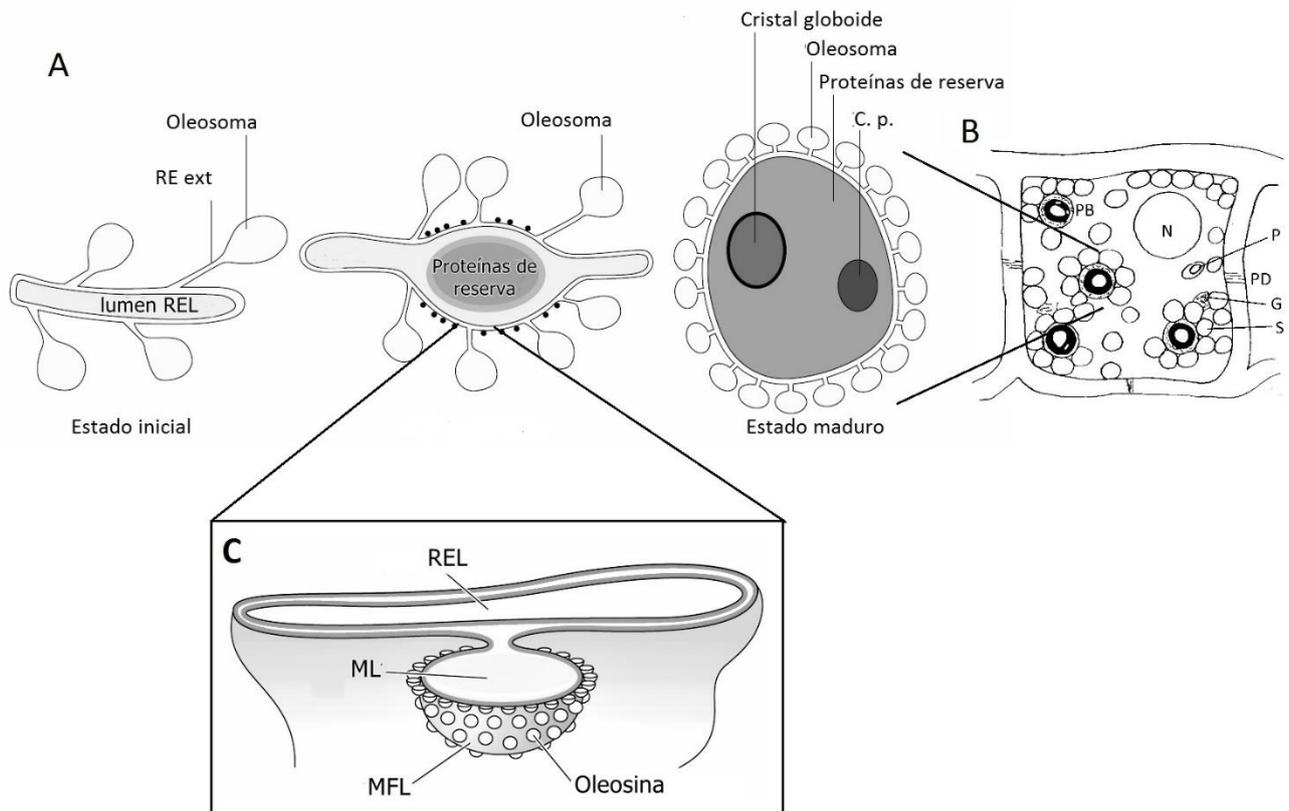


Figura 1.4. Desarrollo de oleosomas y aleuronas.

A) Modelo que muestra tres estados del desarrollo de una vacuola de almacenamiento de proteínas (aleurona) y oleosomas, en células de la aleurona de cebada (*Hordeum vulgare* L.), a partir del retículo endoplasmático liso (REL). REExt: membrana externa del RE; C. p.: cristaloideos de proteínas. Adaptado de Bethke, P. C., y cols. (1998). B) Esquema de una célula de la capa de aleurona de cariopsis de *Z. mays* L. ssp. *mays* a los 40 días post-polinización. PB: cuerpo proteico; P: plastidio; PD: plasmodesmo; G: aparato de Golgi; S: oleosoma. Adaptado de Kyle, D. J. y Styles, E. D. (1977). C) esquema en perspectiva tridimensional de la estructura de un oleosoma maduro: REL: retículo endoplasmático liso; ML: matriz lipídica; MFL: monocapa fosfolipídica. Adaptado de Taiz, L. y Zeiger, E. (2002, p. 19).

El embrión es, junto a la CA, la única estructura viva del cariopsis maduro. Posee la morfología básica de una planta adulta aunque con un tamaño y una complejidad relativamente menor. El eje embrionario está formado por el meristemo apical caulinar (tejido de células no diferenciadas que originarán el vástago de la planta; UNC, 2012), el cual está protegido por una serie de primordios foliares, denominado plúmula: un cono de aspecto plumoso. La plúmula, a su vez, está rodeada por otro primordio foliar modificado en forma de vaina cerrada o capuchón, el coleóptilo. Un órgano embrionario muy importante es el escutelo, estructura de almacenamiento de lípidos (oleosomas) y

secretora-haustorial. Durante la germinación, la epidermis secretora abaxial del escutelo segrega proteasas y amilasas para degradar las sustancias de reservas contenidas en el EA para así, transportarlas hacia la plántula en crecimiento. En el extremo opuesto al meristemo apical caulinar, se halla el meristemo apical radical, protegido por una caliptra y a su vez por una cofia, la coleorriza (Bommert & Werr, 2001; Taiz & Zeiger, 2002, pp. 340-345; Miquel *et al.*, 2011; Leubner-Metzger, 2016; Raisman & Gonzalez, 2016).

Por otra parte, al fruto del maíz se lo puede desglosar en base a sus constituyentes químicos más importantes (**tabla 1.1**): Almidón, Proteínas, Lípidos, Fenoles, Minerales y Vitaminas.

- Almidón: Homopolímero ramificado de D-glucopiranosas, estructurado en forma de gránulos que constituyen entre el 60 y 75% del peso seco del grano (FAO, 1993; Sanjeev *et al.*, 2014) y a su vez, químicamente diferenciado en dos fracciones, minoritariamente amilosa y mayoritariamente amilopectina (FAO, 1993; Hart *et al.*, 2007, p. 478).
- Proteínas: Las de reservas se almacenan en vacuolas que reciben el nombre de gránulos de aleurona (**figura 1.4**; Bethke *et al.*, 1998; Shewry & Halford, 2002) y son importantes desde el punto de vista de la nutrición humana y animal, dado que constituyen aproximadamente entre un 8 y 15% del peso seco del grano (FAO, 1993; Sanjeev *et al.*, 2014). Éstas son más abundantes en el tejido endospermático, pero están más concentradas en el embrión (FAO, 1993). La fracción proteica más importante corresponde a las prolaminas (denominadas zeinas; FAO, 1993; Shewry & Halford, 2002).
- Lípidos: Los de reservas se hallan en forma de lípidos neutros principalmente esterificados en triacilgliceroles (TAG). Éstos se hallan en estructuras sub-celulares especializadas llamadas cuerpos lipídicos, esferosomas, liposomas u oleosomas (**figura 1.4**). Estas estructuras están formadas por una matriz lipídica de TAG rodeada por una monocapa fosfolípida (Kyle & Styles, 1977) y con un gran número de proteínas estructurales incrustadas, las oleosinas (Qu *et al.*, 1986). En el maíz los esferosomas se distribuyen en el escutelo del embrión (90-95% del total), representando alrededor de la mitad de su peso seco, y en menor medida, en el eje embrionario y las células de la Capa de Aleuronas (Kyle & Styles, 1977; Vance & Huang, 1987; FAO, 1993).
- Compuestos fenólicos: Se destacan los ácidos Hidroxicinámicos localizados en las paredes celulares del pericarpio y del embrión (Sen *et al.*, 1994) y se puede nombrar al Ácido transferúlico con un 78% del total de dicha familia (Das & Singh, 2015), al isómero ácido cis-ferúlico (0,3 - 1%), al ácido diferúlico, aprox. 17%, al ácido p-cumárico, aproximadamente un 4% (Sampietro *et al.*, 2012), y al ácido vainillina que se puede encontrar en proporciones altas, aunque inferiores a las del ferúlico (Das & Singh, 2015).

- **Minerales:** El cariopsis de maíz posee cenizas alrededor del 1,3% del peso seco total, y se localizan principalmente en el embrión, en un 78%. El fósforo es el mineral que más abunda y se halla en forma de fitato (*Myo*-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisfosfato) de Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ o K⁺ (FAO, 1993; Bohn *et al.*, 2008)
- **Vitaminas:** En el grano de maíz, las vitaminas hidrosolubles se encuentran sobre todo en la capa de aleurona y en menor medida en el embrión y el endospermo. Se han encontrado cantidades variables de tiamina (B1) y riboflavina (B2) y niacina (B3), provitamina A, (carotenoides), y vitamina E (tocoferoles; FAO, 1993).

Tabla 1.1.
Principales constituyentes químicos del maíz.

Variedad de maíz	Compuesto Químico (%) [*]						
	Proteínas	Almidón	Aceite total	Ácidos grasos (%) ^{**}			
Palmítico				Steárico	Oleico	Linoleico	
Bajo contenido en aceite	12,19	71,56	4,39	12,61	6,04	46,61	33
Alto contenido en aceite	11,96	58,97	5,5 a	14,73	2,63 d	43,31	39,77
Calidad proteica	11,02	70,7	4,74	15,14	3,85 e	33,54 de	44,19 d
Dulce	15,31 abc	51,99 abc	9,71 abc	16,22 d	4,32 b	33,78 de	44,65 d

(*) Porcentaje de peso seco; (**) porcentaje del total de la fracción lipídica; (a) diferencia con respecto a "Bajo contenido en aceite"; (b) diferencia con respecto a "Alto contenido en aceite"; (c) diferencia con respecto a "Calidad proteica"; (d) diferencia con respecto a "Bajo contenido en aceite"; y (e) diferencia con respecto a "Alto contenido en aceite"; valores de significancia estadística: a, b, y c: p < 0,0001; d y e: p < 0,05. Recuperado de Sanjeev, P. y cols. (2014).

Para concluir sobre la biología del cariopsis/semilla de maíz, la madurez fisiológica (MF) se caracteriza por ser un estado de quiescencia no-dormante, promovido y mantenido por la fitohormona ácido abscísico (Becraft & Yi, 2011). Es alcanzado a los 55-65 días post-polinización (DAP) y se caracteriza por alcanzar su mínimo contenido de humedad en sus tejidos, o dicho de otra manera, su máximo peso seco (Australian Government, Department of Health, Office of the Gene Technology Regulator [OGTR], 2008; Nielsen, 2013); típicamente en la MF, en regiones templadas, el contenido de agua es del 14% aprox.. También este estado se caracteriza por una máxima capacidad de tolerancia a la deshidratación (McDonald, 2004; Huang *et al.*, 2011).

Morfológicamente la MF se evidencia por la aparición en el extremo calazal-placentar (sitio donde óvulo se comunica con el ovario mediante la placenta durante la ontogenia) un tejido suberizado oscuro semipermeable que aísla la semilla de la mazorca: la capa hilar o capa negra (Bradbury *et al.*, 1961; Nielsen, 2013).

La semilla de maíz no posee un estado de dormancia prolongada, situación ésta, en donde la germinación está completamente inhibida por más que las condiciones ambientales sean las óptimas; sino que está relegada al periodo de la embriogénesis. Por tal motivo se habla que el cariopsis maduro se encuentra en un estado quiescente no-dormante, capaz de germinar cuando se den las primeras condiciones ambientales favorable, principalmente de humedad y temperatura (White *et al.*, 2000; Baskin & Baskin, 2004; OGTR, 2008).

Tanto la semilla del maíz como la de los demás cereales, entre otras, se clasifican en ortodoxas dado a que poseen mecanismos eficientes para afrontar un periodo de deshidratación extrema sin perder sus funciones vitales; de lo contrario se las clasifica como semillas recalcitrantes (**Pammenter & Berjak, 1999**). La tolerancia a la desecación está definida como la capacidad de activación de mecanismos morfológicos, fisiológicos y/o metabólicos que confieren, o que contribuyen a la, resiliencia frente a daños celulares que surgen como consecuencia de la deshidratación severa (**Pammenter & Berjak, 1999; McDonald, 2004**), mecanismo que son objeto de estudio, entre otros, de un área científica multidisciplinaria conocida como Anhidrobiología (**Hoekstra et al., 2001; Leprince & Buitink, 2015**).

Producción, almacenamiento e industrialización del grano de maíz, en Argentina.

América del Sur, en la campaña del 2015 cosechó alrededor de 123 millones de toneladas (Mt) de granos de maíz, de las cuales, aproximadamente el 91% fueron levantadas por Brasil y Argentina (**FAO, 2015**). En Argentina, con una producción aproximada de 33 Mt para el 2014, tercer productor a nivel mundial (www.fao.org/faostat), el maíz constituye un cultivo secundario que interviene principalmente en la rotación con otros cultivos como la soja, el algodón y el arroz dependiendo de la zona agroecológica, y también, en rotación con pasturas en las zonas ganaderas (**Asociación de Maíz Argentina [MAIZAR], 2013**).

La siembra de maíz en nuestro país evidenció, en los últimos cien años, un crecimiento del área sembrada, del rendimiento y producción muy notable, gracias a la aplicación de Ciencia y Siembra de Precisión (**MAIZAR, 2013**) y de Buenas Prácticas en Poscosecha de Granos (**Abadía et al., 2013**). En la actualidad aproximadamente el 77% de la producción y el 70% del área sembrada se centra en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, constituyendo la zona núcleo (**figura 1.5; MAIZAR, 2013**).

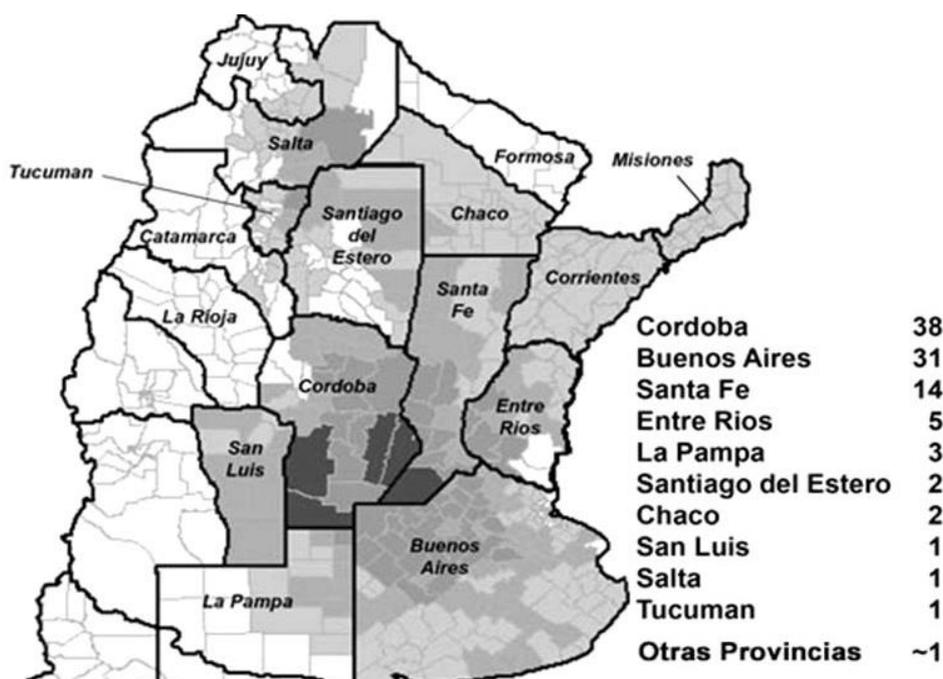


Figura 1.5. Porcentaje de producción por provincia.

El área de siembra de maíz en nuestro país es muy dispersa, pero las provincias de Córdoba y Buenos Aires concentran el 70% de la producción con los mejores rendimientos productivos y más oportunidades de destinos de la cosecha. Recuperado de www.news.agrofy.com.

Una vez cosechados, el almacenamiento y conservación del maíz debe realizarse con las menores pérdidas de calidad posible, entendiendo por ésta, los atributos del grano que le dan valor para su uso final. Por ej. si el destino es la alimentación humana o animal, la inocuidad, como estar libre de contaminación con micotoxinas y pesticidas, es un atributo necesario (**De la Torre et al., s.f.**).

El almacenamiento de granos está en gran proporción en manos del productor agropecuario, luego están los diferentes tipos de acopios y en menor proporción las industrias (**Casini & Santajuliana, 2008**). Los métodos de almacenamientos son varios (más comunes: silo-bolsa, silos de chapa convencionales, galpones destinados a granel y celda; **Casalins, s.f.**) y cada uno posee ventajas y desventajas que no se hará foco en ello, a excepción de los sistemas silo-bolsa dado su importancia en nuestro país.

La tecnología de almacenamiento de granos en silo-bolsa (bolsa cilíndrica de material sintético, que se rellena de material vegetal y reposa sobre el suelo) en nuestro país experimentó un avance muy notable gracias a las numerosas investigaciones y desarrollos tecnológicos realizados en conjunto entre Universidades e Instituciones Estatales y Privadas (**Casini et al., 2009; Castellari et al., 2015**). Siendo hoy en día una práctica muy común entre los Pequeños y Mediano Productores Tamberos, de la región maicera núcleo de Argentina, que son los que siembran y cosechan para la alimentación de su propio ganado vacuno (**Casini et al., 2009; MAIZAR, 2013; Porta, 2017**). Por otra parte muy pocos son los que se dedican a sembrar para luego venderlo en puertos, o a otros (del sector criador para carne, por ej.), quienes lo almacenan en silo-bolsa hasta que el precio en el mercado sea el conveniente (**Porta, 2017**). Más bien, en la gran mayoría lo produce para consumo interno (**Porta, 2017; Lucca, 2017**).

El principio de conservación de granos en silo-bolsa se basa en la modificación de la composición gaseosa interna (espacios entre los granos), gracias a la semi-hermeticidad del material de la bolsa y la actividad respiratoria (de semillas, insectos, hongos y bacterias), que generan en última instancia una atmósfera relativamente anóxica y con una elevada concentración de CO₂ (**Casini et al., 2009; Rodríguez et al., 2010; Castellari et al., 2015**); condiciones inhóspitas para la proliferación de insectos plagas y diversos microorganismos (**De la Torre et al., s.f.; Abadía et al., 2013; Castellari et al., 2015**) que generan pudrición. Cabe destacar que la actividad respiratoria de organismos aeróbicos, genera humedad y calor dentro del recinto, lo que permite la proliferación de otros organismos plagas (**Casini & Santajuliana, 2008; Favre, 2012**).

La confección del silo-bolsa, ensilado o silaje (ver "**anexo**", **figura 1**), llega a magnitudes de hasta 500 toneladas de material por bolsa, siendo más frecuente alrededor de 200 tn. (**Castellari et al., 2015**). Este proceso requiere de buenas prácticas de manejo ya que se debe prestar atención a una serie de cuestiones que pueden desarrollar posibles inconveniencias, que repercutirían en última instancia en la preservación de la calidad del grano (**De la Torre et al., s.f.; Casini, 2007; Castellari et al., 2015**). Para ello, el productor debe cosechar y almacenar el grano cuando se encuentra en su MF, con alrededor de 14% de humedad en el mismo; pero a veces no se cumple tal requisito, por determinado motivo, y se lo cosecha con humedad en grano elevada, como 23-24% (**Porta, 2017**).

Una particularidad del productor lechero que utiliza el grano para consumo interno es que lo debe moler o partir antes del almacenado para favorecer la digestión por parte del animal rumiante (Porta, 2017). A diferencia de esto, el grano que es destinado a alimentación de terneros para producción de carne (ej. “terneros bolitas”), se lo suministra entero (Porta, 2017; Lucca, 2017).

También debe considerarse el tiempo de almacenado. Así, se considera un riesgo bajo de deterioro por actividad de microorganismos cuando el contenido de humedad del grano es igual o inferior al 14% y el tiempo de almacenaje no supera los 6 meses (en regiones templadas); pero a medida que la humedad y el tiempo se incrementan, los riesgos son cada vez más altos (Casini, 2007; Castellari *et al.*, 2015).

Otro factor muy importante en la confección es evitar la ruptura de la bolsa (acción naturalmente propiciada por roedores, género Ratus y Mus; Casini & Santajuliana, 2008), ya que el ingreso de O₂ favorece la proliferación de organismos indeseados; tanto a más corto plazo y más severamente, cuanto más humedad inicial contenga el cereal (Porta, 2017), es decir, interrumpe con el proceso de adecuado almacenamiento.

Cabe destacar un aspecto importante en la conservación de la calidad del material vegetal mediante una técnica alternativa al secado del grano. Para esto, citaré un párrafo del trabajo de De la Torre, D. A., Cardoso, M. L., Depetris, G. J. y Bartosik, R. E. (s.f.),

“Cuando el destino final del grano de maíz es el consumo animal (forrajero) surge otra posible técnica de conservación de la calidad del grano, en este caso lo importante es conservar su valor nutricional y minimizar la pérdida de energía digestible. En este caso en vez de conservar el grano por deshidratación la técnica consiste en favorecer el desarrollo de bacterias que en ausencia de O₂ provocan una fermentación ácida (bacterias epifíticas de ácido láctico o BAC) reduciendo el pH del medio hasta niveles que impiden el desarrollo de bacterias y hongos saprófitos causantes del deterioro del grano (putrefacción). Para favorecer el desarrollo de las BAC el grano debe ser cosechado con un contenido de humedad de 25% o superior y almacenado en un sistema de almacenamiento hermético (normalmente se utiliza el silo bolsa) que impida la entrada de O₂. Luego de un tiempo se obtendrá un producto forrajero de calidad que podrá ser conservado durante un tiempo prolongado”. De la Torre y cols. (s.f.)

Otros factores a tener en cuenta es que el material este limpio (sin partículas extrañas, polvo, grano partido etc.), sano (sin daños físico y poca incidencia de enfermedades, fundamentalmente fúngicas), la cantidad de humedad atmosférica, la fluctuación térmica diaria y estacional que produce movimientos convectivos de masas de aire húmedo dentro de la bolsa y consecuente condensación de la misma en los sitios más frío de recibo, que se obtenga una buena compactación del material ya que se pueden generar lagunas de aire y por ende acumulación de oxígeno y humedad, etc. (De la Torre *et al.*, s.f.; Clemente *et al.*, 2006; Casini, 2007; Favre, 2012).

Por otro lado, existen factores biológicos como el grado de contaminación a campo con hongos micotoxigénicos (ej. *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg), o con esporas de hongos del almacenamiento (género *Aspergillus* por ej.), y la presencia de huevos, larvas, pupas o adultos de insectos que se alimentan del grano (ej. *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Curculionidae)), que

también comprometen considerablemente en la preservación de la calidad del mismo (**Danho et al., 2002; Reed, 2005; Casini & Santajuliana, 2008; Keller et al., 2013; Castellari et al., 2015**).

Del total producido a nivel nacional, se consume internamente alrededor del 40% y aprox. el 60% se exporta, colocando de esta manera a Argentina como el 5° exportador mundial (campana 2012; **MAIZAR, 2013**). Para la exportación nuestro país cuenta con numerosos puertos: P. Buenos Aires, P. Lima, P. San Pedro, P. Ramallo, P. San Nicola, P. Villa Constitución, P. de Rosario, P. de San Lorenzo y San Martin, P. Diamante, P. Santa Fe, etc. etc. (**Ibañez, 2008**).

Del grano consumido internamente, se reparte entre forraje (90%: ganadería bovina de carne, avicultura, lechería y porcino) y las industrias (10%) que incluye a la molienda seca, húmeda y bioetanol, industria ésta que comienza a funcionar en nuestro país a partir del 2012 (**MAIZAR, 2013**).

La industria de la molienda húmeda elabora, en orden de importancia en base al volumen producido: frutuosa, gluten (*feed y meal*), glucosa, almidones, aceite de maíz, dextrosa sólida, maltosa, jarabes mezcla, colorante caramelo, maltodextrina, y almidones modificados y colas, entre otros. Los principales destinos de éstos son para la industria farmacéutica, textil, biopolímeros, alimenticias, cosméticas, limpieza, etc. (**MAIZAR, 2013**). El tipo comercial de maíz utilizado para este fin, típicamente es el Dentado, raza Dentado Amarillo (**Gear, 2006**).

Por otro lado, la industria de molienda seca del maíz abarca dos áreas, la que produce harinas, grañones y sémolas para polenta (primera industrialización) y la que elabora productos como snacks y cereales para desayuno (segunda industrialización; **MAIZAR, 2013**), los tipos de maíz comercial más utilizado en este caso son Duros o Flint, cuya raza representativa es Cristalino Colorado, e incluye al maíz Plata (**Gear, 2006**).

Deterioro de la calidad del grano por mohos, durante su almacenamiento.

Dependiendo del sistema de almacenamiento del grano de maíz, se presentan problemas asociados a distintos tipos de plagas, así, en los silos convencionales (chapa) los insectos, ácaros y microorganismos aerobios (ej. mohos) son los más importantes, mientras que en los silo-bolsas, lo son roedores y moho (**Casini & Santajuliana, 2008**). Los roedores así como los edentados (“peludo”) pueden o no ser un factor importante para el deterioro, dependiendo del grado de daño ocasionado en la bolsa, que a su vez depende del tamaño poblacional, pero es una situación muy común en nuestro país (**Porta, 2017**).

Cuando el grano almacenado está infestado con insectos plaga, cuyo alimento básico es el almidón, éste (y otros compuestos) son metabolizados por aquellos liberando calor y humedad, pudiendo generar intensos focos de calor. Esto genera gradientes térmicos dentro del recinto que conlleva a movimientos de aire que termina con incrementos de humedad en las zonas más frías, dado por la condensación de tal humedad transportada por el aire (**Casini & Santajuliana, 2008**). Este fenómeno, como se comentó anteriormente, favorece la proliferación de hongos que permanecen en los maíces provenientes del campo.

Los “hongos o moho de campo”, incluidos *Fusarium*, *Alternaria* y otros, pueden crecer sólo cuando el medio de crecimiento contiene por lo menos 20 a 25% de humedad, de modo que los granos almacenados con un porcentaje inferior de humedad, no son un sustrato que permita la proliferación de aquellos. Pero estos hongos de campo no se mueren sino más bien producen estructuras aletargadas (conidias, clamidosporas y pseudo-clamidosporas), sobre el pericarpio o el interior del cariopse, que le permiten sobrevivir bajo condiciones secas por largos períodos de tiempo, hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para la proliferación (Reed, 2005).

También se hallan los “mohos de almacenamiento”, especialmente *Aspergillus* y *Penicillium* cuyas esporas llegan al material vegetal durante la manipulación y almacenamiento del grano. Éstos, prosperan en granos almacenados que están muy secos para sostener el crecimiento de “hongos de campo”, particularmente entre un 12 a 19% de humedad (Reed, 2005).

Tanto en climas tropicales como en templados, la temperatura y contenido de humedad del grano establecen la tasa de deterioro así como la pérdida (Reed, 2005).

Fitopatógeno *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

Creo que es necesario comenzar esta sección con una descripción del ciclo biológico del fitopatógeno ya que se aleja un poco de nuestra intuición y de los familiarizados ciclos de vida vegetal y animal. Una vez esto, será más fácil entender los temas venideros.

El ciclo biológico (**figura 1.6**) general de un representante filamentoso del Phylum Ascomycota, cual comprende alrededor del 75% de las especies fúngicas descritas (Deacon, 2006, p. 27; Hibbett *et al.*, 2007), comienza con dos hifas monocarióticas haploides compatibles entre sí, vegetativa y sexualmente (tipo reproductivo o *mating type* opuesto; Leslie & Summerell, 2006, pp. 98-99), al menos para la especie en estudio. Luego, bajo condiciones ambientales específicas la cepa hembra fértil, desarrolla una estructura denominada protoperitecium (Hornok *et al.*, 2007), y ciertas hifas se diferencian en un ascogonio (gametangio), estructura multinucleada receptora de propágulos masculinos y/o formadora de tricógino (Deacon, 2006, pp. 27-29; Leslie & Summerell, 2006, p. 98).

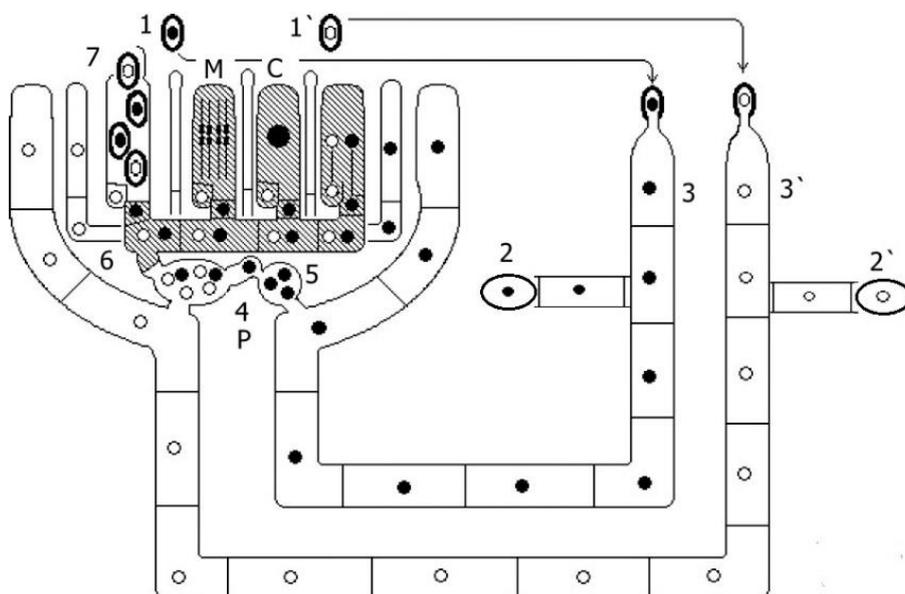


Figura 1.6. Modelo esquemático general del ciclo biológico de un ascomiceto.

1 y 1': ascosporas, 3 y 3': hifas micelio vegetativo ("n" monocarióticas), 2 y 2': conidióforos con célula conidiogénica en sendos ápices, 4: ascogonio con tricógino emergiendo, 5: anteridio, 6: hifas dicarióticas (rayado), 7: ascosporas emergiendo de las ascas maduras, P: plasmogamia, C: cariogamia, M: meiosis. Tomado de Cocucci, A. E. y Hunziker, A. T. (1994).

El tricógino no se ha estudiado en *Fusarium* pero si en otras especies como en *Neurospora crassa* Shear & Dodge (Leslie & Summerell, 2006, p. 98). Éste es un tubo protoplasmático que se pone en contacto con la pared celular del órgano sexual masculino (gamentangio: anteridio) para llevar a cabo un proceso de fusión protoplasmática, anastomosis o plasmogamia, dónde los núcleos haploides del anteridio pasan al ascogonio (**figura 1.7, A**; Cocucci y Hunziker, 1994, p. 38; Deacon, 2006, pp. 27-29).

Luego, del ascogonio cenocítico se desarrolla una hifa ascogénica que eventualmente termina originando un asco (gr. bolsa: carácter distintivo del filo). Este proceso, en los ascomicetes más evolucionados, ocurre protegido en el interior de un esporosoma de tipo peritecioide (**figura 1.7, C**; Karov *et al.*, 2009), estructura ésta, resultante de la maduración del protoperitecium antes mencionado, que se inicia una vez ocurrida la plasmogamia (Leslie & Summerell, 2006, p. 98).

En el interior de la hifa ascogénica se produce una cariogamia de dos núcleos genéticamente compatibles (procedentes de sendas hifas monocarionticas haploides parentales) originando un núcleo diploide (célula madre de un asca) e inmediatamente después, una cariocinesis meiótica dando lugar a cuatro núcleos haploides recombinantes. Éstos van a madurar en ascosporas o meiosporas (Deacon, 2006, pp. 27-29). Para el caso de *Gibberella*, teleomorfo de *Fusarium*, los ascos son cilíndricos, achatados en la parte superior, unitunicados y operculados en su ápice (figura 1.7, B; Karov *et al.*, 2009).

Por germinación de las ascosporas nacen hifas haploides monocarionticas, que por sucesivas divisiones mitóticas constituyen el micelio asimilador o vegetativo, capaz de reproducirse asexualmente mediante la formación de mitosporas, llamas conidiosporas o simplemente conidias (esporas clonales). Esta fase es conocida como anamorfa y es dominante en espacio y tiempo (Cocucci y Hunziker, 1994, p. 38; Deacon, 2006, pp. 27-29).

La gran mayoría de los hongos verdaderos (eumicetes) poseen un limitado desarrollo del micelio dicariótico, generalmente quedando relegado después de la plasmogamia, formando parte del peritecio, de existencia efímera en comparación con el estado monocariontico del micelio vegetativo (Griffin, 1996, pp. 301-302).

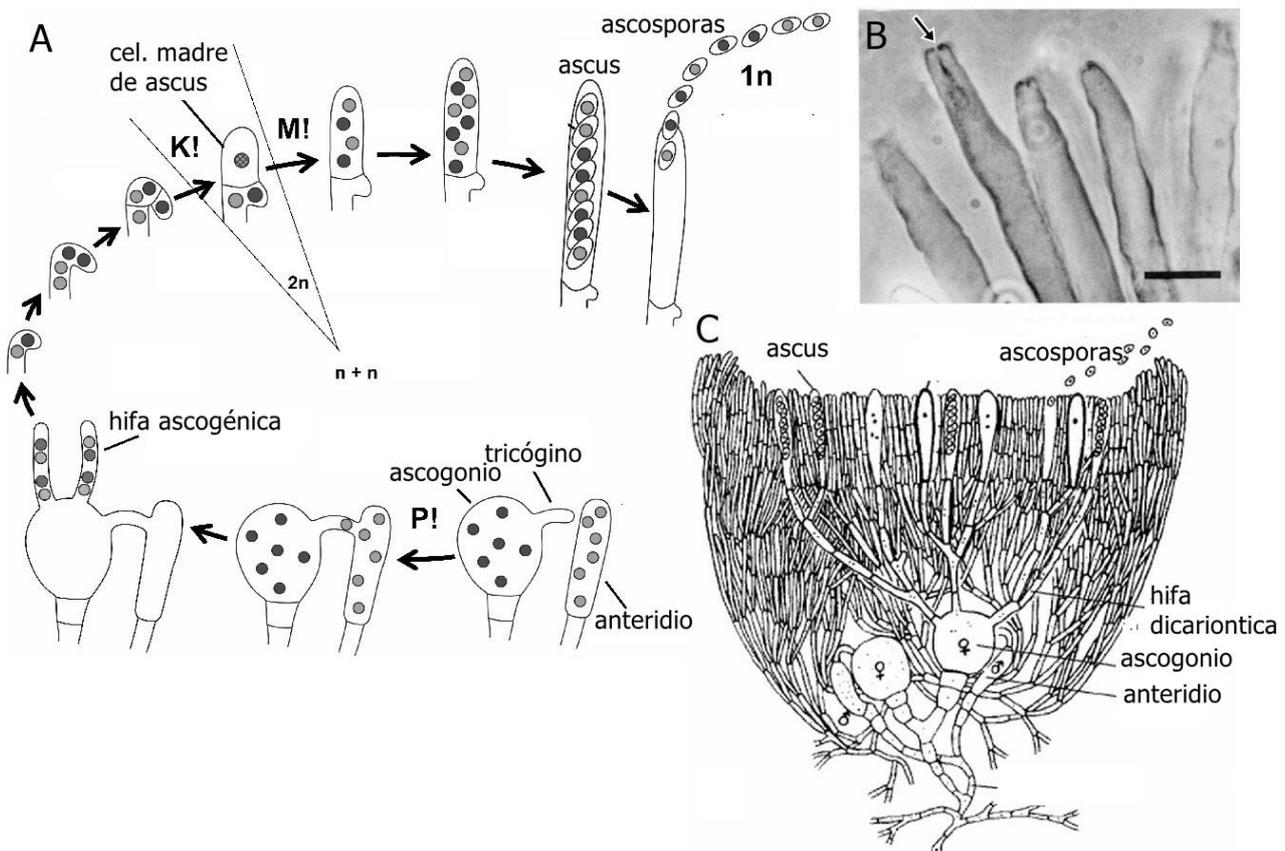


Figura 1.7. Fase sexual general de un ascomiceto.

A) desarrollo sexual: Los núcleos de diferente tonalidad de gris representan dos genotipos distintos (compatibles entre sí); P!, plasmogamia; K!, cariogamia; M!, meiosis; 2n, núcleos diploide (diplofase); n, núcleos haploides (haplofase). Adaptado de www.commonswikimedia.org. B) Micrografía con MO de ascas de *Gibberella* que ya han liberado las ascosporas, la flecha indica el opérculo (barra = 10µm). Adaptado de Trail, F. y Common, R. (2000). C) Esquema de una ascoma peritecioide que muestra las hifas dicarióticas y los gametangios masculinos y femeninos. Adaptado de Carrillo, L. (2003).

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg.

En 1904, J. L. Sheldon identificó en EE.UU, un moho con pigmentación rosada del género *Fusarium* que estaba relacionado con eventos de toxicidad a animales de granja que se alimentaban de maíces infectados. Lo describe como *Fusarium moniliforme* Shel. (Sheldon, 1904) y posteriormente se renombra como *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg – teleomorfo: *Gibberella fujikuroi* MP-A (bajo los criterios de los Conceptos de Especie Biológica y Filogenética; O'Donnell *et al.*, 1998; Seifert *et al.*, 2003; Leslie & Summerell, 2006, pp. 85,90). También se puede encontrar en la bibliografía específica los sinónimos del teleomorfo (según el Concepto de Especie Morfológica): *Gibberella moniliformis* Wineland (Crous *et al.*, 2004; Leslie & Summerell, 2006, p. 93; Gleen, 2007) y *Gibberella fujikuroi* var. *moniliformis* (Wineland) Kuhlman (Crous *et al.*, 2004).

Cabe mencionar algunas cuestiones en lo que respecta a la taxonomía de los hongos filamentosos, a fin de entender mejor a estos organismos. La clasificación taxonómica de los hongos tradicionalmente se basa en las estructuras reproductivas sexuales, ya que tienden a conservarse evolutivamente, y en general, se basa en caracteres fisiológicos y morfológicos: criterios utilizados bajo el Concepto de Especie Morfológica (CEM). No obstante algunas especies han perdido (evolutivamente) su fase sexual (ej. anamorfos *Aspergillus fumigatus* Fresen. y *A. niger* Tiegh.) o no ha sido descubierta aún (Deacon, 2006, p. 157; Salas-Lizana, 2007). Por esto, el *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants* (McNeill *et al.*, 2011) permite que el micólogo le dé dos nombres formales al mismo organismo, uno para su fase sexual (hongo teleomorfo, ej. *Gibberella moniliformis* Wineland) y otro para su fase vegetativa (hongo anamorfo, ej. correspondiente al antedicho: *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg).

F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg se distingue morfológicamente por sus macroconidias (figura 1.8, C; figura 1.9, A), que aunque no todas las cepas las producen, cuando el hongo crece sobre un medio sintético Agar Papa Dextrosa (PDA) tienen forma de hoz (31-58 x 2,7-3,6 µm), paredes delgadas, 3- a 5-septadas, célula basal en forma de pie, y la célula apical es a menudo alargada, curvada y con punta cónica (Nelson, 1992; Monzón & Rodríguez, 2001; Leslie & Summerell, 2006, p. 274).

Cuando el talo vegetativo se hace crecer *in vitro* sobre un medio de cultivo Agar Hoja de Clavel (CLA), aunque pueden ser raros en algunos aislados, se forman en esporodoquios anaranjados pálido (Leslie & Summerell, 2006, p. 274).

En cambio, sus microconidias (figura 1.8, A y D; figura 1.9, B), al crecer en una medio CLA se forman en célula conidiogénica tipo monofialides que pueden encontrarse de a pares en la misma hifa (en forma de "V" dando aspecto de "oreja de conejo"). Cuando el medio es PDA, también se originan en monofialides, en forman de largas cadenas o a veces se agrupan en pequeñas falsas cabezuelas (figura 1.9, C y E), que consisten en gotas de humedad en el ápice de los microconidióforos que mantiene a las conidias en su lugar a medida que se producen. Estas mitosporas son de forma oval (7-10 x 2,5-3,2µm) con la base plana o en forma de cero "0" (Nelson, 1992; Monzón & Rodríguez, 2001; Leslie & Summerell, 2006, pp. 274-275).

Otra característica de esta especie es que no produce clamidosporas, aunque unas células acumulan sustancias y se hacen más voluptuosas, cumpliendo un rol similar a aquellas (falsa clamidospora; Leslie & Summerell, 2006, pp. 274-275).

Se puede mencionar además, como caracteres ecológicos y fisiológicos, que es un ascomiceto cosmopolita persistentemente asociado al cultivo de maíz, especialmente en zonas de climas tropical y subtropical con temperaturas medias anuales entre 15 y 20°C. En laboratorio es capaz de crecer en un rango de temperatura que va desde los 2,5 hasta 37,7 °C, tolerar más de un 15% de NaCl en el sustrato. Necesita una actividad de agua, a_w , mínima de 0,87 a 25°C y también puede crecer en condiciones anaeróbicas (Monzón & Rodríguez, 2001; Carrillo, 2003, p. 72; De Lucca, 2007). Se distingue también por la producción de principalmente fumonicinas tipo B1 (Thrane, 2004).

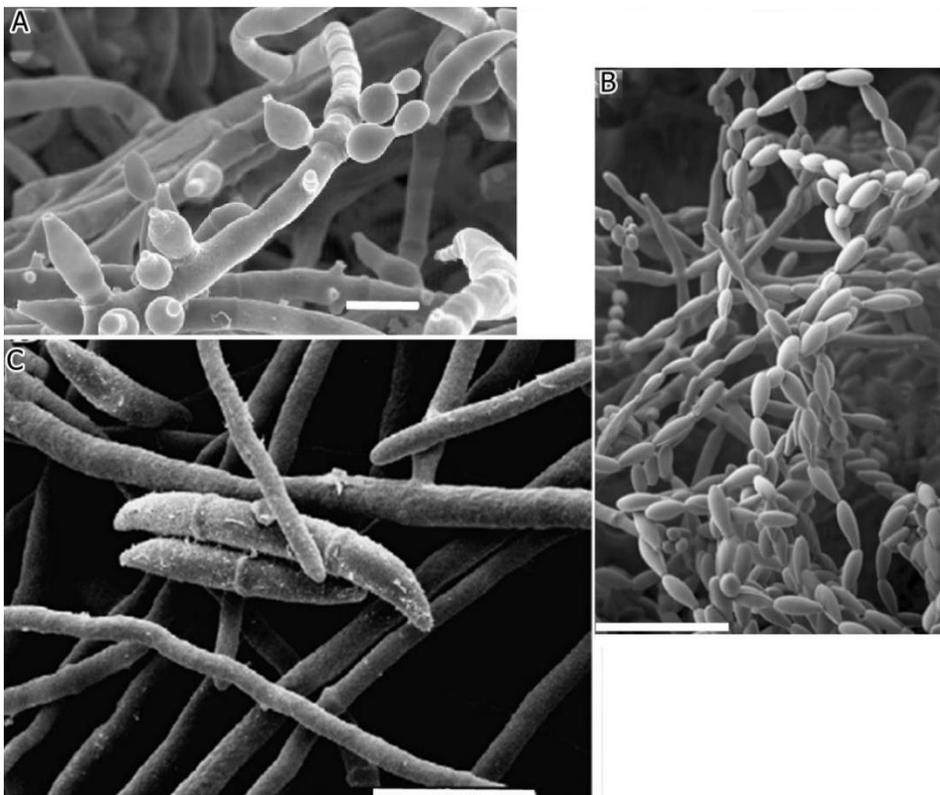


Figura 1.8. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de *Fusarium* sp.
 A) hifas con células conidiogénicas de *F. dimerum* Penz (barra = 10µm). Tomado de Vismer, H. F. y cols. (2002).
 C) Macroconidia de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (barra = 10µm). Tomado de Plodpai, P. y cols. (2013).
 B) Microconidias en cadena de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (barra = 20µm). Tomado de Duncan, K. E. y Howard, R. J. (2010).

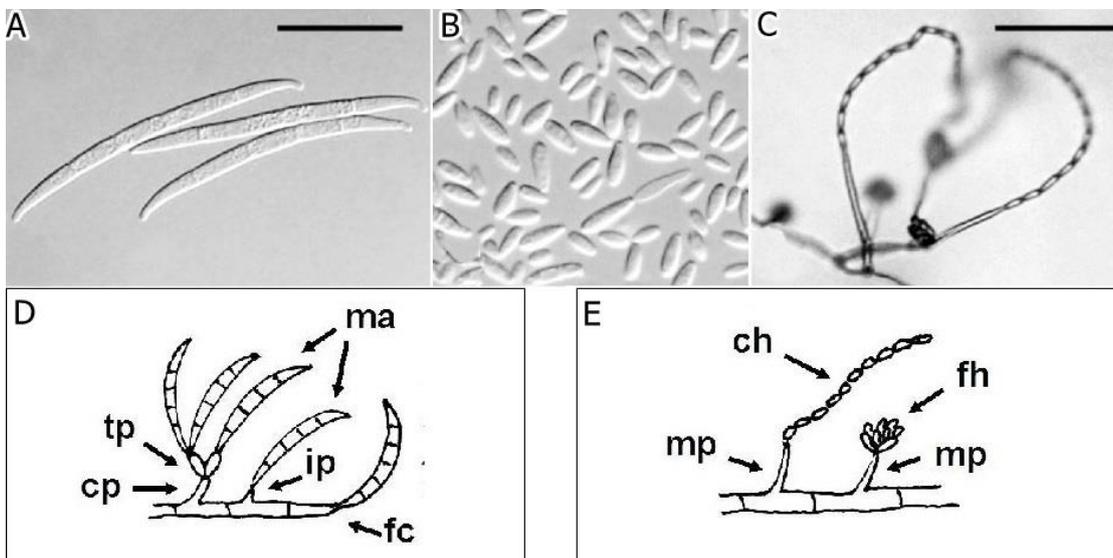


Figura 1.9. Conidias de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

A) macroconidias; B) microconidias; C) monofialides con microconidias en cadena y pseudo- cabezuelas (MO, barra A y B = 25µm y C = 50µm). Adaptado de Leslie y Summerville (2006). D y E) Es-quemas: ch, cadena; mp, monofialide; fh, pseudocabezuela; cp, conidiosforo; tp, fialide terminal; ip, fialide intercalar; ma, macroconidia y fc, celula basal. Extraído de Zheng, W. y cols. (2012)

Fitopatosistema: Hongo - Maíz - Ambiente.

Un organismo vegetal manifiesta síntomas de alguna enfermedad cuando sufre una alteración metabólica y/o fisiológica que afecta a su desarrollo biológico normal y disminuye la probabilidad de dejar descendencia. La enfermedad resulta de la interacción entre el hospedante, el agente infeccioso y el ambiente; puede desencadenarse y prosperar en ciertos órganos o todo el organismo, y en determinado periodo ontogénico o durante todo el ciclo vital (Agrios, 2005, pp. 4-7; Botta & Gonzalez, 2012, pp. 127-130).

Aunque no es la especie de fusarium más frecuentemente encontrada, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg prevalece en el rastrojo de maíz (comportamiento saprofito; Bacon *et al.*, 2001) en el campo después de una cosecha, y es capaz de resistir condiciones adversas del ambiente de manera análoga a lo que lo harían las clamidosporas, gracias a que produce un engrosamiento de las paredes de ciertas hifas, que le brindan tal propiedad de latencia (Leslie & Summerell, 2006, pp. 274-275; Botta & Gonzalez, 2012 p. 136).

Al encontrarse en el suelo / rastrojo, cuando los campos son sembrado, las hifas son capaces de colonizar los tejidos de las raíces y el mesocótilo unos días después de la germinación de los granos de maíz (figura 1.10, A; Oren *et al.*, 2003; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014) o directamente pueden atravesar el pericarpio del grano, unos días después de la siembra (Bacon *et al.*, 2001; Oren *et al.*, 2003). De esta manera, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg puede desarrollarse sistémicamente por la planta comportándose como endófito (sin causar daños) o desencadenar patogénesis en la plántula o posteriormente en el tallo y la espiga (mazorca). Lo interesante es que cuando se comporta como endófito, puede colonizar las semillas que se formarán en la planta al madurar sexualmente (Botta & Gonzalez, 2012), quedando la descendencia infectada vía semilla, es decir, se produce una transmisión vertical del patógeno (Bacon *et al.*, 2001; Duncan & Howard, 2010), situación que no es de la más frecuente (Oren *et al.*, 2003) pero si es importante a tener en cuenta para el control o manejo del fitopatógeno a campo, ya que los fungicidas que se aplicarían a las semillas no serían efectivos en este caso (Bacon *et al.*, 2001). Así, se piensa que éste puede existir de manera sistemática y asintomáticamente (en raíz, tallo y granos) en todos los campos de maíces, alrededor del mundo (Duncan & Howard, 2010).

La capacidad de éste hongo de comportarse como endófito o de generar patogénesis depende del modo de crecimiento del mismo en el hospedador, que a su vez, depende de la naturaleza de la interacción patógeno-hospedador y de la naturaleza de ambos genotipos (Oren *et al.*, 2003; Lanubile *et al.*, 2014). Entonces, cuando el micelio posee crecimiento muy escaso (poca biomasa) y bien organizado de modo que las hifas crecen por los espacios intercelulares y colonizan muy pocas células del tejido - menos frecuentemente el endófito se convierte en intracelular, sólo en

circunstancias especiales (Bacon *et al.*, 2001) – no hay manifestación de la enfermedad; pero cuando el crecimiento es desmedido con gran producción de hifas y conidias, y colonización intracelular de todo el tejido afectado, los síntomas se hacen visibles y la enfermedad se pone de manifiesto (Oren *et al.*, 2003). En ambos casos, se ha medido producción de fumonicina tipo B1 (FB1; Bacon *et al.*, 2001).

Cuando el hongo se encuentra en el suelo, puede infectar la semilla o la plántula como se comentó en el párrafo anterior, o puede llegar a otras partes de la planta por medio de la producción de macro- y microconidias, y su posterior dispersión por el agua de lluvia (Deacon, 2006, p. 205; Botta & Gonzalez, 2012, p. 136), el viento o insectos vectores (Botta & Gonzalez, 2012 p. 136; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014). Así, estas esporas, o las hifas germinadas de éstas, pueden ingresar al tallo, mazorca y grano, vía daños mecánicos ocasionados por la horadación que dejan los insectos fitófagos (Duncan & Howard, 2010; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014), quienes a su vez actúan como vectores de conidias (ej. *Ostrinia sp.* o “gusano barrenador”, *Diabrotica sp.* o “gusano de la raíz”, “gusano elotero”, “trips” y los “gorgojos”), y las aves granívoras (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Otra vía de infección de la planta de maíz y la más frecuente, es a través de los estigmas florales con ingreso al interior de los cariopsis que se están formando en la inflorescencia femenina (Duncan & Howard, 2010; Botta & Gonzalez, 2012; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014), con un período de mayor susceptibilidad entre los 4 y 7 días después de la aparición de los estigmas, una vez polinizados (Botta & Gonzalez, 2012), pero aún verdes (no senescente).

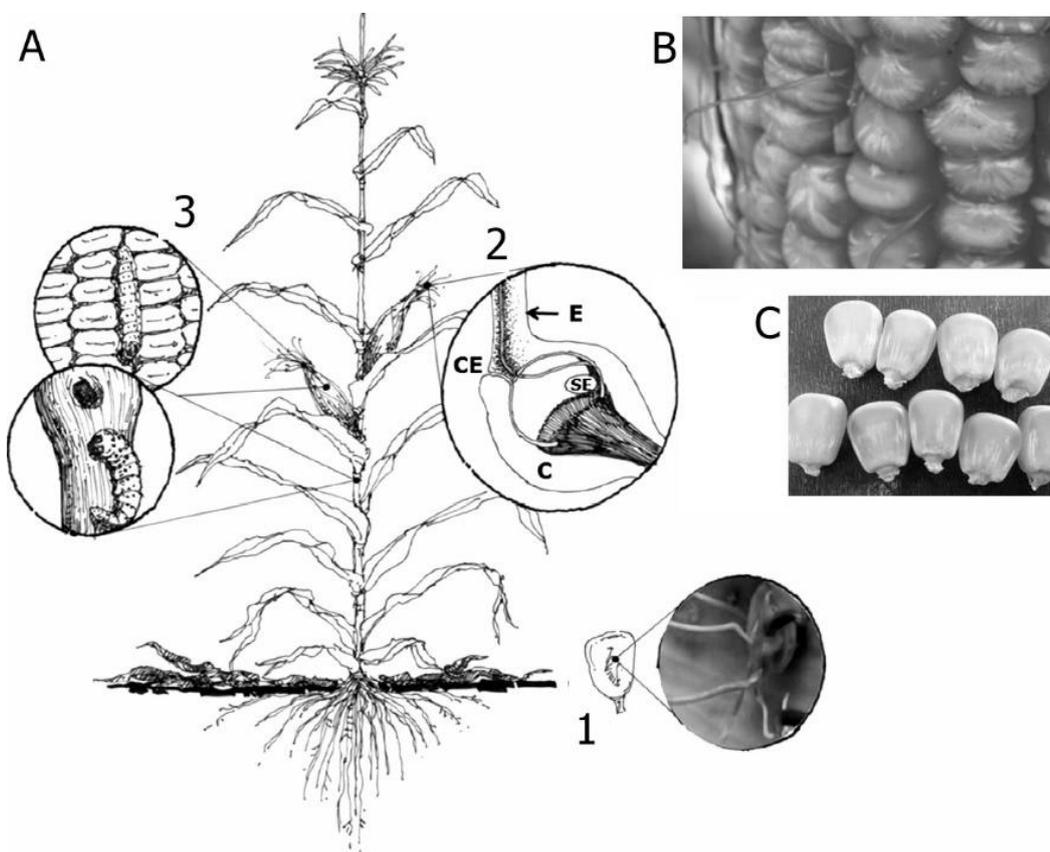


Figura 1.10. Fitopatologías sobre el maíz por *F. verticillioides*. A) Rutas de entrada al maíz. 1: Infección sistémica de plántulas. 2: Infección a través del estigma (E); CE, canal estilar; C, carpelo; SE, saco embrionario. 3: Infección a través de heridas. Tomado de De la Torre-Hernández y cols. (2014). B y C) signos característicos de infección por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, en granos de maíz (estrías blancas). Tomado de Aguaysol y cols. (2013).

Las conidias llegan al estigma y se mueven de manera pasiva, a través del agua libre en la superficie de la estructura vegetal, hasta su base donde se halla el ovario de la flor femenina (**figura 1.11**). Aquellas que germinan en la entrada del canal estilar, las hifas pueden penetrar libremente el carpelo (pared del ovario, y posterior pared del fruto) hasta el interior, dónde se encuentran el saco embrionario en desarrollo y las demás estructuras de la semilla (**Duncan & Howard, 2010**).

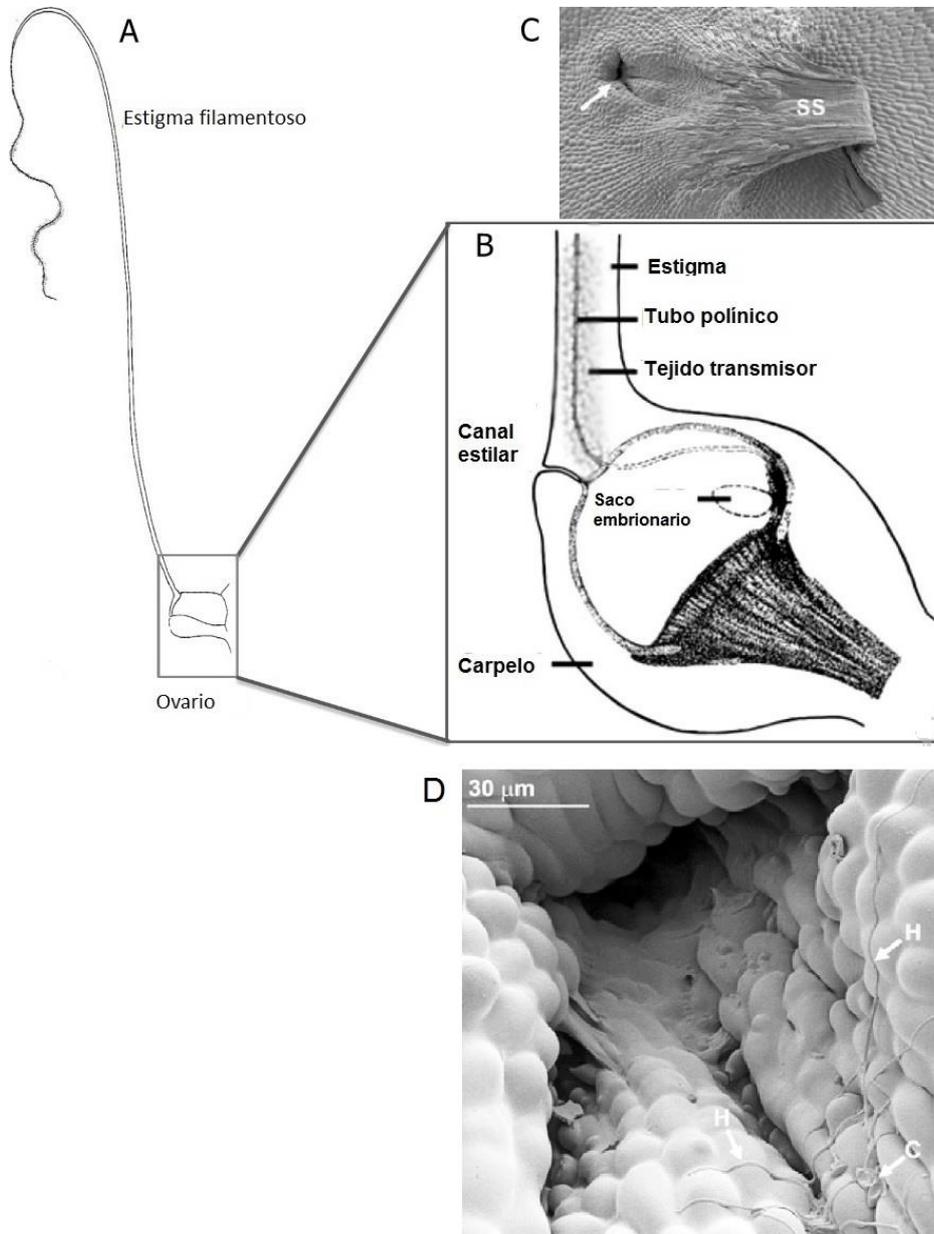


Figura 1.11. Colonización fúngica en el canal estilar de la flor femenina del maíz. A) Esquema de una flor pistilada, B) sección longitudinal del ovario que muestra el recorrido del tubo polínico, C) micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de la superficie del carpelo que muestra la entrada del canal estilar y la naciente del estilo-estigma (SS). Adaptado de Duncan, K. E. y Howard, R. J. (2010) y D) micrografía de MEB que muestra la entrada del canal estilar de una flor de *Z. mays* L. ssp *mays* y las conidias (C) e hifas (H) de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg creciendo sobre la superficie del carpelo. Tomado de Duncan y Howard (2010).

La sintomatología generada por la infección de la espiga o mazorca, sea cual sea la vía de infección, se conoce como Podredumbre de la Espiga del Maíz (PEM) y sus signos, cuando se trata de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, son: granos infectados de manera aislada, pueden mostrar estrías blancas o una masa algodonosa blanca o rosada sobre el mismo, o también pueden no mostrar síntomas visibles (**figura 1.10, B y C; Botta & Gonzalez, 2012; Aguaysol et al., 2013**). Esta infección

causa pérdida de calidad y rendimiento del grano, y contaminación con FB1 (Botta & Gonzalez, 2012; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

No obstante, la cobertura intacta y no dañada compuesta por muchas hojas superpuestas en forma de vaina, que encierra a la inflorescencia femenina y a sus estigmas florales, es una barrera adicional al pericarpio sano, frente a hongos patógenos específicos de tejidos del cariopsis (Duncan & Howard, 2010). Especialmente para *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg que aparentemente es incapaz de formar estructuras de penetración de sustrato, como los apresorios (Duncan & Howard, 2010). Según afirman los investigadores Duncan y Howard (2010), entonces la arquitectura fenotípica del canal estilar, abierto o cerrado es un factor clave que determina la susceptibilidad o resistencia, respectivamente, de la PEM por el patógeno en cuestión vía infección estigma.

El agente causal de la PEM más importantes identificado en la Argentina, en la región Pampeana (Martinez & Moschini, 2014) y el NOA (Aguaysol *et al.*, 2013), es *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. La incidencia de éste es entre 20 a 100%. En cambio la incidencia del segundo agente infeccioso más importante, *F. graminearum* Schwabe, es comparativamente menor (Carmona & Scandiani, 2011). Otras especies de menor incidencia que contaminan los maíces en Argentina son: *F. subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas, *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg y *F. oxysporum* Schltdl (Botta & Gonzalez, 2012).

También se han registrado especies fitopatógenas causantes de PEM perteneciente a los géneros *Diplodia* y *Penicillium*, pero de mucha menor incidencia que *Fusarium* (Botta & Gonzalez, 2012).

Fumonicinas: toxicidad, incidencia y niveles máximos permitidos.

Muchas especies anamorfas de *Fusarium* y teleomorfas del complejo *Gibberella fujikuroi* son reconocidos por su capacidad de infectar cultivos alrededor del mundo (fitopatogenicidad) y por contaminar con toxinas fúngicas (micotoxinas) cereales y sus productos derivados (toxigenicidad; Nelson, 1992; Carrillo, 2003, p. 72; De Lucca, 2007; Botta & Gonzalez, 2012); además de que algunas especies pueden ser patógenos oportunistas de mamíferos incluyendo a las personas (hialohifomicosis; Nelson, 1992; Carrillo, 2003, p. 72; De Lucca, 2007; Glenn, 2007).

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por hongos filamentosos anamorfos y teleomorfos que causan condiciones patológicas en algunos hospedadores, tanto en plantas como animales (Griffin, 1996, p. 259; Ueno, 2000; Bianchini & Bullerman, 2014), y se presentan en una gran variedad de estructuras, propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Las micotoxinas tienen un origen en el metabolismo secundario fúngico (productos naturales; Carrillo, 2003, pp. 1-24; Deacon, 2006, p. 137; Smith *et al.*, 2016).

Hoy se sabe que *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg son los organismos más importantes desde el punto de vista de la producción de la micotoxina FB1 (figura 1.12) y desde el punto de vista de prevalencia en cultivos de maíz en los EE.UU y otros países de

región templada (Munkvold & Desjardins, 1997; IARC, 2002, p.303; FAO, 2003), incluyendo a la Argentina (Carmona & Scandiani, 2011; Aguaysol *et al.*, 2013; Martinez, & Moschini, 2014).

Desde su identificación en 1988, se descubrieron más de 60 moléculas estructuralmente relacionadas a las fumonicinas (FUMs), agrupada en cuatro series: A, B, C y D; y biosintéticamente ubicadas dentro de la familia de los policétidos (Dewick, 2002, pp. 35-36; Desjardins & Proctor, 2007). Las FUMs de mayor incidencia en maíces son las FUM del grupo B (figura 1.12), secretadas por la mayoría de las cepas toxicogénicas de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg y *F. nygamai* Burgess & Trimboli, por orden de importancia (Nelson, 1992; Marín-García, 2010; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

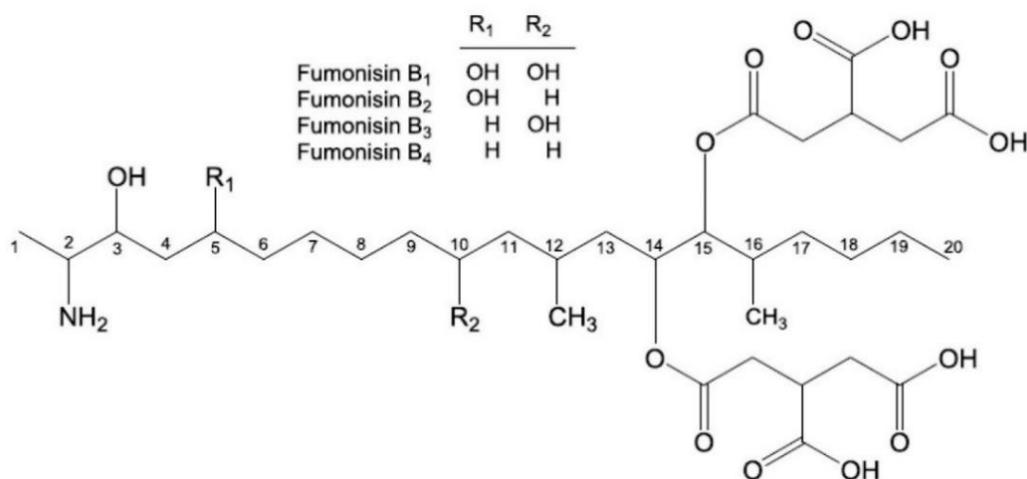


Figura 1.12. Estructura de las fumonisinas de la serie B.

Representación de la estructura molecular de las principales moléculas FB. Tomado de Marín-García, P. (2010).

La exposición a las FUMs por parte de los animales / personas, se da naturalmente por vía oral durante la ingesta de alimentos contaminados. En estudios con primates no humanos se ha comprobado que el 61% de la C¹⁴-FB1 suministrada por sonda, fue recuperado en heces en un periodo de 3 días, y el 1,2% en la orina. Niveles residual de radiactividad fue encontrado en músculo esquelético (1%), hígado (0,4%), cerebro (0,2%), riñón, corazón (0,1) y sangre (0,1%), mientras que el 12% de la radiación dosificada fue detectada en intestino. El análisis de la radiactividad de intestino, heces y orina se debe tanto a FB1 y su análogo hidrolizado (Shephard, *et al.*, 1994).

Otros estudios experimentales han comprobado que las FUMs genera lesiones renales en la mayoría de los modelos animales de estudio, defectos cardíacos en babuinos y cerdos, edema pulmonar e hipertrofia media en arterias pulmonares de cerdo, cáncer hepático y renal en ratas alimentadas crónicamente con FB1 (US Food and Drug Administration [USFDA], 2001).

También se han observado cambios en los niveles de esfingolípidos en todos los animales estudiados (USFDA, 2001) ya que se ha visto que las FUMs producen la interrupción de la ruta de síntesis de estos compuestos por medio de la inhibición de la enzima ceramida sintetasa (Merrill *et al.*, 2001).

La leucoencefalomalacia equina (LEME) es una neuropatología letal específica de caballos, caracterizada por una necrosis licuefactiva de la sustancia blanca del sistema nervioso central (Glenn, 2007; Giannitti *et al.*, 2011). Tal enfermedad es desencadenada por el consumo crónico de

FUMs. Así, se comprobó en un estudio sobre un brote de LEME en Argentina, que la dieta de los caballos consistía, en parte, de granos de maíz contaminados con una concentración de 12,5µg/kg de FB1 y 5,25µg/kg de FB2 (Giannitti *et al.*, 2011).

Pitt (2000) argumenta sobre la buena correlación entre los lugares donde la principal fuente de alimentación está contaminada con FUMs y la frecuencia de cáncer de esófago en personas, como en Transkei (Sudáfrica) y algunas partes de China (Pitt, 2000). Sin embargo, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE.UU (USFDA, 2001) advierte que los estudios epidemiológicos hechos hasta la fecha no muestran resultados concluyentes o claros entre la incidencia de FUMs en los alimentos y la frecuencia de cáncer de esófago o intestino en personas, argumentando falta de controles adecuados y los múltiples factores no controlados en tales estudios epidemiológicos. Pero no ha descartado la toxicidad en personas debido a los efectos adversos ya conocidos que genera en animales, con quienes compartimos rutas metabólicas en común (Shephard, *et al.*, 1994; Merrill *et al.*, 2001; USFDA, 2001).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC: *International Agency for Research on Cancer*) en su informe del 2002, concluye que hasta esa fecha las correlaciones entre las zonas de alto riesgo (prevalencia de cáncer de esófago en personas) y la cantidad de maíz contaminados con FUMs (FB1 + FB2 + FB3) que se ingiere, no es estadísticamente significativa (IARC, 2002, pp. 309-311).

Los niveles de FUMs en granos de maíz dependen de muchos factores ambientales, como lo es la temperatura, humedad y lluvia durante el periodo pre-cosecha, así también como las condiciones de almacenamiento, del daño causado por insectos granívoros, presencia de químicos, el tipo de cepa fúngica infectiva, la microflora normal de la superficie del grano de maíz, etc. (Nelson, 1992; USFDA, 2001; IARC, 2002, p. 304; Smith *et al.*, 2016); causa por la cual se registran grandes variaciones en dichos niveles año tras año (World Health Organization [WHO], 2001). Así mismo, entre las distintas partes del grano, las FUM se acumulan en distintas cantidades, por ej., el germen (embrión) y el salvado poseen niveles más elevados que en el endospermo, repercutiendo de esta manera en los niveles de esta micotoxina que van a tener los productos derivados de las distintas partes del mismo (USFDA, 2001). Además, se debe considerar que no es fácil determinar con exactitud la toxicidad de los compuestos debido a la gran cantidad de variables y a las interacciones establecidas entre ellas, que afectan a este valor, en especial cuando se trata de una exposición crónica al tóxico (USFDA, 2001; Gimeno, 2009; Smith *et al.*, 2016)

No obstante, según Smith y colaboradores (2016), la Comisión Europea (un Organismo de la Unión Europea) estableció los límites de concentración máxima (ML, del inglés: *maximum level*) considerados seguros para la salud, para FUM (FB1 + FB2) de 0,2 mg/Kg de alimento, para alimentos procesados a base de maíz y alimentos destinados a bebés y niños; hasta 4,0 mg/kg de granos de maíz no procesado destinado a consumo humano.

Según la revisión hecha por IARC (2002, pp. 310-319) los valores permitidos y considerados como seguros según la FDA de Estados Unidos para la concentración FUM (FB1 + FB2 + FB3) en

maíz o productos derivados, destinados a consumo humano, varía entre 2 y 4 mg/kg de alimento. Y por último, valores de MLs propuestos por la Organización Mundial de la Salud (**WHO, 2011**) son: para granos de maíz no procesados de 5 mg/Kg, para harinas de maíz y maíz para pochoclo de 2 mg/Kg, para alimentos de bebés a base de maíz de 0,5 mg/Kg y para maíz destinado a cereales de desayuno, bocadillos y papa fritas de 1 mg/kg.

En Argentina, se midieron valores de concentración de 1.972, 939 y 739 μg de FB1 por kg de maíz (campañas 2006/07, 2007/08 y 2008/09, respectivamente). Y de 3.246 muestras de grano de maíz recolectadas en diferentes regiones, el 90 y 100% estaban contaminadas con FUMs (FB1 + FB2), con una concentración de entre 1.773 a 9.093 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para maíz recién cosechado (**Carmona & Scandiani, 2011**).

Como la exposición está en función tanto del grado de contaminación como del hábito de alimentación, ciertas comunidades rurales de países en vías de desarrollo pueden exceder la Ingesta Diaria Tolerable Máxima Provisional o PMTDI (*provisional maximum tolerable daily intake*) de 2 μg por Kg de peso corporal por día ($\mu\text{g}/\text{Kg pc}/\text{día}$) de FUMs (FB1 + FB2 + FB3; **WHO, 2011**), especialmente cuando la dieta típica es elevada en cantidad de maíz. Por ej. la ingesta estimada, en $\mu\text{g}/\text{Kg pc}/\text{día}$, en varias regiones de África varía desde $< 0,1$ en Bomet, Kenya, hasta 26 en Tanzania. En Latinoamérica, la estimación para Guatemala es de 3,5-15,5 según los registros hasta el 2010; y de 0,2 hasta 23 en reportes obtenidos hasta el 2014 (Wild *et al.*, 2015). En Argentina según la estimación de la GEMS/*Food regional diet (Global Environment Monitoring System - Food Contamination Monitoring and Assessment Programme)*, sobre el consumo de FB1, es de 0,2 $\mu\text{g}/\text{Kg pc}/\text{día}$, en EE.UU. 0,03 y en Canadá 0,02 (**WHO, 2001**).

Oxilipinas vegetales

Se conocen con el nombre de oxilipina a todo compuesto que deriva inicialmente de una oxigenación de un ácido graso poliinsaturado (PUFA: *polyunsaturated fatty acid*), ya sea por catálisis enzimática (lipooxigenasas, α -dioxigenasas, ciclooxigenasas y monooxigenasas P450) o por reacciones químicas no enzimáticas (autoperoxidación lipídica; **Mosblech *et al.*, 2009**; **Fagali, 2011**; **Griffiths, 2015**); y se las ha identificado en todos los grupos de organismos estudiados: animales (eicosanoides: prostaglandinas y leucotrienos; **Funk, 2001**; **Schneider *et al.*, 2007**), angiospermas, briofitas, algas (**Andreou *et al.*, 2009**), hongos (**Brodhun & Feussner, 2011**) y bacterias (**Porta & Rocha-Sosa, 2001**).

Las funciones que desempeñan las oxilipinas vegetales son tan amplia como su diversidad estructural, así, además de ser señalizadores químicos intra- e inter-celulares, y sistémicos (fitohormonas), están relacionados con los sistemas de defensas ante microorganismos patógenos, evitando su proliferación y/o germinación de sus esporas (**Prost *et al.*, 2005**; **Griffiths, 2015**).

Vía Lipoxigenasas (LOXs).

La concatenación de reacciones químicas iniciadas en la oxidación del PUFA catalizado por las LOXs, hasta originar los productos finales, pasando por todos los metabolitos intermediarios (oxilipinas), se conoce como vía de la lipoxigenasa (**Feussner & Wasternack, 2002**).

Las LOXs poseen alta especificidad regional y espacial para la adición de oxígeno molecular (dioxigenasa) sobre el substrato (**Andreou & Feussner, 2009**; **Griffiths, 2015**), así, esta característica es utilizada como un criterio de clasificación de las isozimas LOX. Por ej. las 9- y 13-LOX vegetales son aquellas que posean alta especificidad regional para la oxigenación, respectivamente en la posición C-9 y C-13 del substrato ácido linoleico (**Andreou & Feussner, 2009**).

Otro criterio utilizado, al menos en LOX vegetales, es el porcentaje de secuencias de aminoácidos compartidos y su localización intracelular. Así, aquellas LOX exo-plastídicas que no poseen un péptido de transporte hacia el cloroplasto y que comparten más de 75% de sus secuencias, son denominadas LOX tipo 1. Mientras que aquellas endoplastídicas (con un péptido de transporte hacia el plástido) y con baja similitud de secuencias (75-35%) son de tipo 2 (**Andreou & Feussner, 2009**).

Estructura molecular y catálisis de las LOX.

Las LOXs son metaloproteínas monoméricas de unos 75 a 100KDa (**figura 1.13**) con un catión Fe no-hemínico en su sitio catalítico (grupo prostético; **Minor *et al.*, 1996**; **Andreou & Feussner, 2009**) o, excepcionalmente, un catión Mn^{++} , como se ha identificado en ciertas LOXs fúngicas (**Gaffney *et al.*, 2001**). Entre las LOXs vegetal y animal, se pueden encontrar ciertas diferencias en tamaños y secuencias aminoacídicas, pero la región del sitio catalítico y de unión a la membrana, y

el mecanismo de acción, son esencialmente iguales (**Minor et al., 1996; Naylor et al., 1998; Schneider et al., 2007**).

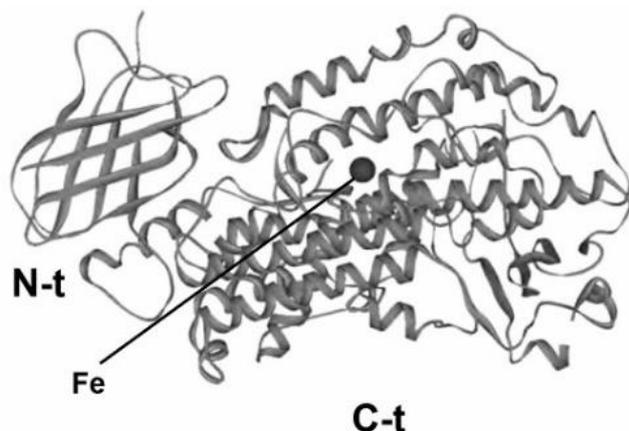


Figura 1.13. Estructura molecular LOX.

Representación estructural 3D en diagrama de cinta de la 8R-LOX de *Plexaura homomalla* Esper: Se observa la estructura barril- β tipo sándwich N-terminal (N-t). El dominio C-terminal (C-t), posee el grupo prostético: catión hierro (Fe). Las "cintas planas" representan a la estructura proteica secundaria lámina- β , las "cintas enrolladas helicoidalmente", a las α -hélices, los "hilos", a las disposiciones al azar de la cadena polipeptídica y la esfera, a Fe. Adaptado de Schneider, C. y cols. (2007).

Los análisis de difracción de rayos X de alta resolución (**figura 1.13**), entre otros, indican la presencia de dos dominios, uno pequeño N-terminal con una estructura barril- β (similar al dominio C2 de unión a membranas Ca^{++} dependiente), de mayor tamaño en las LOX vegetales que en las de mamíferos; y el otro, de mayor tamaño, C-terminal conformado por, predominantemente, estructuras α -hélices, y es quien contiene al sitio catalítico (**Minor et al., 1996; Naylor et al., 1998; Oldham et al., 2005**).

Las LOXs se caracterizan por catalizar una dioxigenación región- y estereo-específica, en mayor o menor grado de especificidad (dependiendo de la isozima), de PUFAs que tienen al menos un motivo estructural (1Z, 4Z)-pentadieno, dando lugar a una mezcla de productos hidropoxidados (**figura 1.14; Andreou & Feussner, 2009; Griffiths, 2015**). Éstos, son isómeros estructurales y difieren en la posición del grupo hidropéroxido unido al esqueleto carbonado, y a su vez, dentro de cada isómero estructural, se forman, también con especificidad o preferencia, dos tipo de isómeros ópticamente activos, denotados R y S (**Andreou & Feussner, 2009**).

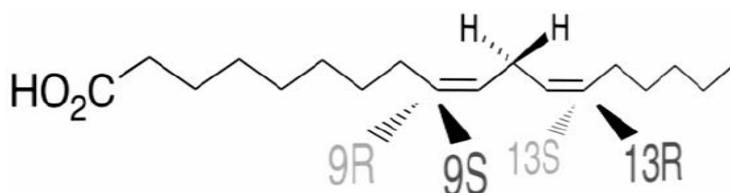


Figura 1.14. Posibles productos de catálisis LOX.

Ác. linoleico con los cuatro sitios donde se le puede adicionar oxígeno molecular mediante una catálisis de LOX. Adaptado de Schneider, C. y cols. (2007).

La lipooxigenasa vegetal EC: 1.13.11.12 se caracteriza por adicionar O_2 tanto al ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico (ác. linoleico) como al ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico (ácido linolénico), los dos PUFAs más comunes en la célula vegetal. En ambos sustratos, la oxidación ocurre con especificidad en la posición 13S. Una reacción similar la cataliza la LOX vegetal EC: 1.13.11.58 pero con mayor especificidad por la posición 9S, también en ambos tipos de sustratos (**figura 1.15; Feussner & Wasternack, 2002; base de datos IUBMB: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/**). Además de utilizar ácidos grasos libres, se ha registrado que las LOXs también actúan sobre ác.

grasos esterificados en triacilgliceroles y los que forman parte de fosfolípidos de membranas (Griffiths, 2015).

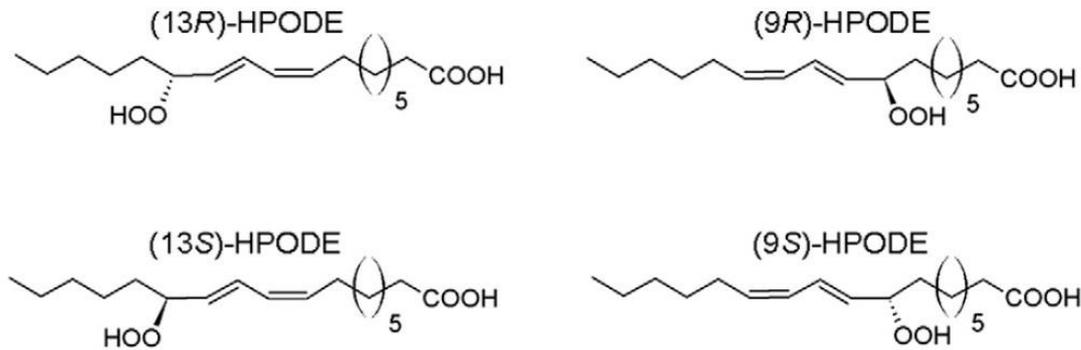


Figura 1.15. Principales productos de la catálisis de LOX vegetal (ác. hidroperoxiocetadecadienoicos).

El ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoico puede ser sustrato tanto de una 13-LOX, dando lugar a una mezcla de ácido (9Z,11E,13S)-13-hidroperoxiocetadeca-9,11-dienoico (13S-HPODE) y, su estereoisómero, 13R-HPODE; y también puede ser sustrato de una 9-LOX, dando origen a los productos ácido (9S,10E,12Z)-9-hidroperoxiocetadeca-10,12-dienoico (9S-HPODE) y, su estereoisómero, 9R-HPODE. Adaptado de Andreou, A. y Feussner, I. (2009).

Ramificaciones de la vía LOX.

Una primera división del metabolismo de las LOX vegetal se puede hacer en base a los dos isómeros estructurales originados por dicha actividad enzimática, reconociéndose el metabolismo de los ácidos grasos 9- y 13- hidroperoxidados, o metabolismo 9- y 13-LOX, respectivamente (figura 1.16).

Vía LOX - AOS: En esta ramificación de la vía LOX interviene la enzima Aleno Oxido Sintasa (AOS) quien forma parte de ruta de producción de jasmonatos, puntualmente cuando el sustrato es un ácido 13-hidroperoxiocetadecatrienoico (13-HPOTE o 13-HPOT, producto de la dioxigenación de un ác. linoléico, 18:3, por una 13-LOX). Entre los jasmonatos se hallan importantes moléculas señalizadores como la fitohormona ácido jasmónico (AJ) y sus precursores y derivados (Hughes *et al.*, 2009). Otro PUFA precursor de esta vía de producción de jasmonatos es el 16:3 (Schaller & Stintzi 2008).

La vía de síntesis de jasmonatos es altamente conservada en todos los organismos del reino vegetal (Hughes *et al.*, 2009) y las primeras etapas ocurren dentro de los cloroplastos (figura 1.17), y el metabolito 12-OPDA (ác. 12-oxofitodienoico), primer miembro de la familia de los jasmonatos y con actividad señalizador, es transportado hacia los peroxisoma para culminar con la formación del AJ (Schaller & Stintzi 2008; Hughes *et al.*, 2009), metil-jasmonato (MJ) y otros compuestos conjugados con AJ, como por ej. distintos aminoácidos, formando los respectivos jasmoniles (Jasmonil-Ala o AJ-Ala, AJ-Ile, AJ-Leu, etc.) y metil jasmonatos volátiles (Hughes *et al.*, 2009).

Las funciones atribuidas han sido numerosas, tanto en el desarrollo vegetal como resistencia ante estrés biótico (ataque de insectos, hongos y bacterias), así como respuesta al estrés físico. Tiene participación en vías de señalización tanto local como sistémicas vía floema (Browse, 2005; Schaller

& Stintzi 2008). También los jasmonatos están implicados en la comunicación planta-planta intraespecífica ante la exposición a radiación UV-C (Xu *et al.*, 2016) e interespecífica (Farmer & Ryan, 1990), con la función de la estimulación a la activación de sistemas de defensas en las receptoras.

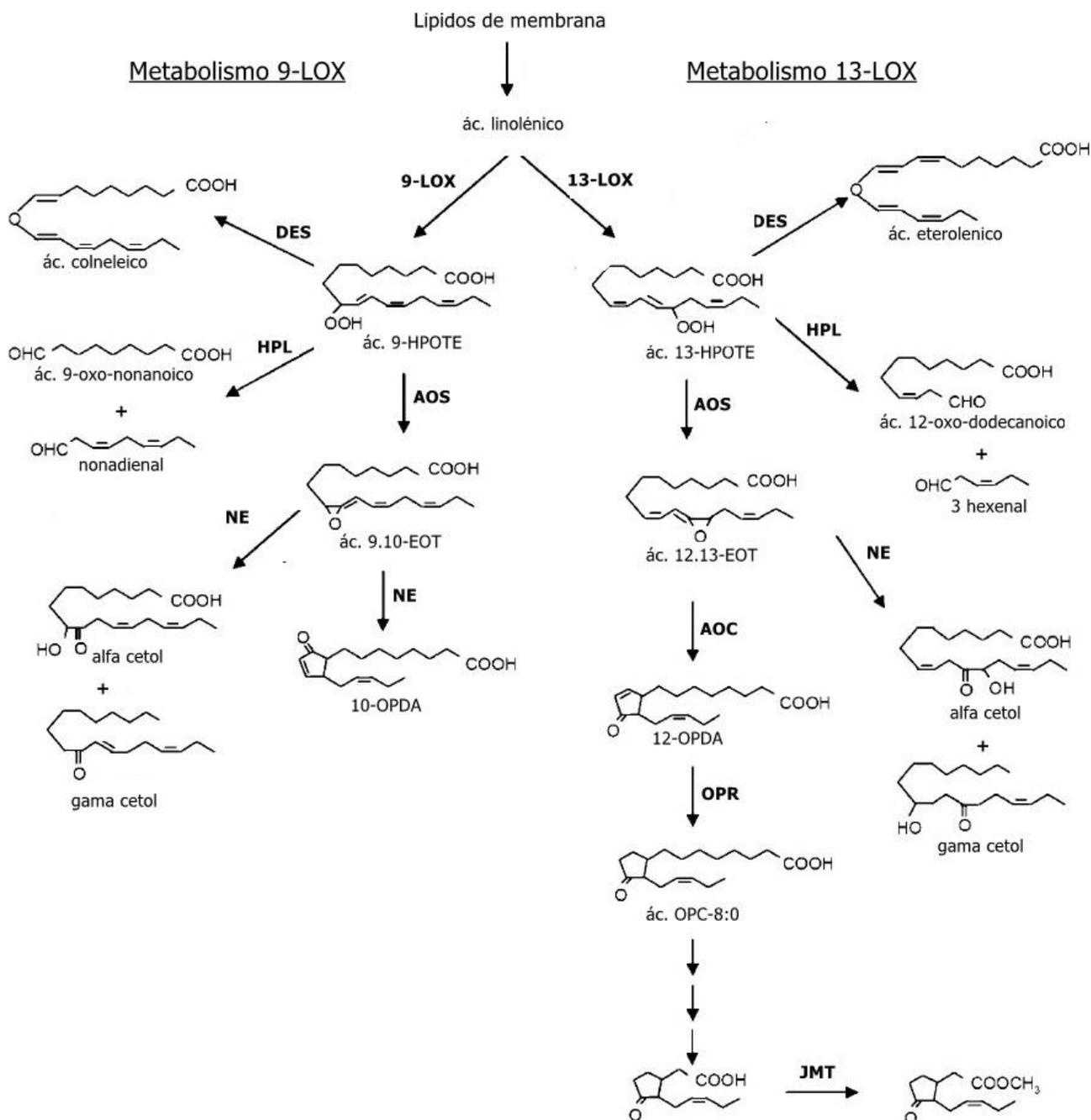


Figura 1.16. Metabolismo de las LOX para el ácido linolénico como sustrato
 HPOT: ácido hidroperoxi-(10E,12Z,15Z)-octadecatrienoico; AOS: Allen Oxido Syntasa; AOC: Allen Oxido Ciclasa; HPL: Hidroperoxido Liasa; DES: Divinil Eter Sintasa; OPR: Oxofitodienoato Reductasa; NE: reacción no enzimática; OPDA: ácido oxo-fitodienoico; EOT: ácido epoxi octadecatrienoico; OPC: ácido 8-ciclopentiloctanoico; JMT: JA carboxil metiltransferasa. Adaptado de Hughes y cols. (2009).

Por ej. Yan y colaboradores (2012) han reportado que en *Z. mays* L ssp. *mays* el AJ, ya sea de manera directa o indirecta, promueve la senescencia foliar, está implicado en la determinación del sexo masculino, regula la pigmentación a través de la biosíntesis de antocianinas en diversos tejidos,

es esencial para la inmunidad contra los fitopatógenos *Pythium sp* (Yan *et al.*, 2012) y *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Christensen *et al.*, 2014), etc. Otros investigadores han demostrado que el metiljasmonato es una molécula señal transportada por el aire que induce a las plantas vecinas, tanto de la misma como diferente especie, a la acumulación de proteínas defensivas (Farmer & Ryan, 1990).

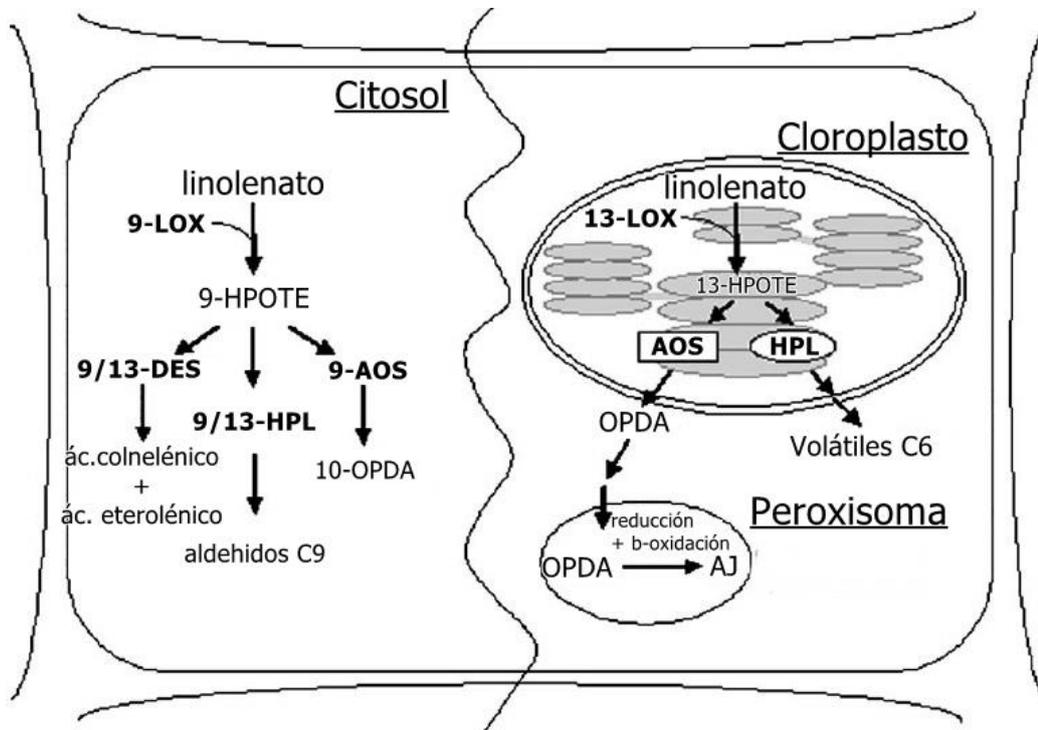


Figura 1.17. Compartimentación de la vía metabólica LOX en células vegetales. 9- y 13-LOX: 9- y 13-lipoxigenasa. 9- y 13-HPOTE: ácido 9- y 13-hidroperoxi-octadecatrienoico. 9-AOS: 9-Allen Oxido Sintasa. 9/13-HPL: 9/13-Hidroperoxido Liasa. 9/13-DES: 9/13-Divinil Eter Sintasa. OPDA: ácido oxo-fitodienoico. JA: ácido jasmónico. Adaptado de Hughes y cols. (2009).

La 9-AOS es específica para el ácido 9-HPOT(E), y al parecer no es muy frecuente entre los vegetales, por ej. ha sido identificada en tomate, papa y una especie de petunia (Hughes *et al.*, 2009) y en maíz (Christensen *et al.*, 2015). Los productos de la 9-AOS, resultan ser isómeros posicionales del jasmonato 12-OPDA: el 10-OPDA (ácido 10-oxo-11-phytodienoico y el 10-OPEA (ácido 10-oxo-11-phytoenoico), según el sustrato sea un ácido graso 9-hidroperoxidado proveniente de un 18:2 o 18:3, respectivamente (Hughes *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2015). Tanto el 10-OPDA, como el 10-OPEA son potentes fitotóxicos que inhiben considerablemente el crecimiento de *A. flavus* Link. y *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (funciona como fitoalexinas) mediando una respuesta local (Christensen *et al.*, 2015).

Las fitoalexinas son una gran familia heterogénea de compuestos antimicrobianos, derivados principalmente de la vía de los fenilpropanoides, sesqui- y diterpenoides, poliacetilenos, fenantrenos, etc. que se caracterizan por presentarse en una alta tasa de biosíntesis en aquellas células vecinas inmediatas a una infección en un tejido vegetal, impidiendo de esta manera la proliferación del patógeno hacia las partes sanas del mismo tejido. Las fitoalexinas evitan la expansión de una infección (García-Mateos & Pérez-Leal 2003). En maíz, las 10-OPDA y 10-OPEA, son producto del metabolismo 9-LOX, pero la mutación de las *ZmLOX3*, 4 y 5, todas codificantes de isozimas 9-LOX, no mostraron reducción en los niveles de tales productos en los tejidos, sugiriendo la participación de otras LOX en su biosíntesis (Christensen *et al.*, 2015).

Vía LOX - DES: La enzima Divinil Éter Sintasa (DES) convierte a los 9- y 13- hidroperóxidos en ác. grasos divinil éter y se ha propuesto que esta vía participa en los mecanismos de defensas locales y en algunos procesos del desarrollo de raíz en arabisopsis (**Hughes et al., 2009**). La evidencia de que participan en respuesta ante infección de patógenos proviene de que los niveles de los ác. grasos conjugados, ác. colneleico y colnelenico, así como los transcritos de DES, se acumularon en las células circundante a las infectadas (**Hughes et al., 2009; Mosblech et al., 2009**).

Vía LOX - HPL: La enzima monoxigenasa perteneciente a la subfamilia CYT74 de las Citocromos P450, como las AOS y DES, la Hidroperoxi Liasa (HPL) cataliza la escisión de los ác. grasos hidroperoxidados generando oxo-ácidos grasos y alquenaes (**Mosblech et al., 2009**).

Dependiendo de la especificidad por el sustrato, se han clasificado tres tipos de esta enzima, 9-HPL (poco frecuente), 13-HPL (exclusiva de tejidos verdes) y 9/13-HPL (de tejidos verdes y subterráneos, no fotosintéticos). Esta última utiliza ambos ácidos grasos, 9- y 13-hidroperoxidados, como sustrato (**Hughes et al., 2009; Hassan et al., 2015**).

Los productos finales de la vía 13-LOX/13-HPL/reacciones espontáneas / Alcohol Deshidrogenasas NAD-dependientes (ADH), son un grupo de aldehídos y alcoholes (éstos derivados de los aldehídos por la ADH) de 6 átomos de carbono en su esqueleto carbonado, que incluye a (2E)-hexenal, (2E)-hexenol, (3Z)-hexenal, hexanal y hexanol (**Mosblech et al., 2009; Hassan et al., 2015**). Por otro lado, la 9-HPL rinde aldehídos volátiles C9 incluyendo a cis-3-nonenal, trans-2-nonenal y oxoácidos C9 no volátiles (**Hassan et al., 2015**).

Todos estos aldehídos, alcoholes y ésteres C6/C9 saturados e insaturados, que son sintetizados por tejidos vegetativos de plantas, en especial de hojas fotosintéticas, son conocidos conjuntamente como Volátiles de Hojas Verdes (GLV: *green leaf volátiles*; **Hassan et al., 2015**)

Los GLVs son sintetizados de manera constitutiva en cantidades traza por los tejidos vegetales. Pero cuando éstos son dañados por un herbívoro o patógeno u estrés físico, se dispara la producción y emisión de dichos volátiles a la atmosfera, y al ser receptados por plantas vecinas, ejercen efectos como la activación de genes de defensa y/o secreción de compuestos defensivos (**figura 1.18**). Tales efectos son inducidos ya sea en otros órganos dentro de la misma planta (comunicación intra-planta) o en plantas vecinas (comunicación inter-planta) que a su vez pueden ser de la misma o de diferente especie (**Heil & Bueno, 2007; Piesik et al., 2011a; Hassan et al., 2015**).

Cuando un órgano de la planta sufre herbivoría por insecto o infección por hongos fitopatógenos, se dispara la producción de COVs, entre ellos GLVs y HIPVs (*Herbivore Induced Plant Volatiles*) que estimula a los mecanismos de defensas de las receptoras o la atracción de depredadores naturales de tal insecto fitófago, en una interacción tipo tritrófica. También se ha visto que la planta emite señales volátiles que atraen a parasitoides de huevos de insectos fitófagos desovados sobre sus tejidos (**figura 1.18; Piesik et al., 2011a,b; Rodriguez-Saona, 2012; Hassan et al., 2015**). Por ej. en una serie de experimentos se demostró que la infección por parte de cuatro especies de *Fusarium* en hojas de maíz, estimuló positivamente la producción de COVs, entre ellos los GLVs, terpenos y derivados de la vía del sikimato. Además plantas de maíces no infectadas, vecinas a una que sí estaba

respiración celular (Bartholomew, 1965; Wu *et al.*, 2009), permanecen con actividad basal en los embriones de maíz en su madurez fisiológica.

En el genoma de *Z. mays* L. ssp. *mays* (Poaceae) se han identificados 13 genes que codifican para isoenzimas LOX: *ZmLOX1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 (Maize Genetic and Genomic Database [MaizeGDB]: www.maizegdb.org/), cuyos productos se localizan en tejidos, órganos y compartimientos sub-celulares diferentes, por lo que sus roles fisiológicos son diferentes, y a su vez están bajo sistemas de regulación génica diferentes (Christensen *et al.*, 2013; Maschietto *et al.*, 2015). Así, en cariopsis de maíz, en su ontogenia y madurez se han identificado transcritos de *ZmLOX3*, 4, 5, 6, 8, 10, 11 y 12 (Maschietto *et al.*, 2015).

El gen *ZmLOX3* (o *cho1c.pk002.j23, cssap92*) codifica para una isozima 9-LOX que utiliza el 18:2 y 18:3 como sustrato. Se expresa en altos niveles en embriones en desarrollo y en los estados más tempranos de germinación, con respecto a otros tejidos como el mesocótilo y la raíz; teniendo un rol primordial en la germinación y en el crecimiento de la planta de maíz (Gao *et al.*, 2007). Es una enzima aprovechada por ciertos fitopatógenos en un proceso de *cross-talking* mediado por 9-oxilipinas, durante la infección de tejidos del hospedador. Así se encontró que es un gen cuya expresión es indispensable para que ciertos fitopatógenos puedan esporular y secretar micotoxinas, cuando se hallan colonizando (creciendo vegetativamente) sobre los tejidos del hospedador, como pericarpio de granos de maíz, raíces, tallos y hojas. (Gao *et al.*, 2007; Constantino *et al.*, 2013). Contrariamente, el gen *ZmLOX3* está implicado en la resistencia a la colonización y a la producción de AF por parte de *A. flavus* Link sobre los granos de maíz, tanto en condiciones de laboratorio como de campo (Gao *et al.*, 2009).

El Gen *ZmLOX4* (o *6C02F07, uat1(lox)*) es una 9-LOX y sus transcritos fueron detectados en meristemas apicales caulinares y radicales; y fue estimulado después de los 4 días de infección con *A. flavus* Link. (Maschietto *et al.*, 2015). El *ZmLOX5* (codificante de una isozima 9-LOX): sus transcritos se encontraron en los tejidos vegetativos sobre la tierra y predominantemente en los estigmas. El mismo se vio inducido en hoja ante la aplicación exógena de AJ, ácido salicílico (SA) y herbivoría por insecto (Maschietto *et al.*, 2015).

El gen *ZmLOX8* (o *ts1: tassel seed1*) codifica una 13-lipoxigenasa tipo 2 (LOX-2, es decir con péptido de transporte al cloroplasto) con participación en la determinación sexual de las flores en la inflorescencia masculina de la planta de maíz. Así se ha comprobado que, durante el desarrollo de esta inflorescencia, se expresa con un patrón oscilante induciendo o participando en la muerte celular programada del verticilo floral femenino, probablemente vía síntesis de AJ, fitohormona implicada, entre otros procesos, en el desarrollo de las flores masculinas.

En maíz, la isoforma LOX-10 (gen *ZmLOX10*) es una 13-LOX tipo 2 con especificidad por el PUFA 18:3. Es decir, posee un péptido de tránsito a cloroplasto y el producto principal es el 13-HPOTE (Nemchenko *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2013). Es la única enzima identificada en generar 13S-HPOTE para la síntesis de GLVs, vía 13-HPL, bajo daños mecánicos y herbivoría. Además se determinó que la producción de AJ ante un estímulo de herbivoría, así como también de los HIPVs

(en especial mono, sesqui- y di-terpenos), depende de la expresión de la *ZmLOX10*. Esto denota que dicho gen está altamente comprometido en los mecanismos de defensas inducidos por herbívoros y la inducción de plantas vecinas vía COVs (**Christensen et al., 2013**). También se observó inducción de dicho gen ante la aplicación exógena de SA, ácido abscísico (ABA), AJ (fitohormonas relacionadas a los mecanismos de defensas), aplicación de frío y sepa avirulenta de una bacteria, sugiriendo que el *ZmLOX10* participa en la adaptación del organismo frente a estrés biótico y abiótico (**Nemchenko et al., 2006**).

Además, se observó una oscilación circadiana en la biosíntesis de ARNm de *ZmLOX10* en hojas, cuyo pico de expresión coincide con los momentos de máxima actividad fotosintética (**Nemchenko et al., 2006**).

El gen *ZmLOX11*, codificante de una 13-LOX tipo 2, al igual que el producto de *ZmLOX10*, se expresa principalmente en estigma y es inducido con aplicación de ABA, sugiriendo que tal gen interviene en la defensa frente a estrés osmótico (**Nemchenko et al., 2006**).

En la búsqueda de genes LOX que medien la inmunidad del maíz frente al fitopatógeno *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, **Christensen y cols. (2014)** encontraron un novedoso gen para una isozima Linoleato 9-LOX, específico de monocotiledóneas, el gen *ZmLOX12*, quien se expresa en bajos niveles en todos los tejidos de la planta (tejidos de raíz, vegetativos, reproductivos y del grano) excepto en tejidos del mesocótilo, donde se expresa en mayor cantidad con respecto a los demás tejidos. Este gen, es sobre expresado ante daño mecánico y aplicación exógena de AJ. Los ensayos realizados con granos de maíz maduros, demostraron que el gen *ZmLOX12* inhibe tanto el desarrollo vegetativo de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, como la esporulación (desarrollo sexual) y producción de FB1. Similares resultados se observaron en ensayos sobre tallo de la planta (**Christensen et al., 2014**).

Compuestos orgánicos volátiles

En el título se puede leer “Compuestos Orgánicos Volátiles” y todavía no se ha comentado acerca de ellos. Éstos representan un gran grupo de químicos estructuralmente diversos² con un esqueleto carbonado de no más de 15 o 20 C, de peso molecular relativamente bajo (≤ 300 Da) y con elevada presión de vapor (débiles interacciones electromagnéticas intermoleculares) y poco o nada hidrosolubles (**Morath et al., 2012; Zygadlo, 2012; Lemfack et al., 2014; Bennett & Inamdar, 2015**). Son sintetizados por todos los organismos vivos conocidos, desde las arqueas (**Poulsen et al., 2013**), hasta los volátiles emitidos por las hojas de plantas bajo la acción de herbivoría (**Hassan et al., 2015**), las esencias de las flores (**Zygadlo, 2012**), y el característico olor a setas de champiñón frescas o a madera enmohecida (**Combet et al., 2006**).

² incluye alcanos alifáticos, cíclicos, heterocíclicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, aminas, terpenos, fenoles así como también compuestos halogenados y sulfurados, entre otros (**Morath et al., 2012; Bennett & Inamdar, 2015**)

Las funciones biológicas y/o ecológicas asignadas a los COVs biogénicos constituye una rama científica en pleno crecimiento (López, 2012; Lemfack *et al.*, 2014) y se ha visto que participan de muchas, y muy variadas, interacciones organismo-organismo (López, 2012; Müller *et al.*, 2013), por ej. planta-planta (Heil & Bueno, 2007), planta-herbívoros (Blande, 2016), planta-hongo (Li *et al.*, 2016), planta-parasitoides (Rodríguez-Saona, 2012) etc.

En plantas, un fenómeno ampliamente estudiado es el “*priming*” (figura 1.18) que se refiere, en este contexto, a que una planta se prepara para un posible ataque de un patógeno o un herbívoro basándose en el reconocimiento de moléculas señales transportadas por el aire (COVs), que han sido emitidas por plantas vecinas que están siendo atacadas o están sufriendo estrés. Los GLV y los HIVP cumplen este papel (Piesik *et al.*, 2011a,b; Rodríguez-Saona, 2012; Hassan *et al.*, 2015).

Implícitamente dicho, para que el *priming* sea factible, las plantas, las células vegetales, deben poseer algún tipo de receptor para tales COVs, que traduzcan la señal hacia el interior celular con el fin de regular la expresión de genes, ya sea transcripcional o post-transcripcional. Genes estos, relacionados con el metabolismo de defensas. Aunque se tienen algunos indicios de cuáles podrían ser, la información que hay al respecto es muy escasa. Por ej. la regulación de ciertos genes afectados en el *priming* están mediados por flujos de Ca⁺⁺ citoplasmático, fosforilación / desfosforilación de proteínas y especies reactivas del oxígeno (Maffei *et al.*, 2012), y según Aranda-Sicilia y cols. (2015) probablemente un tipo de receptor celular involucrado en este proceso son los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, de *G protein-coupled receptors*; Aranda-Sicilia *et al.*, 2015).

Ahora bien, las plantas, desde su estado embrionario (quizás) a la adultez, son capaces de censar COVs, probablemente gracias a la participación de receptores tipo GPCR. Pero ¿reconocen los COVs de otras especies, evolutivamente poco emparentadas? Como es de esperar hay estudios específicos sobre la capacidad de respuestas de las plantas a Compuestos Orgánicos Volátiles Fúngicos (COVFs) como concluyeron Sánchez-López, A. M y cols. (2016); pero no es una sorpresa, ya que como se ha advertido más arriba en esta sección, las comunicaciones por volátiles se pueden dar entre organismos del mismo grupo filogenético o intra-clado, así como también inter-clados, inclusive muy distantes evolutivamente (Heil & Bueno, 2007; Piesik *et al.*, 2011a,b; Rodríguez-Saona, 2012; López, 2012; Müller *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2015; Blande, 2016; Li *et al.*, 2016).

Para *Fusarium* se han detectado una serie de COVs tanto especie-específicos como comunes a varias especies del mismo género (Becker, 2013). En el caso de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, se han registrado varios COVs cuyos perfiles mostraron algunas diferencias según sean las condiciones de crecimiento y ensayo (*in vitro*, a campo, invernadero), y tipo de cepa, siendo todo modelo de estudio especificado en cada experimento. En la tabla 4, del “anexo”, se especifican los volátiles más importantes o más frecuentemente detectados en dicho anamorfo fitopatógeno. Un dato adicional es que 1-octen-3-ol, 3-octanol y 3-octanona, tres COVs emitidos por la mayoría de los hongos eumicetes, provienen de la oxidación enzimática de PUFAs vía LOXs y/o por oxidaciones espontáneas, es decir, son oxilipinas fúngicas (Megan & Evans, 2000; Combet *et al.*, 2006; Bennett & Inamdar, 2015).

PARTE 2: Actividad Metabólica de la Vía Lipoxigenasa en Cariopsis de *Zea mays* L. ssp. *mays*, en Respuesta a Compuestos Orgánicos Volátiles Emitidos por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

Introducción

Argentina se posiciona en el 3º productor (www.fao.org/faostat, 2014) y 5º exportador (Asociación de Maíz Argentina [MAIZAR], 2013) mundial de granos maíz. Sin embargo, alrededor del 40% cosechado se consume internamente, como forraje animal (90%) y en la industria (10%; MAIZAR, 2013). La cosecha y almacenaje en silo-bolsa, y posterior utilización como forraje, es la práctica más común entre los Pequeños y Medianos Productores Agropecuario y Tamberos del centro del país (Casini *et al.*, 2009; MAIZAR, 2013; Porta, 2017). De acuerdo al destino del grano, al mismo se lo puede almacenar en silo-bolsa, silos de chapa, galpones destinados a granel o en celdas (Casalins, s.f.), poseyendo cada uno problemas característicos de proliferación de insectos y de moho micotoxigénicos. En especial cuando se alteran los factores que aseguran la preservación de la calidad del grano durante el almacenado (Casini & Santajuliana, 2008; Favre, 2012). La infección con dichos hongos también ocurren a campo (Duncan & Howard, 2010), independientemente del método de almacenamiento, y en ambos casos se produce contaminación del grano con micotoxinas, por ej. en la región Pampeana y en el NOA, la tasa de infección por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y consecuente contaminación con FBs, es altísima, hasta alcanzar el 100% en algunos casos (Carmona & Scandiani, 2011; Aguaysol *et al.*, 2013; Martinez & Moschini, 2014).

La exposición a la micotoxina por parte de los animales y personas, se da naturalmente por vía oral durante la ingesta de maíz, o alimentos derivados, que están contaminados, provocando efectos fisiológicos adversos. Por ej. distintos tipos de cáncer en muchos animales (US Food and Drug Administration [USFDA], 2001), posible relación con cáncer esofágico e intestinal en personas (Pitt, 2000; IARC, 2002, pp. 309-311), y leucoencefalomalacia equina en caballos (Giannitti *et al.*, 2011), entre otros.

El Manejo Integrado de Plagas a campo y durante el almacenamiento se basa en muchos métodos complementarios para disminuir el daño causado por organismos no deseados, a expensas del uso de químicos sintéticos que generalmente son perjudiciales a la salud del hombre, animal y ambiente (Casini & Santajuliana, 2008; Sarandón & Flores, 2014). Una alternativa creciente es desarrollar sistemas de Manejo de Plagas centrándose en el conocimiento de la naturaleza de las interacciones químicas entre los organismos, vía compuestos volátiles, ej. comunicación planta-planta (Farmer & Ryan, 1990; Xu *et al.*, 2016), o interacciones tri-tróficas (Piesik *et al.*, 2011a), que dan como resultado incremento de fenotipos defensivos, repelencia de herbívoros o atracción de depredadores naturales de herbívoros. Todos efectos buscados también por el hombre, para con las plagas.

Las oxilipinas vegetales, sintetizadas constitutivamente o por acción de elicitores, son conocidas por tener un rol importantísimo en las defensas de las plantas frente a herbívoros y patógenos, ya sea por acción directa o indirecta (García-Mateos & Pérez-Leal 2003; Prost *et al.*, 2005; Griffiths, 2015). Tales moléculas son sintetizadas inicialmente por acción de ciertas oxigenasas de ácidos grasos poliinsaturados, como las lipoxigenasas (Andreou & Feussner, 2009; Griffiths, 2015).

Teniendo presente que dentro del silo coexisten cariopsis, insectos, bacterias y hongos filamentosos, las interacciones establecidas pueden ser numerosísimas, inclusive aquellas mediadas por químicos transportados por el aire (Herrera *et al.*, 2015; Zunino *et al.*, 2015); y con el afán de dilucidar las posibles comunicaciones interespecíficas grano - hongo patógeno, se gesta el presente trabajo. Éste, enmarcado en la Tesina de Grado de la carrera Cs. Biológicas, de la FCEFyN, UNC, pretende arrojar luz sobre la naturaleza de una posible interacción mediada por COVs entre *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y cariopses maduros de *Zea mays* L. ssp. *mays*, en condiciones de almacenamiento.

Este conocimiento nos aportaría una valiosa herramienta para posteriores desarrollos de tecnologías, métodos de control o manejo de plagas, que no comprometan la integridad de la salud animal y humana, y permitan la reducción de aplicación de pesticidas sintéticos.

Hipótesis

En condiciones de almacenamiento, los COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg inducen la activación de la vía lipoxigenasa en cariopsis de *Zea mays* L. ssp. *mays* (maíz) con emisión de COVs antifúngico.

Objetivos

Objetivo general.

Aportar nuevos conocimientos sobre la respuesta de lipoxigenasas de cariopsis de *Z. mays* L. ssp. *mays* maduros, expuestos a COVs de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, y a su vez el efecto que poseen los COVs emitidos por el propio cariopsis "acondicionado" sobre el mismo desarrollo fúngico, para desarrollar futuras técnicas de manejo integrado de plagas en granos almacenados, a expensa del uso de pesticidas artificiales con efectos tóxicos a personas y animales.

Objetivos específicos.

- I. Evaluar la actividad lipoxigenasa de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.
- II. Evaluar el perfil polipeptídico de albúminas y globulinas de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

- III. Evaluar el efecto de los COVs emitidos por cariopsis de maíz acondicionados sobre el crecimiento vegetativo de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

Materiales y métodos

i. Obtención de organismos estudiados.

Cariopsis de *Zea mays* L. ssp *mays*: Por cuestiones de accesibilidad y por su gran utilización en el centro del país, en el presente trabajo se emplearon granos de *Zea mays* L. ssp *mays* (Poaceae), variedad AX887-HCL-MG de Nidera S.A.[®]. Los mismos fueron facilitados por la Dra. María José Martínez, Coordinadora del Proyecto Cereales, desde el programa de mejoramiento de la Estación Experimental Manfredi (INTA) temporada 2015/16. El material se conservó en envases plásticos cerrados y secos, a una temperatura de -40 °C y una humedad relativa de 70 ± 5%. Este híbrido se caracteriza por ser resistente a la “roya” y “tizón” del maíz, tolerante a imidazolinonas y resistente al lepidóptero “barrenador de tallo” *Diatraea saccharalis* Fabricius (Salinas, s.f.; Nidera SA, s.f.). Cabe destacar que los cariopsis estaban en su madurez fisiológica.

Organismo fúngico: Se utilizó cepa micotoxicogénica *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg M3125 aislada originalmente de maíces de California, USA (Leslie *et al.*, 1992); proporcionada por el Dr. Robert Proctor, (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, United States).

ii. Incubación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

A 20g de cariopsis de maíz esterilizados (en autoclave con 6,5ml de agua destilada por 20min a 120°C., en Erlenmeyer con tapón de gaza), se los utilizó como substrato biológico para el desarrollo de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg a fin de simular la infección fúngica de los granos de maíz en condiciones de almacenamiento. La precaución de utilizar material biológico como fuente de nutrientes y matriz de crecimiento del fitopatógeno es para no generar una posible alteración del perfil de COV (o al menos, no alterarlo groseramente) con respecto al emitido en condiciones reales a campo, ya que los perfiles de COVs son alterados con las condiciones ambientales/nutricionales del hongo (Bartelt & Wicklow, 1999; Rizzi, 2009; Becker *et al.*, 2014).

La esterilización con autoclave del maíz asegura de que el embrión este muerto durante el experimento, un factor clave para que no emita COVs producto de su propio metabolismo, que podrían generar conclusiones erróneas sobre los resultados obtenidos. El interés en este trabajo se centra en la respuesta que puede generar los COVs fúngicos, y no los COV de maíz.

El inóculo de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg que se utilizó fue un fragmento de micelio vegetativo de 7 días de crecimiento en una placa de Petri (de 9cm de diámetro) con medio de cultivo sintético Czapek-Dox-Agar (CDA), con oscuridad continua y a 28 ± 5 °C. Este fragmento de micelio se obtuvo cortando una sección de 1cm² de medio sintético (“taquitos”) de la periferia de la colonia

como indica la **figura 2.1, A**. Éstos se colocaron tres por cada Erlenmeyer con el maíz en su interior y se lo dejó incubar por 7 días, en oscuridad continua y a 28 ± 5 °C a fin de que infecten todo el material (**Figura 2.1, B y C**). Para los controles, se procedió de la misma manera a excepción de que los maíces no fueron inoculados con nada: maíces autoclavados sin más. Estos hongos creciendo sobre maíz son los emisores de COV

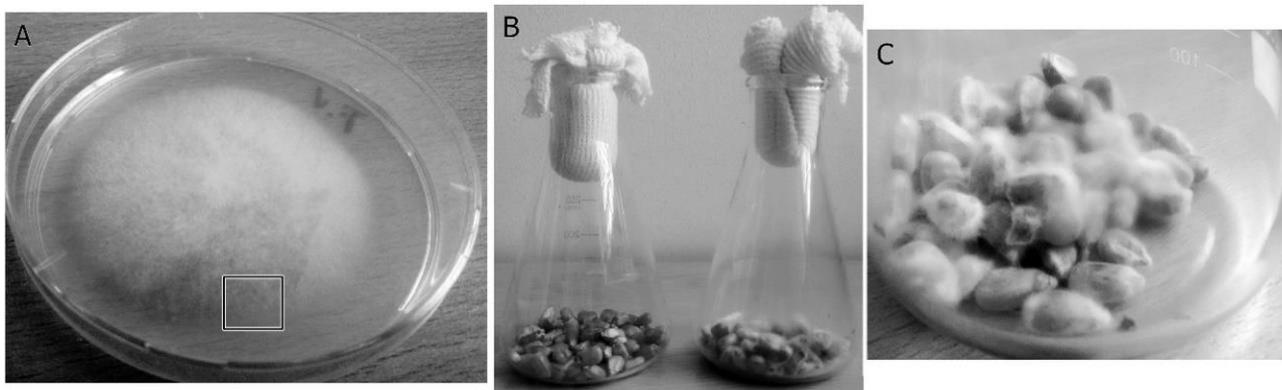


Figura 2.1. Incubación de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

A) Placa de Petri (9cm diámetro) con una colonia vegetativa de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg creciendo sobre medio sintético Czapek-Dox Agar 1%, en oscuridad continua a 28 ± 5 °C. La sección cuadrangular indica la medida aproximada de “taquito” que se extrae para inocular a los granos. B) Erlenmeyer con 20g de granos de *Zea mays* L. ssp *mays* (Poaceae) CV: AX887-HCL-MG autoclavados sin (izquierda) y con (derecha) inóculos fúngicos (control y tratamiento, respectivamente), después de 7 días de incubación en oscuridad continua a 28 ± 5 °C. C) Zoom a los granos del Erlenmeyer de la derecha en la figura B. Autoría.

iii. Acondicionamiento de granos de maíz por COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

Para el acondicionamiento (o inducción, o tratamiento, términos usados como sinónimos para el presente) de los cariopsis maíz, se los expuso a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg creciendo sobre el mismo tipo de substrato biológico. Para esto, se procedió según **Trematerra, P. y cols. (2013)** y **Xu, W. y cols. (2016)** en sendos trabajos investigativos, con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó una “cámara de inducción” que consiste en un contenedor de plástico (20 x 30 x 10cm) con tapa, opaco a la luz y dividido internamente por un tabique que delimita dos compartimientos, “A” y “B” (**figura 2.2**). Ambos compartimientos están comunicados entre sí por una rendija formada entre el extremo superior del tabique y la cara interior de la tapa (ver “anexo,” **figura 2** para orientarse en el experimento).

Sobre la base de una cápsula de Petri sin tapa, en “A”, se colocó los 20g de cariopsis de maíz inoculado o infectado (**ítem ii**), y en otra cápsula en “B” se colocaron 20g granos de maíces vivos y sanos, con el fin de que queden expuestos a los COVs provenientes de “A” (granos inducidos: unidades o “tratados”). A este sistema se lo deja a temperatura ambiente, en el interior del laboratorio, al resguardo de la luz, por una duración de 7 días. Cabe destacar que no se destapa en ningún momento dentro del período de inducción. Como control se realizó exactamente el mismo

procedimiento, sólo que en “A” se colocaron maíces autoclavados no inoculados con hongos, como se ha descrito en el ítem ii.

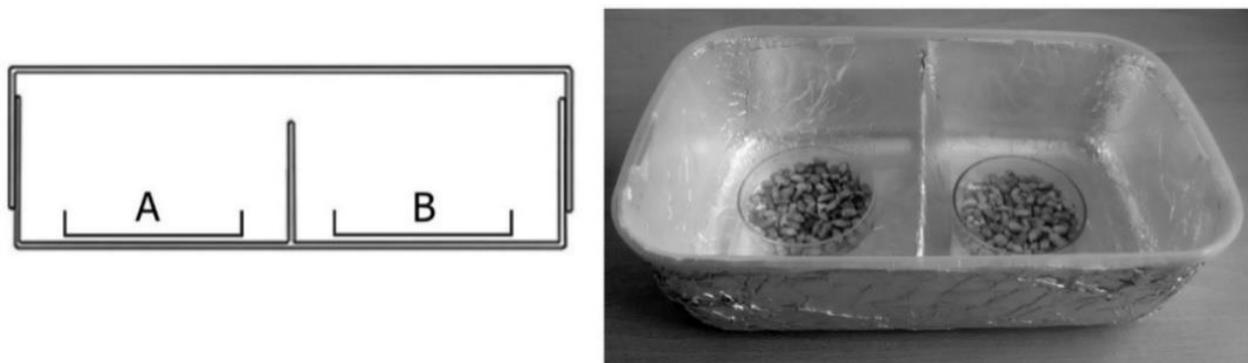


Figura 2.2. Cámara de Inducción.

Esquema en vista de perfil (izquierda) y fotografía (derecha) de la cámara de inducción utilizada en el presente trabajo. Autoría.

iv. Purificación parcial de las LOXs de cariopsis de *Zea mays* L. ssp *mays*.

Para la evaluación de la actividad lipoxigenasa (LOX) de maíces se prosiguió según el trabajo hecho por Gardner y Weisleder (1970), con algunas modificaciones. Para el presente se tomaron aprox. 20g de cariopsis acondicionados (ítems iii), se congelaron con $N_2(l)$ y se los trituró hasta un polvo fino con un molinillo para tal fin, con el objetivo de aumentar al máximo la superficie de contacto entre el grano y el *buffer* de Extracción de Sodio-Fosfato 0,1M, pH 7,0 (*Buffer E*; proporción 1:2P/V de molienda y *buffer*). Para evitar la proteólisis enzimática durante este proceso, se le adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en una proporción $1,25 \cdot 10^{-3}:1$ V/V (PMSF : *buffer E*). Este inhibidor de proteasas no tiene efecto inhibitorio o sinérgico significativo, sobre la actividad enzimática de las LOX (Theerakulkait & Barrett, 1995).

Para maximizar la extracción se agitó esta mezcla durante 60min. en un agitador orbital. Luego se filtró la fracción acuosa y se la centrifugó durante 15 min. a 8.000 revoluciones por minuto (rpm) entre 0 y 4°C. Este procedimiento permite sedimentar la gran proporción de almidón y restos de tejidos del cariopsis, y recuperar un volumen de sobrenadante, V_s , el que será sometido a una sedimentación proteica por precipitación salina o *salting out*. Para esto se le agregó $(NH_4)_2SO_4(s)$ a una concentración aproximada del 50% de la concentración de saturación en agua a 0°C (Theerakulkait & Barrett, 1995) durante 60min. y 0-4°C. Estas condiciones favorecen la precipitación de las fracciones proteicas correspondientes a las albúminas y globulinas, con masas que oscilan entre 65 y 150 KDa, respectivamente (Blanco & Blanco, 2011, cap. 3), fracción en la cual se encuentra nuestra enzima de interés, las LOX, cuya masa estimada para las isoenzimas aisladas de embriones de maíz es de $90,5 \pm 0,3$ KDa (Theerakulkait & Barrett, 1994).

Luego a las muestras se las volvió a centrifugar durante 15 min. a 8.000 rpm, entre 0 y 4°C. Se descartó el sobrenadante y al precipitado obtenido se lo diluyó con una solución amortiguadora (*buffer R*: Sodio-Fosfato, 0,2M, pH 7,0) a un volumen equivalente a $\frac{1}{4} V_s$. El exceso de bisulfato de amonio se extrajo mediante diálisis, que se realizó con una membrana de poro 10.000Da y *buffer R*

durante 18 horas. Estas muestras dializadas van a ser la fuente de LOX parcialmente purificadas, de ahora en adelante simplemente Extracto Enzimático (EE).

v. Cuantificación de proteínas solubles.

Las Proteínas Totales Solubles (PTS) en el *buffer* R o presentes en el EE corresponden a la fracción proteica de albúminas y globulinas del cariopsis de maíz y su concentración se determinó mediante el método espectroscópico descrito por **Bradford, M. M. (1976)** con algunas modificaciones. Para ello se empleó una microplaca de 96 pocillos (Greiner CELLSTAR®, F-Bottom) en donde se realizó por un lado, diluciones seriada de albúmina bovina (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 mg/ml) para construir una curva patrón (tres réplicas por concentración) y por otro, diluciones seriadas, con tres replicas, de las muestras (EE sin diluir, diluido al doble, al cuádruple y al óctuple). Luego a 5µl de la muestra/albúmina bovina se la mezcló con 250 µl del reactivo *Coomassie Brilliant Blue G-250* (reactivo de Bradford); los blanco se realizaron con 5µl de *buffer* R y 250 µl de reactivo de Bradford. Se midió absorbancia con un espectrofotómetro para microplacas a una longitud de onda de 595nm.

vi. Medición de la actividad lipoxigenasa.

Preparación de la solución madre del sustrato: El sustrato que se utilizó para evaluar la actividad de lipoxigenasas (LOX) es el ácido linoleico (AL o 18:2^{Δ9,12}; Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 99%). Algunas de sus propiedades físicas³ útiles para posteriores cálculos son: el peso molecular: 280,4455 g/mol y densidad: 0,902 g/ml (20°C). Este compuesto es el sustrato principal de las lipoxigenasas (**Andreou & Feussner, 2009**).

La Solución Madre del Substrato (SMS), como su nombre lo indica, se utilizó como fuente del sustrato de la enzima LOX. Los tipos de compuestos que se utilizaron, así como sus proporciones y orden de adición, fue el resultado tanto de información bibliográfica, principalmente del trabajo realizado por **Theerakulkait y Barrett (1995)**, como de una serie de pruebas y ajustes experimentales. Finalmente esta solución consta de los siguientes compuestos, con sus concentraciones (expresada en concentración porcentual en volumen) y orden de agregado: a) polisorbato 20 (conocido como Tween-20): 0,400%; b) AL: 0,400%; c) Agua *Mili-Q*: 48,600%; d) Hidróxido de Sodio (0,5N): 2,000%; y e) Agua *Mili-Q*: 48,600%. El AL alcanzó una concentración final de 64,340 mM.

Debido a la baja solubilidad³ en agua del AL (1,59 mg/l) se necesita de un emulsionante para que el mismo se homogenice de manera estable en la solución acuosa, para ello se utilizó el detergente a una proporción 1:1V/V Tween-20 : AL, cantidad que no inhibe significativamente a la actividad enzimática de las LOX (**Surrey, 1964**). El propósito de agregar el hidróxido de sodio fue para clarificar la solución (**Theerakulkait & Barrett, 1994; 1995**).

³ NCBI. PubChem Compound Database; CID=5280450, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280450> (accessed Sept. 9, 2016).

Medición de la Actividad LOX: La solución que se empleó para medir la actividad de las LOX, llamada Solución de Reacción (abreviado SR), fue la utilizada por **Theerakulkait y Barrett (1995)** con ciertos ajustes: 63,05% de *Buffer R*, 18,47% de EE y 18,49% de SMS. Las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos especiales para espectrofotometría en UV (Greiner®, F-Bottom) y los volúmenes utilizados fueron: *Buffer R* = 204,6µl; EE = 59,9µl y SMS = 60µl (volumen final, V = 324,3µl).

La actividad de las LOXs se determinó espectrofotométricamente monitoreando la formación de dienos conjugados presentes en la estructura molecular de los ácidos hidroperoxi-octadecadienoicos (ác. HPOD; **Andreou & Feussner, 2009**) en función del tiempo, por 30min. a 25°C, de acuerdo al método descrito por **Grossman, S. y Zakut, R. (1979)** con algunas modificaciones. Para ello se utilizó un lector multimodo de microplacas *BioTek instrument (BioTek synergy HT)*. El pico de máxima absorción de radiación electromagnética de estos dienos conjugados corresponde a una longitud de onda, $\lambda_{\max} = 235\text{nm}$, para una concentración del ác. 13-HPOD $\leq 0,0200\text{mM}$ (**Gibian & Vandenberg, 1987**). Pero para la presente tesina se midió a 234nm ya que se ha probado que funciona muy bien (**Surrey, 1964; Grossman & Zakut, 1979; Theerakulkait & Barrett, 1995**). Cada muestra se midió por triplicado o cuadruplicado de técnica.

La cantidad de enzima activa presente y el nivel de actividad de la misma, en una preparación o extracto, se indica habitualmente en unidades internacionales: Unidad Enzimática (U). Se define ésta como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por cada minuto transcurrido de la reacción, bajo condiciones experimentales definidas (pH, temperatura, volumen de reacción, longitud de paso óptico, etc.; **Blanco & Blanco, 2011**).

$$U = \frac{\Delta a}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot d}$$

$$\begin{aligned} & [\text{min}^{-1} \cdot ((\text{mM} \cdot \text{cm})^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{ml}] \\ & \quad \quad \quad [\text{min}^{-1} \cdot \text{mM} \cdot \text{ml}] \\ & [\text{min}^{-1} \cdot 10^{-3} \cdot \text{mol} \cdot (1000\text{ml})^{-1} \cdot \text{ml}] \\ & \quad \quad \quad [\text{min}^{-1} \cdot 10^{-3} \cdot \text{mol} \cdot 10^{-3}] \\ & \quad \quad \quad [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}] \end{aligned}$$

Δa : cambio instantáneo de la absorbancia; Δt : cambio instantáneo del tiempo [min]; ϵ : coeficiente de extinción molar $[(\text{mM} \cdot \text{cm})^{-1}]$; d : longitud del paso óptico [cm]; V : volumen de reacción [ml].

Para el presente estudio se utilizaron los valores propios del sistema de medición, así $\epsilon_{(\text{HPOD})} = 23.000 \pm 560 [(\text{mM} \cdot \text{cm})^{-1}]$ (**Gibian & Vandenberg, 1987; Theerakulkait & Barrett, 1995**), $d = 0,901\text{cm}$ (**figura 2.3**) y $V = 0,3243\text{ml}$.

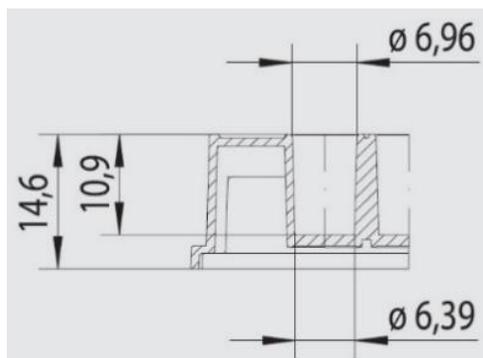


Figura 2.3. Dimensiones de un pocillo y cálculo de d .

Detalles y medidas de un pocillo de microplaca de fondo plano Greiner. La longitud del paso óptico (\emptyset interno promedio del pocillo = 6,77mm): $d = V / \pi \cdot r^2 = 324,3\text{mm}^3 / \pi \cdot (3,385 \text{ mm})^2 = 9,01\text{mm}$. Tomado de www.milian.com/data/pdf_guides/en/guide_des_microplaques_GREINER.pdf

La Actividad Específica (EU) es una medida que expresa la pureza relativa de una enzima en un extracto o preparación, y se expresa en unidades de actividad enzimática por unidad de cantidad de proteínas totales en dicha preparación; la unidad más utilizada es [$\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})^{-1}$] (**Blanco & Blanco, 2011**).

$$EU = \frac{U}{P}$$

U: unidad enzimática [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$] y P: cantidad de proteínas [mg].

P es la cantidad de proteínas en la preparación enzimática para la medición de la actividad LOX, es decir en la SR, y se determinó de la siguiente manera:

$$P = PTS \cdot EE$$

PTS: concentración de Proteínas Totales Solubles en el EE [mg/ml]; EE: volumen del EE en la SR (0,0599ml).

Entre todos los experimentos el V, ϵ , d y EE no fueron modificados, por lo tanto fueron considerados como valores constantes para la ecuación de actividad específica. Por otro lado A y PTS fueron variables a determinar.

Debido a la baja actividad basal que tienen las LOX en los cariopsis de maíz, se definió por conveniencia, a una Unidad Enzimática Específica de LOX (EU_{LOX}) como el incremento de la absorbancia del 0,001 por min, a 234nm bajo las condiciones de ensayo definidas (**Theerakulkait & Barrett, 1995**). Por esto, se entiende que 1 EU_{LOX} equivale a una actividad cuya pendiente es de 0,001 min^{-1} . De acuerdo a esto, se puede obtener la siguiente ecuación:

$$EU_{LOX} = \frac{\left(\frac{A}{0,001}\right)}{P} \frac{V}{\epsilon \cdot d}$$

$$EU_{LOX} = \frac{A}{0,001 \cdot (PTS \cdot EE)} \frac{V}{\epsilon \cdot d}$$

$$EU_{LOX} = \frac{A}{PTS} \frac{1000 \cdot V}{EE \cdot \epsilon \cdot d}$$

$$EU_{LOX} = \frac{A}{PTS} \frac{1000 \cdot 0,3243 \text{ ml}}{0,0599 \text{ ml} \cdot 23000 (\text{mM} \cdot \text{cm})^{-1} \cdot 0,9009 \text{ cm}}$$

$$EU_{LOX} = 0,2613 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \frac{A}{PTS}$$

Los valores de las pendientes, A, fueron calculados como la diferencia absoluta entre la pendiente en bruto que tomó una muestra (A_i) y la pendiente de la SR blanco del mismo experimento (A_{blanco}): $A = (A_i - A_{\text{blanco}})$.

El blanco se preparó de la siguiente manera: Buffer R = 264,3 y SMS = 60 μl . La finalidad del blanco fue para discriminar el incremento de la absorbancia (λ_{max} : 234nm) entre la formación de dienos conjugados por un proceso denominado peroxidación lipídica no enzimática (oxidación

natural del ácido graso poliinsaturado; **Fagali, 2011**) del AL, y la formación de ác. HPOD, producto de la oxidación enzimática de las LOX (**Andreou & Feussner, 2009**).

A cada unidad experimental (20g cariopsis de maíz) le midió su EU_{LOX} por triplicado o cuadruplicado (réplicas de técnica). Naturalmente se aprecia que existe una variabilidad en las EU_{LOX} que puede deberse a una multiplicidad de factores: biológicos, físicos y químicos que forman parte de la biología del emisor de volátiles *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y del receptor *Zea mays* L. spp. *mays*, de las condiciones no controladas a lo largo de todo el experimento como durante el cultivo del hongo, infección de granos, inducción, soluciones de medición, etc. Cabe mencionar la sistematización de los procedimientos a lo largo de los ensayos y entre los ensayos.

vii. SDS-PAGE.

El extracto proteico a analizar, fue una alícuota del realizado para el análisis de la actividad LOX (ver ítems iv y “anexo”, **figura 2**). Para la evaluación del perfil polipeptídico de las albúminas y globulinas de cariopsis maduros de maíz, expuestos y no expuestos a COVs fúngicos (ver ítems ii), se procedió a la realización de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) siguiendo el método descrito por **Laemmli, U. K. (1970)**, con algunas modificaciones.

Se utilizó un sistema de electroforesis de múltiples zonas (gel heterogéneo o *buffers* discontinuos; **figura 2.4**), ya que ofrece mayor poder de resolución de las bandas proteicas que una electroforesis con gel homogéneo. Dicho sistema consta de dos geles de poliacrilamida que varían en el tamaño de poro. La primera porción, el gel concentrador (*stacking gel*), posee un tamaño de poro relativamente grande y su función es la de concentrar los polipéptidos en una banda de modo que las muestras ingresen al gel separador en forma de una banda discreta (**García Pérez, 2000**). El gel concentrador y separador se prepararon al 3 y 12,5% P/V acrilamida-bisacrilamida, respectivamente según la metodología empleada por **Wu, X. y cols. (2011)**.

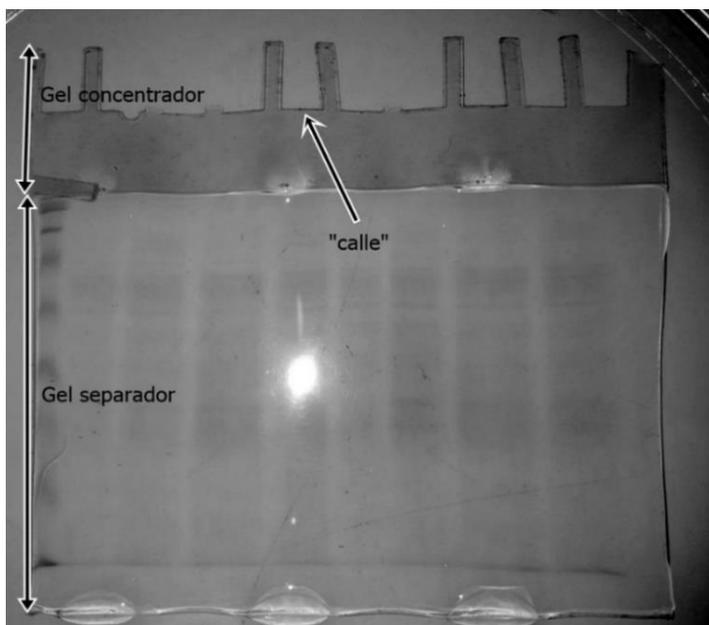


Figura 2.4. Gel electroforético de poliacrilamida. Fotografía de un gel fuera del molde (dos placas de vidrio separadas 1,5 mm de espesor) y después de haberse realizado la corrida electroforética, teñido y decolorado. Autoría.

El tratamiento conjunto con SDS (dodecilsulfato sódico: un detergente aniónico desnaturizante), β -mercaptoetanol (β -Me, un agente reductor de puentes bisulfuros) y calor, desnaturiza por completo a las proteínas de tal modo que la longitud de la cadena (proporcional al peso molecular), es la única que determina la velocidad de migración de una banda en una SDS-PAGE (García Pérez, 2000). La migración de los complejos SDS-polipéptido hacia al ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular ($\log PM$), por lo que es factible determinar el peso molecular aproximado de las bandas de interés, al compararlo con una banda patrón (García Pérez, 2000).

El volumen de muestra sembrado en cada calle fue de 30 μ l. Cada muestra se diluyó en *buffer* de muestra (*Buffer M*: 0,2 M Tris-HCl, 15% v/v glicerol, 2% p/v SDS, 0,2 M EDTA, 5% v/v β -Me, 0,1% p/v azul de bromofenol, pH 6,8) en una relación 2:1 V/V muestra: *buffer M*, se lo calentó a 95-100°C durante dos minutos.

Se sembró también una muestra que contiene una mezcla de proteínas con peso molecular conocido o muestra patrón (Bio-Rad, Hercules, CA, USA): aprotinina (5,7 kDa), lisosima (18,5 kDa), inhibidor de tripsina (28,4 kDa), anhidrasa carbónica (35,9 kDa), ovoalbúmina (52,9 kDa), seroalbúmina bovina (96,3 kDa), β -galactosidasa (113,5 kDa) y miosina (198 kDa).

Se utilizó un equipo electroforético "mini slab" (Cole Parmer, Dual vertical Mini-Gel Systems, Modelo 28575-00) y la corrida se realizó a 20 mA durante 3 horas continuas, empleando un "buffer de corrida": 25 mM Tris-HCl, 0,2 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3. El *buffer* de separación se preparó con 0,375 M Tris-HCl, 0,2% SDS, pH 8,8.

Luego, una vez terminada la corrida electroforética, los geles se fijaron en ácido acético al 25% v/v durante 45min, y se colorearon con *Coomassie Brilliant Blue G - Colloidal*, durante 24hs. La decoloración se realizó con solución acuosa de etanol (30% v/v) y ácido acético (10% v/v). Una vez terminado, los geles fueron escaneados mediante un escáner HP® *Deskjet F300 All-in-One series* y las imágenes en formato .jpg (calidad 2400ppp) fueron procesadas, primero por *PhotoScape®: Free Photo Editor* (www.photoscape.org), un software de edición de imágenes gratuito, a fin de mejorar contrastes, brillo y color, y luego con *ImaenJ 1.50I*, un software de procesamiento de imágenes de dominio público desarrollado por *National Institutes of Health*, USA (www.imagej.nih.gov/ij/).

Calibración del SDS-PAGE. Se procedió a construir una curva de calibración a partir de una regresión lineal entre RF (relación de frente) y $\log(PM)$ (logaritmo del peso molecular) de cada banda patrón. La RF es la relación entre la distancia de migración de una banda proteica determinada y la distancia de migración de toda la muestra (frente de corrida). Se utilizaron los softwares *ImagenJ* para el procesamiento de imagen y determinación de RF, y *R* para el test de regresión lineal (figura 2.5).

A partir de la ecuación de la recta obtenida por regresión lineal, se pudo despejar la variable PM (peso molecular, en KDa): $PM = 10^{((RF - 1,56) / -0,68)}$, para luego poder calcular los pesos moleculares de los polipéptidos de interés. Luego, para tener en cuenta el grado de incertidumbre asociado a la

técnica, se procedió a una comparación entre el PM calculados mediante la ecuación y el PM del marcador utilizado (tabla 2.1).

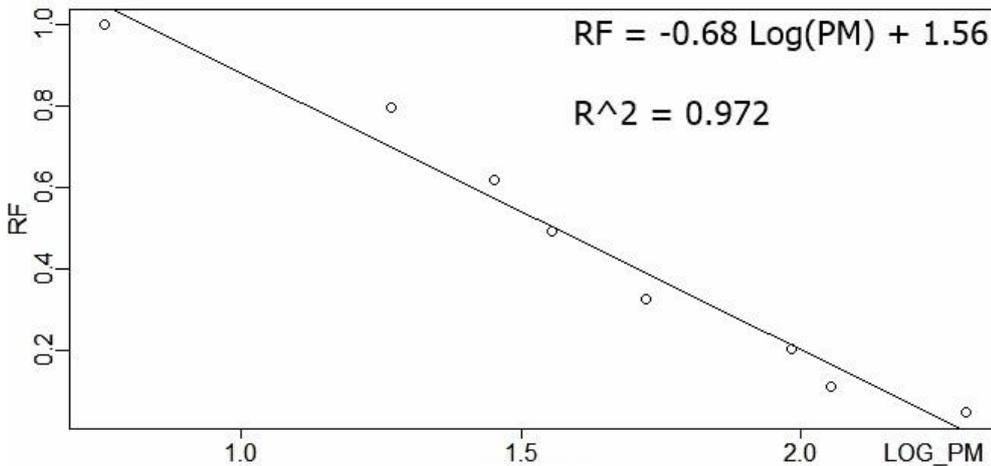


Figura 2.5. Curva de calibración y ecuación de la recta.

Regresión lineal. RF = relación de frente; PM = peso molecular [KDa].
Autoría.

Tabla 2.1.

Incertidumbre asociada a la técnica para la determinación del PM en SDS-PAGE.

Pico	RF	PM mar.	PM calc.	Diferencia abs.	Diferencia rel. (%)
1	0,05	198	168,3	29,7	15,0
2	0,11	113,5	135,0	21,5	18,9
3	0,20	96,3	98,6	2,3	2,4
4	0,33	52,9	65,0	12,1	22,9
5	0,49	35,9	37,2	1,3	3,6
6	0,62	28,4	24,1	4,3	15,2
7	0,80	18,5	13,3	5,2	28,4
8	1,00	5,7	6,7	1,0	16,9

Pico: número de pico de la calle patrón (marcador); RF: relación de frente; PM mar.: pesos moleculares de los polipéptidos marcadores [KDa]; PM calc.: pesos moleculares calculados a partir de la ecuación de la curva de calibración [KDa]. Diferencia abs.: diferencia absoluta = $(\text{PM Calc.} - \text{PM mar.})$ [KDa]; Diferencia rel.: diferencia relativa = $D. \text{ abs.} / \text{PM mar.}$. Autoría

viii. Suspensión de conidias de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

La suspensión se realizó agregando 10ml agua destilada estéril sobre colonias fúngicas vegetativas de 7 días de crecimiento sobre medio CDA en oscuridad continua a $28 \pm 5^\circ\text{C}$, agitando vigorosamente con movimientos circulares y finalmente se la extrajo con una micropipeta automática (5ml). A esta suspensión se le midió la concentración de conidias con un hemocitómetro y en los casos necesarios se ajustó la concentración deseada con agua destilada estéril.

ix. Ensayo de actividad antifúngica

Para este ensayo de actividad antifúngica sobre *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg por parte de los COVs emitidos por los maíces acondicionados (ver “anexo”, figura 2), se utilizó un sistema ideado personalmente (figura 2.6). El mismo consiste en dos bases de placa de Petri plásticas (9cm de diámetro), enfrentadas entre sí. Sobre la base de abajo, se colocó otra cápsula de Petri de menor diámetro y abierta, sobre la cual se deposita el material emisor de COVs, en ese caso, cariopsis acondicionados (tratamiento) y no acondicionados (controles). En la base de Petri de arriba, previamente se le colocó medio de cultivo sintético Czapek-Dox-Agar (CDA) y, una vez que se solidificó, en su centro se depositó una gota de 5µl de suspensión de conidias de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (concentración: 10⁴ conidias/ml). Entre las capsulas de Petri se le colocó una lámina de papel aluminio con pequeñas perforaciones en la periferia y por último se las selló con film de Parafilm M® (ver “anexo”, figura 3). Al sistema se lo colocó en oscuridad continua, a 28 ± 5 °C. El diámetro de la colonia se midió cada 24hs con un calibre (apreciación 0,05mm).

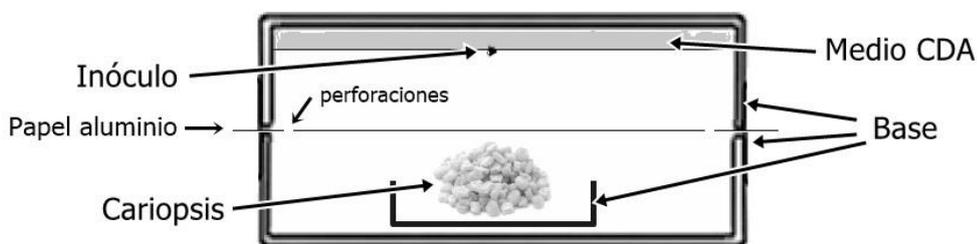


Figura 2.6. Sistema para evaluación de crecimiento fúngico bajo el estímulo de COVs emitidos por maíz. El esquema muestra los componentes del sistema. Autoría.

x. Análisis estadísticos.

Las unidades de estudio (20g cariopsis de maíz) fueron tomadas de manera aleatoria (se consideran independientes entre sí) de una muestra que proviene de una cosecha realizada en la Estación Experimental Manfredi del INTA, Córdoba, temporada 2015 (ver ítem i, en este apartado).

Para la evaluación de las diferencias en las actividades enzimáticas de lipoxigenasas (variable respuesta: EU_{LOX}), se realizó una prueba de hipótesis para la igualdad de un par de medias poblacionales independientes entre sí, o *test-t* (variable independiente cualitativas: muestras: tratamientos y controles, con 14 y 15 unidades de estudio respectivamente, repartidas en 5 bloques o réplicas experimentales). Para esta prueba se debe cumplir que la variable en estudio tenga distribución normal y que la varianzas entre ambos grupos sean similares (Barón-López & Téllez-Montiel, 2004, p. 25).

La variable en estudio (EU_{LOX}) se considera normal ya que no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula del *test* de Shapiro-Wilks (H₀: la variable tiene distribución normal; Balzarini *et al.*, 2008, p. 68), corroborado gráficamente con un gráfico Q-Q normal (Balzarini *et al.*, 2008, p. 275). También se realizó una prueba de Levene (H₀: varianzas son iguales entre sí) para la verificación del cumplimiento de otro supuesto requerido por el *test-t*, el de homogeneidad o similitud de la varianza de ambos grupos (Barón-López & Téllez-Montiel, 2004, p. 25; Balzarini *et al.*, 2008, p. 115). Para ver los resultados consultar tabla 1 del “anexo”.

Como se comentará en su respectiva sección (“**resultados**”: “**Objetivo específico I**”), durante la necesidad de transformar los valores de EU_{LOX} a EURM, se produce una desviación significativa de la normalidad en la variable respuesta del grupo de tratamiento (*test* Shapiro-Wilks para EURM tratamiento: p-valor = 0,013), pero se mantiene en controles. Por lo tanto, la aplicación del *test-t* a todo el conjunto de valores relativizados (EURM) no generaría una respuesta confiable ya que no se cumple el supuesto de normalidad. Así se realizó una prueba no paramétrica basada en la suma de rangos de las observaciones de dos muestras independientes: *test* de Wilcoxon o Mann-Whitney U (Barón-López & Téllez-Montiel, 2004, p. 25; Balzarini et al., 2008, pp. 72-74). La ventaja de la utilización de este último *test* es que no se ve afectado por el tipo de distribución que presenta la variable dependiente.

Para los objetivos II y III, las variables respuestas son área relativa del pico (AR) y diámetro de la colonia fúngica, respectivamente; y las variables independientes son controles y tratamientos (cualitativas), como se especificará en sendas secciones. En ambos casos se aplica un *test-t*.

En todos los *test* se consideró un nivel de significación de $\alpha = 0,05$ y se usaron los *software* estadísticos libres: R versión 3.3.1 (www.r-project.org) y RStudio versión 0.99.903 - © 2009-2016 (RStudio, Inc).

Resultados

Objetivo específico I: Evaluación de la actividad lipoxigenasa de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

Para el estudio de la actividad enzimática de las lipoxigenasas (EU_{LOX}) de cariopsis maduros de *Z. mays* L. ssp. *mays* que han sido expuestos a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, se ha procedido a inducir a los granos, a realizarle un extracto y medirle proteínas totales solubles y formación de ácidos HPOD en función del tiempo de reacción, como se detalla en “**materiales y métodos**” ítems **iii**, **iv**, **v** y **vi** (ver esquema experimental general en “**anexo**” **figura 2** y resultados generales en “**anexo**” **tabla 1**).

A los valores de EU_{LOX} obtenidos en cada experimento (todos los resultados se obtuvieron de 5 réplicas experimentales) se los dividió por aquel que registró el valor más alto, dentro del mismo experimento o bloque experimental. Esta relativización de los valores (EURM) se debe a que en cada experimento, el rango donde se dispersan los valores de EU_{LOX} varía hasta dos órdenes de magnitud entre el primer y último experimento. Este procedimiento entonces, si bien altera el rango de dispersión de valores (0 a 1), no modifica la relación que toman entre sí, ni la relación entre los valores del grupo de controles con los de tratamiento (**figura 2.7** y “**anexo**” **tabla 1**).

La transformación de los valores reales a relativos al mayor valor (EURM) permite hacer una prueba de hipótesis de diferencias de valores que toman los maíces acondicionados respecto a los no-acondicionados (tratamientos y controles, respectivamente), con la totalidad de los datos. Pero,

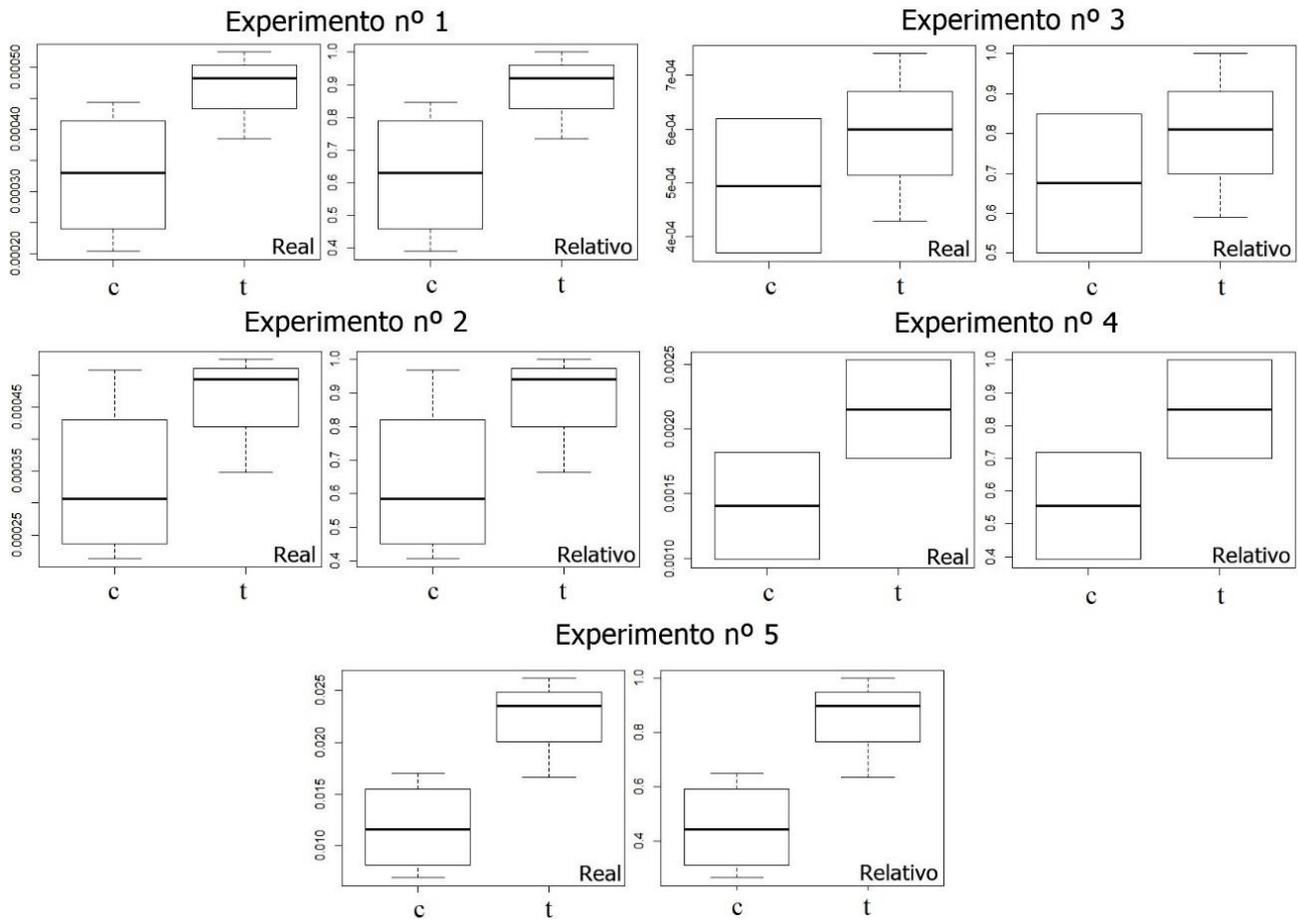


Figura 2.7. Actividad LOX medida en cada experimento.

Se observa por cada experimento dos conjuntos de gráficas de cajas, a la izquierda se representa a los valores de EU_{LOX} "reales" es decir, tal como se los calcula originalmente. A la derecha ("relativo"), se grafica a los mismos valores, pero relativizados al mayor valor de EU que toma una muestra dentro del experimento ($EURM$); de este modo, los valores de actividad LOX dentro de cada experimento, sólo pueden variar de 0 a 1. Se aprecia cómo se mantiene exactamente igual la relación existente entre tratamientos y controles, entre valores de EU y $EURM$. c = controles, t = tratamientos. Autoría.

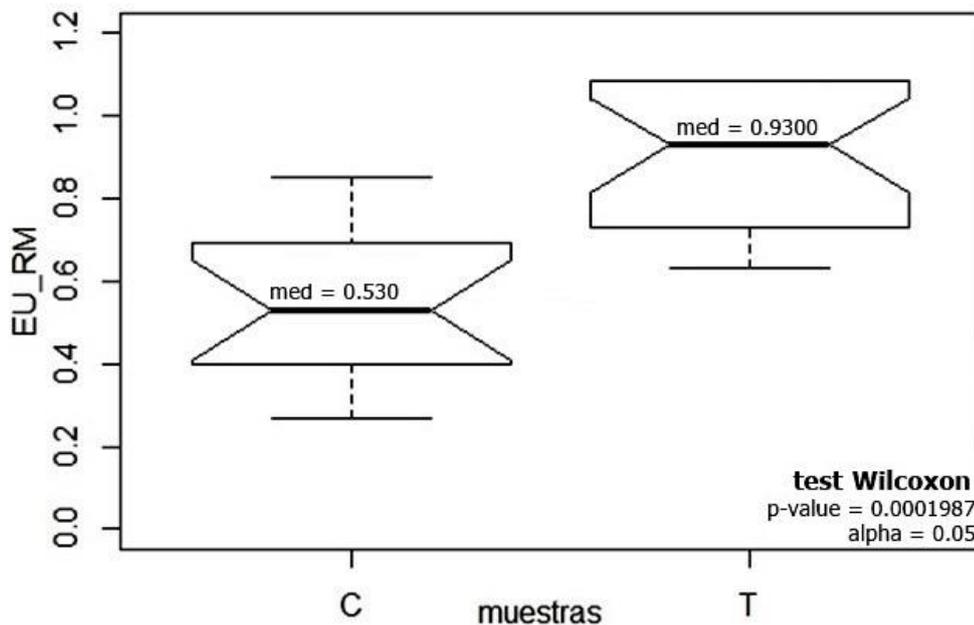


Figura 2.8. Actividad enzimática de maíces acondicionados y no acondicionados. Gráfico de cajas que representa a la actividad enzimática específica relativizada al mayor valor ($EURM$) en función de C y T. Med = mediana; C = controles; T = tratamientos. Cuña dibujada a cada lado de las cajas: cuando las cuñas de dos gráficos de caja no se traslapan, entonces las medianas son significativamente diferentes a un nivel de significación de 0,05. Como dato adicional: media aritmética para C= 0,556 y T=0,874. Autoría.

dado al incumplimiento del supuesto de normalidad para EURM en el grupo de tratamientos, el procedimiento estadístico empleado fue entonces, el *test* no paramétrico de Wilcoxon (ver “**materiales y métodos**”: ítem x). El resultado indica que hay suficiente evidencia, con un nivel de confianza del 95%, como para rechazar la hipótesis nula de igualdad de medianas de la actividad enzimática específica de tratamientos con respecto a controles (**figura 2.8**).

Es decir, que los cariopsis de *Zea mays* L. spp. *mays*, en su madurez fisiológica, expuestos a los COVs fúngicos emitidos por el fitopatógeno *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg poseen un incremento de 1,755 veces su actividad específica de lipoxigenasas con respecto a los cariopsis que no han sido expuestos.

Objetivo específico II: Evaluación del perfil polipeptídico de albúminas y globulinas de cariopsis de maíz expuestos a COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

El patrón de bandas polipeptídicas y los pesos moleculares de albúminas y globulinas de los cariopsis tratados y no tratados se aprecian en las **figuras 2.9** y **2.10**, y la **tabla 2.2** (para mayores detalles: ver “**anexo**” **figura 5** y **6**). El primer análisis cualitativo, no detecta presencia o ausencias neta de bandas polipeptídicas entre controles y tratamientos. Luego, dado el especial interés por las bandas de peso molecular coincidentes con los de las LOXs de embriones de maíz ($90,5 \pm 0,3$ KDa; **Theerakulkait & Barrett, 1994**) y LOXs vegetales en general (75 a 100 KDa; **Minor et al., 1996**), se realiza un análisis más minucioso en aquella región del gel comprendida entre el marcador 3 (96 KDa) y 4 (52 KDa). Ver **tabla 2.1** en “**materiales y métodos**” para apreciar la “incertidumbre” asociada al cálculo de los pesos moleculares de la técnica.

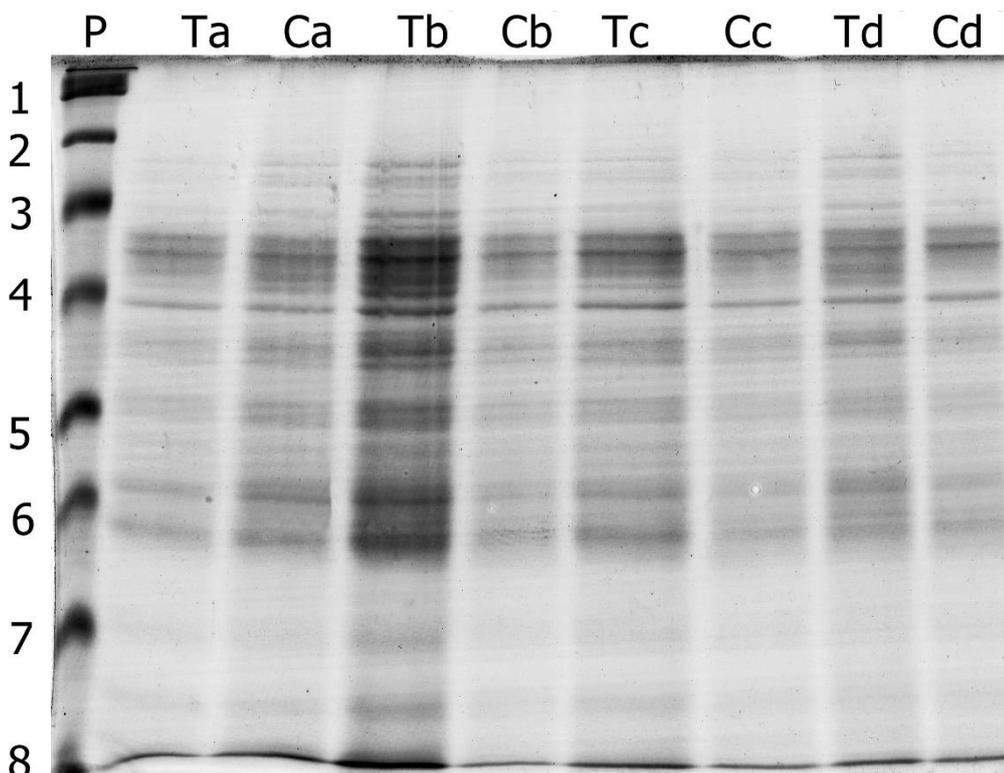


Figura 2.9. Gel electroforético revelado.

Calle P: patrón de pesos moleculares; calles T-a, -b, -c y -d = replicas biológicas de tratamientos; calles C-a, -b, -c y -d: replicas biológicas de controles. Autoría.

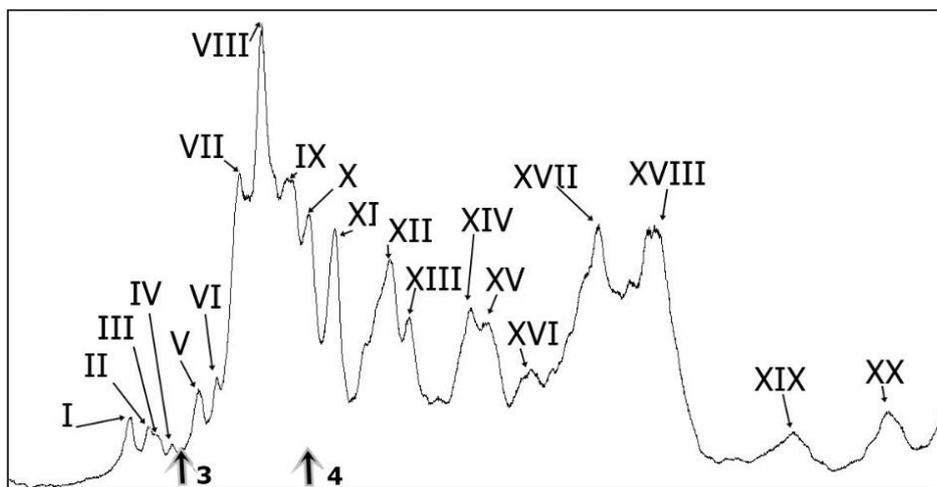


Figura 2.10. Perfil polipeptídico. Se muestra el perfil de intensidades de tinción de una calle como ej. y se identifican los picos más importantes con números romanos. Las flechas indican la posición del marcador 3 y 4. Autoría.

Pico	RF	PM calculado	Pico	RF	PM calculado
I	0,15	120,0	XI	0,36	57,0
II	0,17	111,7	XII	0,42	46,4
III	0,18	108,6	XIII	0,44	43,3
IV	0,19	102,3	XIV	0,50	34,9
V	0,22	93,8	XV	0,52	32,5
VI	0,24	87,3	XVI	0,56	27,8
VII	0,26	80,5	XVII	0,63	21,8
VIII	0,28	74,2	XVIII	0,69	17,8
IX	0,31	67,0	XIX	0,83	10,7
X	0,33	62,5	XX	0,93	7,7

Tabla 2.2. Peso molecular estimados de las principales bandas polipeptídicas. Autoría.

Seguidamente, se procedió a la determinación del valor relativo de área (AR) correspondiente a los picos V, VI, VII, VIII, IX, X y XI, ya que las LOXs, dado su peso molecular, deben estar formando parte de, o ser alguno de, estos picos. Para esto se utilizó el software *ImageJ*, y se tomó el valor de área ocupado por el conjunto de todos los picos (área total) y luego el valor de cada pico individual, para finalmente dividir a cada uno de estos por el total. Cabe mencionar que se estandarizó a priori el modo de delimitar la base de cada pico (ver “anexo” figura 4). A los valores de AR (4 réplicas biológicas de tratamientos y 4 de controles, distribuidas en un solo SDS-PAGE) se las ha sometido a un test-t para igualdad de medias poblacionales.

El resultado del análisis semi-cuantitativo descrito en el anterior párrafo (ver “anexo” tabla 2), indica que a excepción del pico V, ninguno de los demás analizados (VI a XI) muestran diferencias significativas entre tratamientos y controles ($\alpha = 0,05$), en lo que respecta a AR (tabla 2.3). Por su parte, se advierte una clara diferencia estadísticamente significativa (p-valor = 0,0338) en el AR del pico V, en donde se aprecia un mayor valor en maíces que han sido acondicionado (media = 0,0046)

con respecto a los no-acondicionados (media = 0,0031; **figura 2.11**). El primero es 1,48 veces mayor que el segundo.

Tabla 2.3.
Medias de Áreas Relativas entre cariopsis tratados y no-tratados

Muestra	Picos						
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
T	0,0046	0,0383	0,1003	0,0572	0,0355	0,0481	0,0854
C	0,0031	0,0387	0,1107	0,0699	0,0581	0,0561	0,0977

La tabla muestra los valores medios de las Áreas Relativas (AR) entre cariopsis de maíces expuestos ("T") y no expuestos ("C") a los COVs fúngicos, en lo que respecta a los picos V a XI del perfil de intensidades del SDS-PAGE. El número de réplicas biológicas analizadas fueron: Picos V, VI, VII, VIII y XI: 4T y 4C; pico IX: 1T y 1C; Pico X: 3T y 1C. Autoría.

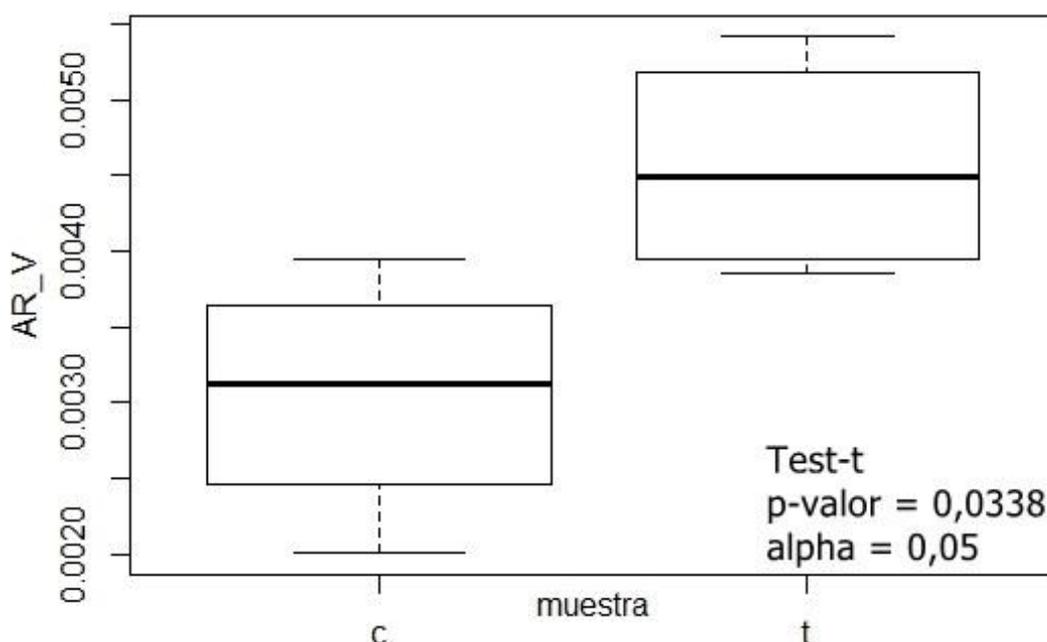


Figura 2.11. Gráfico de Cajas de Área relativa del pico V. Se aprecia la distribución de los valores de AR del pico V (AR_V). "t" (tratamiento; 4 réplicas biológicas); "c" (control; 4 réplicas biológicas). Autoría.

Debe advertirse que el pico V se corresponde con una banda polipeptídica en el SDS-PAGE de un peso molecular calculado de 93,8 KDa (sin considerar la incertidumbre del cálculo y de la técnica). Entonces no se descarta la posibilidad de que las LOXs estén formando parte de dicha banda, ya que es un pico con PM cercano a las mismas (90,3 KDa) y es el único que presentó variación estadísticamente significativa en la intensidad o AR. Esta diferencia de intensidad, estadísticamente significativa, se correlaciona con la diferencia de actividad LOXs calculada anteriormente.

Objetivo específico III: Evaluación del efecto de los COVs emitidos por cariopsis de maíz acondicionados sobre el crecimiento vegetativo de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

Este ensayo, consistió en evaluar el efecto de los COVs emitidos por los cariopsis de maíz que han sido acondicionados (ver "**materiales y métodos**" ítems iii) sobre el crecimiento radial de una colonia de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, mediante el método descrito en el ítem x de la sección "**materiales y métodos**". El experimento completo se puede apreciar en la **figura 2** del "**anexo**".

Una vez iniciado, se tomó la primera medición del diámetro de la colonia fúngica a las 48hs. (momento en el cual la colonia se hace visible a simple vista y se hace factible su medición) y luego cada 24hs. Una particularidad, no prevista, es que a las 72hs comenzaron a visualizarse pequeñas unidades formadoras de colonias (UFC) los medios de cultivo que de los maíces tratados. Este inconveniente hace que el desarrollo vegetativo de la colonia fúngica de interés se vea perturbado por una competencia por nutrientes y por espacio físico, originada por las UFC contaminantes, y por ende, el resultado de la medición del diámetro se ve alterado (ver “anexo” tabla 3). Pero es interesante plasmar este resultado para la puesta a punto de esta técnica novedosa, sencilla y con resultados prometedores.

Dado esto, el experimento se repitió adicionando una modificación sugerida por Dr. J. Sebastian Dambolena: se colocó una lámina de aluminio estéril con 20 perforaciones de 1mm de diámetro, entre ambas capsulas de Petri enfrentadas por sus “bocas”, como se ilustra en la figura 2.6 del ítem ix de la sección “materiales y métodos”, y la figura 3, “anexo”. Los resultados muestran que a las 48 y 72hs de crecimiento, existe una significativa diferencia de crecimiento de las colonias fúngicas expuestas a los COVs emitidos por granos de maíces inducidos con respecto a los no inducidos (tabla 2.4). Y posteriormente la tendencia se mantiene claramente pero no llega ser a significativo estadísticamente, es más existe una disminución de dicha tendencia con el tiempo.

Tabla 2.4.
Actividad antifúngica

muestra	diámetro colonia (mm)			
	48hs	72hs	96hs	144hs
T	13,65a	26,3a	39,55a	64,33a
C	15,2b	27,835b	41,16a	65,56a
p-valor	0,0011	0,0330	0,1	0,1862

T: maíces que han sido previamente inducidos (tratamientos), C: maíces que no fueron inducidos (controles). Los P-valores mostrados son el resultado de un análisis test-t para diferencias de medias poblacionales ($\alpha=0,05$). Las letras asignadas indican que hay diferencias significativas con el grupo apuesto cuando son diferentes entre sí; 3 réplicas biológicas para tratamiento y 3 para controles. Autoría.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son concordantes con un efecto de estimulación del metabolismo de las oxilipinas, vía LOX, en cariopsis de maíz en la madurez fisiológica cuando son expuestos a una atmosfera enriquecida con COVs fúngicos (COVFs). Esta afirmación se basa en que se pudo medir un incremento estadísticamente significativo, de aproximadamente una vez y media, de la actividad enzimática específica LOX (enzima cuesta bajo de la vía de oxilipinas), en aquellos cariopsis que han sido expuestos previamente a COVFs, en comparación con el grupo que no ha sido expuesto (ver “resultados”: “objetivo específico I”).

Una aproximación a cuál de todos las moléculas volátiles emitidas por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (ver “anexo” tabla 4) es capaz de generar una activación del metabolismo LOX en cariopsis, la da Usseglio, V., en su trabajo enmarcado en Tesina de Grado, de la Carrera de Cs.

Biológicas, FCEfyN, UNC (Usseglio, 2016). Su trabajo concluyó que la oxilipina volátil 1-octen-3-ol tiene efecto inductor de la actividad enzimática específica LOX en granos expuestos, en contraste a los no expuestos, bajo el mismo sistema de estudio realizado en la presente.

En segundo lugar, los resultados obtenidos en el análisis semi-cuantitativo del patrón de albúminas y globulinas de los cariopsis expuestos y no expuestos a tales COVFs (ver “**resultados**”: “**objetivo específico II**”), indican que hay un claro incremento, estadísticamente significativo, en la concentración de un tipo de polipéptido (incremento en la intensidad o, lo mismo decir, en el área del pico correspondiente en un perfil de intensidades). Esta banda polipeptídica se corresponde con uno que tiene un peso molecular calculado (93,8 KDa) muy cercano al de las enzimas LOX aisladas en cariopsis de maíz (90 KDa; Theerakulkait & Barrett, 1994). Este resultado está en concordancia con el obtenido en el **objetivo I**, el incremento de la actividad LOX en maíces acondicionados con respecto a los controles. Así, en conjunto, no resulta extraño considerar que existe un incremento en la cantidad de tal enzima en cariopsis de maíz, como respuesta a la recepción de ciertos COVFs.

No obstante, este último ensayo debe ser replicado a fin reforzar lo observado, y deben hacerse estudios adicionales para poder confirmar fehacientemente de que se trate de aumento en la concentración o cantidad de lipoxigenasas. Por ej. por un lado se debe hacer una electroforesis SDS-PAGE incluyendo la enzima LOX purificada para detectar exactamente su localización en la corrida electroforética y además, análisis de biología molecular de expresión de genes de LOX en los cariopsis tratados. Una vez esto, se podrá refutar o no refutar la hipótesis trabajada, o al menos una parte de ésta.

Lo que puede estar sucediendo también es que exista una regulación de la actividad LOX post-traducciona (modulación), lo que no implicaría cambios en los niveles de transcritos (ARNm de LOX), ni en la cantidad de enzima. Sino que se puede estar tratado de una activación de la enzima ya presente en las células embrionarias o de la capa de aleuronas. Y en este caso, la variación observada en el pico V se correspondería con otro polipéptido.

Se ha visto, en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, que los maíces generan un efecto de repelencia hacia una plaga primaria, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Curculionidae - Coleoptera), cuando previamente se los expone a COVFs emitidos por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Usseglio *et al.*, s.f.), tal y como se los induce en el presente trabajo. Pero además, de haberlos inducidos con la compleja mezcla de volátiles que naturalmente emite el fitófago creciendo sobre maíz, se han probado oxilipinas volátiles C8 fúngicas puras, como 1-octen-3-ol y 3-octanol, observándose el mismo efecto de repelencia antes mencionado (Usseglio *et al.*, s.f.; Herrera *et al.*, 2015).

También se observó en nuestro laboratorio que las mismas oxilipinas fúngicas, 1-octen-3-ol, 3-octanol y 3-octanona, a una concentración por encima de 0,53mM, poseen efectos inhibitorios sobre la velocidad del crecimiento radial de colonias fúngicas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Herrera *et al.*, 2015); y Megan y Evans (2000) mostraron que el filamentoso *Trichoderma harzianum* Rifai emite COVFs que también inhiben el crecimiento de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Megan

& Evans, 2000). Estos datos sugieren que los COVFs tienen entre otros efectos, el de disminuir la competencia inter- e intra-específica por nutrientes y/o espacio físico, por medio de inhibición del crecimiento vía compuestos volátiles. Una manera de control de densidad poblacional.

La disminución estadísticamente significativa de la tasa de crecimiento de la colonia del fitopatógeno estudiado en la presente, hasta las 72hs (ver “**resultados**”: “**objetivo específico III**”), cuando se encuentran en una atmósfera enriquecida con COVs emitidos por cariopsis de maíz acondicionados, nos advierte que, o bien existen COVs emitidos por el mismo grano en respuesta a la inducción, o que hay desprendimientos de COVFs que han quedado adsorbidos en la cutícula de la superficie del grano. Ambos casos no son mutuamente excluyentes, sino que pueden ser complementarios.

Se puede advertir en este último resultado (**tabla 2.4**) que a medida que pasa el tiempo, la diferencia entre los diámetros de las colonias del hongo, entre controles y tratamiento se van achicando. Cuando hasta las 72hs la diferencia es significativa, a las 96 y 144hs, los valores se aproximan progresivamente. Este resultado se puede explicar con que el mismo hongo creciendo, emite COVFs, que en última instancia está generando un efecto de inducción en los maíces, y éstos responden emitiendo sus propios COVs con actividad antifúngica. No obstante, el experimento debe repetirse con más replicas y duración, y distintos tipos de controles adicionales: controles positivos y negativos.

Dado a que se midió claramente un incremento en la actividad de las enzimas lipoxigenasas (y posiblemente aumento de su concentración), es posible rastrear en el metabolismo de las LOX posibles sub-vías que terminen en compuestos volátiles con actividad antifúngica (que explique el resultado del **objetivo III**, del presente trabajo) y con actividad repelente para *S. zeamais* Motschulsky (observado en nuestro laboratorio). Así, en base a datos bibliográficos se puede esquematizar que la vía 13-LOX / 13-HPL / ADH generan una serie de C6 volátiles que incluyen al (2E)-hexenal, (2E)-hexenol, (3Z)-hexenal, hexanal y hexanol (**Mosblech et al., 2009; Hassan et al., 2015**), y también la sub-vía 9-LOX / 9-HPL, que rinde aldehídos volátiles C9, como el cis-3-nonenal, trans-2-nonenal (**Hassan et al., 2015**) y nonadienal (**Hughes et al., 2009**). También existen volátiles relacionados a la sub-vía 13-LOX / AOS / AOC que produce una serie de jasmonatos volátiles (**Hughes et al., 2009**). Todos éstos, relacionados con algún mecanismo de defensa vegetal, como lo demuestra un estudio publicado de nuestro laboratorio donde se demostró los efectos antifúngicos sobre *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg que resultaron tener el (2E)-hexenal, (2E)-nonenal y (2E,6Z)-nonadienal (**Zunino et al., 2015**). Este hallazgo se pone en sintonía con los resultados del presente trabajo. Sintetizando lo discutido anteriormente, la **figura 2.12** muestra un esquema que pretende explicar los fenómenos observados.

Conclusión

Como conclusión se puede afirmar que la hipótesis no es rechazada, ya que se observó que los cariopsis de maíz responden con un incremento del metabolismo de las LOXs cuando detectan

COVFs en la atmosfera (evidenciado en el objetivo I, y coherente con el II) y en consecuencia emite sus propios COVs con actividad antifúngica (evidenciado en el objetivo III).

Perspectivas

Acerca de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, aún existen pocas opciones para lograr un manejo efectivo de esta enfermedad del maíz (Botta & Gonzalez, 2012, p. 134), pero en el marco de las Buenas Prácticas en Poscosecha de Granos (Abadía *et al.*, 2013), los resultados obtenidos y el esquema teórico propuesto en la presente tesina de grado, ofrecerían un importante conocimiento a tener en cuenta como herramienta, a la hora de desarrollar métodos de protección de granos durante el almacenamiento.

Este modelo propuesto, requiere de futuras investigaciones para rechazarlo o no-rechazarlo, y en caso de que no, es requerido para incrementar el nivel de detalle. La primera aplicación práctica que resultaría, es la de sintetizar a gran escala y utilizar aquellos COVFs bioactivos, como fumigante de efecto estimulante del sistema de defensa general de los granos almacenados, con el fin de disminuir la tasa de infección fúngica, durante el almacenado.

Esta idea puede llevarse a cabo, ya que existen ejemplos prácticos que han resultados ser prometedores. Así la aplicación del Isotianil (nombre registrado en 2010: Stout®), no tiene efectos antifúngicos o antibacterianos directo, pero dispara en la planta, la acumulación de enzimas relacionadas al sistema de defensas (como las lipoxigenasas y otras, en arroz) y la activación de genes de la vía de señalización de la fitohormona ácido salicílico, también relacionada a la inmunidad vegetal, en tejido vegetal tratados. Este descubrimiento fue iniciado por Bayer AG (ahora Bayer CropScience AG) en Alemania en 1997 y desarrollado en conjunto con la empresa japonesa Sumitomo Chemical Co (Ogawa *et al.*, 2011; Bektas & Eulgem, 2015).

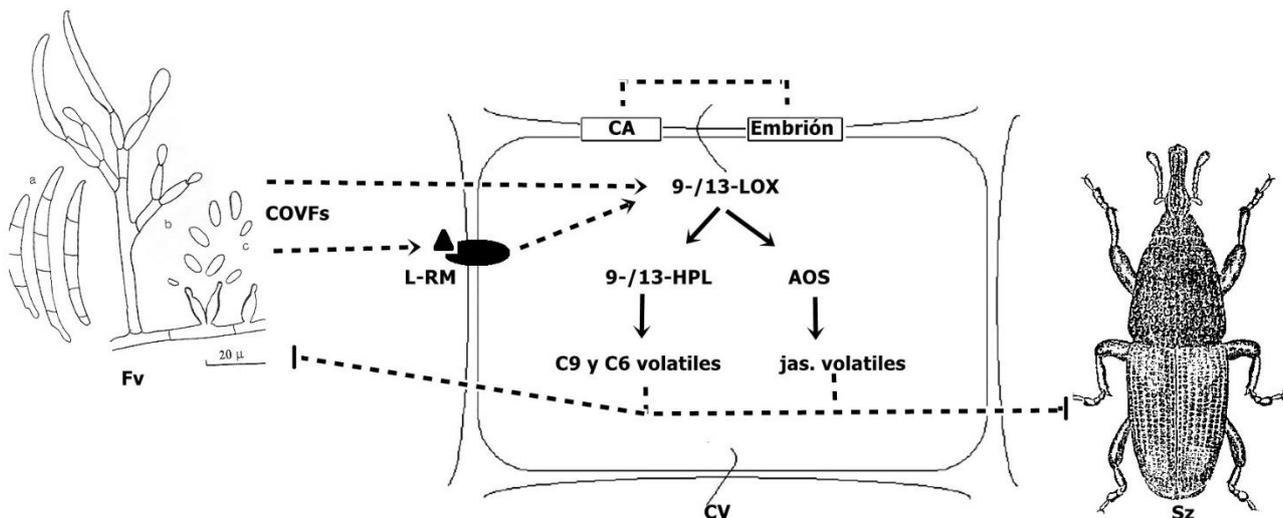


Imagen 2.12. Respuesta del cariopsis de maíz frente a volátiles fúngicos.

Las células de la aleurona o del embrión, de los cariopsis de *Zea mays* L. spp. *mays* (Poaceae), en su madurez fisiológica, son capaces de detectar COVFs de su entorno, probablemente 1-octen-3-ol y/u otros específicos de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Ascomycota). Ya sea, o bien por receptores de membrana, o bien los COVFs difunden a través de ella hacia el interior celular, provocando un incremento de actividad del metabolismo de las LOXs, específicamente las sub-vía 9-LOX y 13-LOX asociadas a las enzimas 9- y 13-HPLs y AOS, generando en última instancia, aumento en la emisión de

GLVs y/o jasmonatos con efectos inhibitorios del crecimiento de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg y repelente a *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Fv: *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg; Sz: *Sitophilus zeamais* Motschulsky; CV: célula vegetal. CA: capa de aleuronas; COVFs: Compuestos Orgánicos Volátiles Fúngicos; L-RM: ligando unido a receptor de membrana vegetal; 9-/13-LOX: 9-lipoxigenasa y/o 13-lipoxigenasa; 9-/13-HPL: 9-Hidroperoxi liasa y/o 13- Hidroperoxi liasa o 9/13- Hidroperoxi liasa. AOS: Aleno oxido sintasa; Jas. volátiles: jasmonatos volátiles; C6 y C9 volátiles: volátiles de 6 y 9 carbonos (Volátiles de Hojas verdes). Autoría.

ANEXO: FIGURAS



Figura 1. Confección de silo-bolsa.

La fotografía muestra el proceso de “embutado” del grano de maíz. 1) Chimango de la tolva autodescartable (“monotolva”), 2) quebradora y embolsadora. Ambas máquinas son accionadas por tractores. 3) silo-bolsa ya confeccionado. Fotografía tomada y proporcionada por Porta, J. F. (2017).



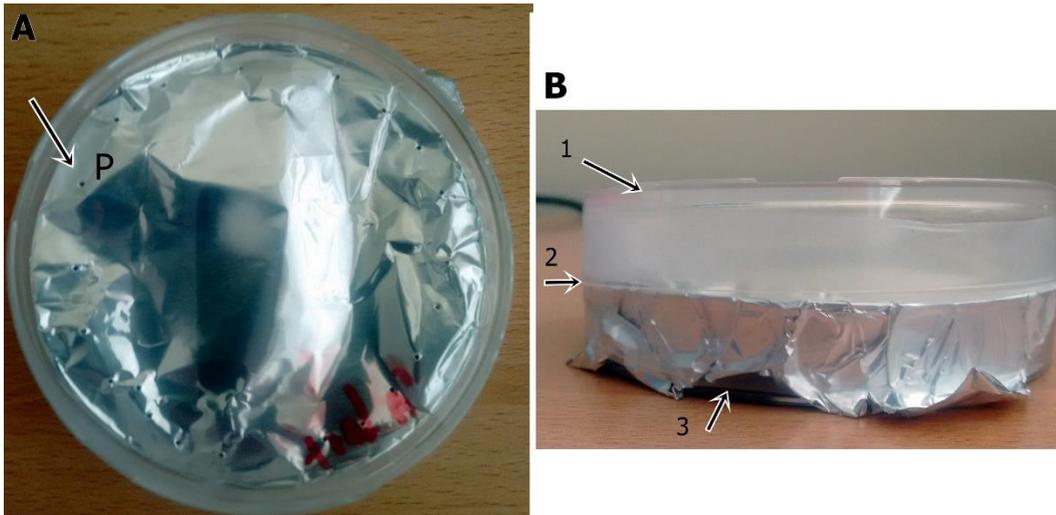


Figura 3. Sistema para medición de actividad antifúngica vía COVs.

Se aprecia en las fotografías que el papel aluminio está perforado, P (foto A, vista superior), y cómo se posiciona entre ambas placas de Petri (foto B, vista lateral), y a su vez, envuelto por fuera por *parafilm*. 1: base de Petri superior (contiene el medio CDA y el inóculo fungico), 2: lamina de aluminio y 3: base de Petri inferior, donde se depositan los granos de maíz, a su vez sobre una base de Petri de menor diámetro. Autoría.

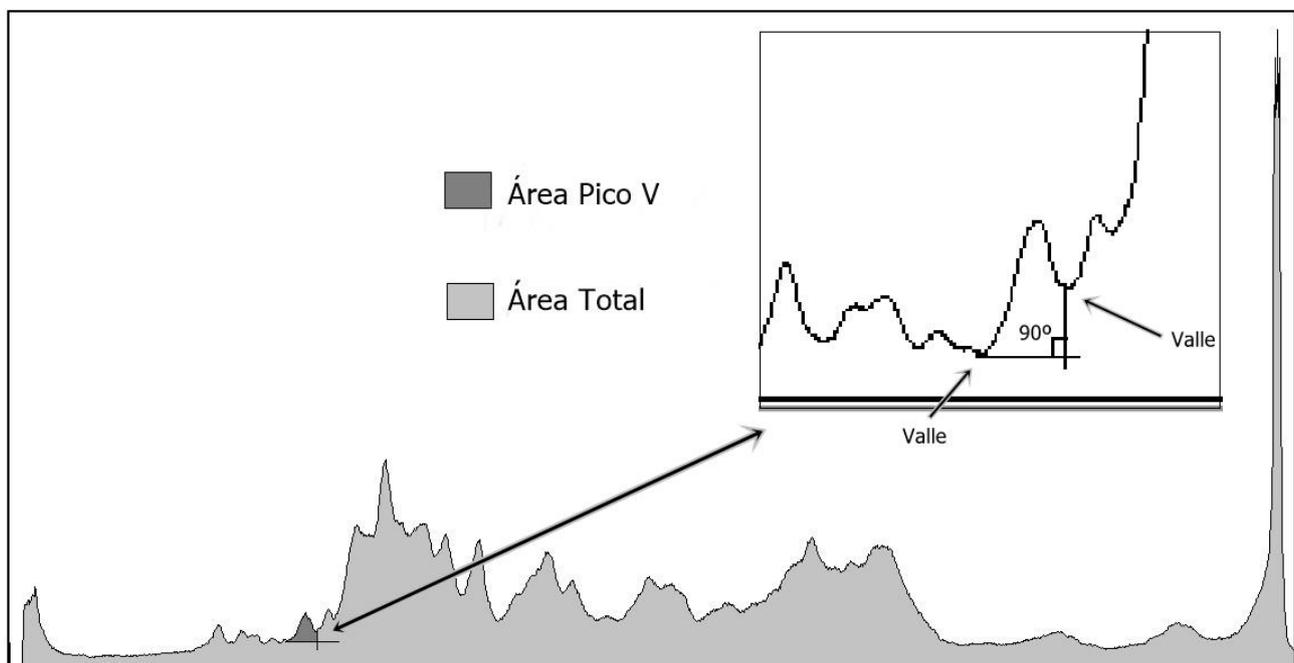


Figura 4. Determinación de áreas en el perfil de intensidades del gel electroforético SDS-PAGE.

Criterio para establecer límites inferiores de los picos, por ej. el pico V, calle Tb. Autoría.

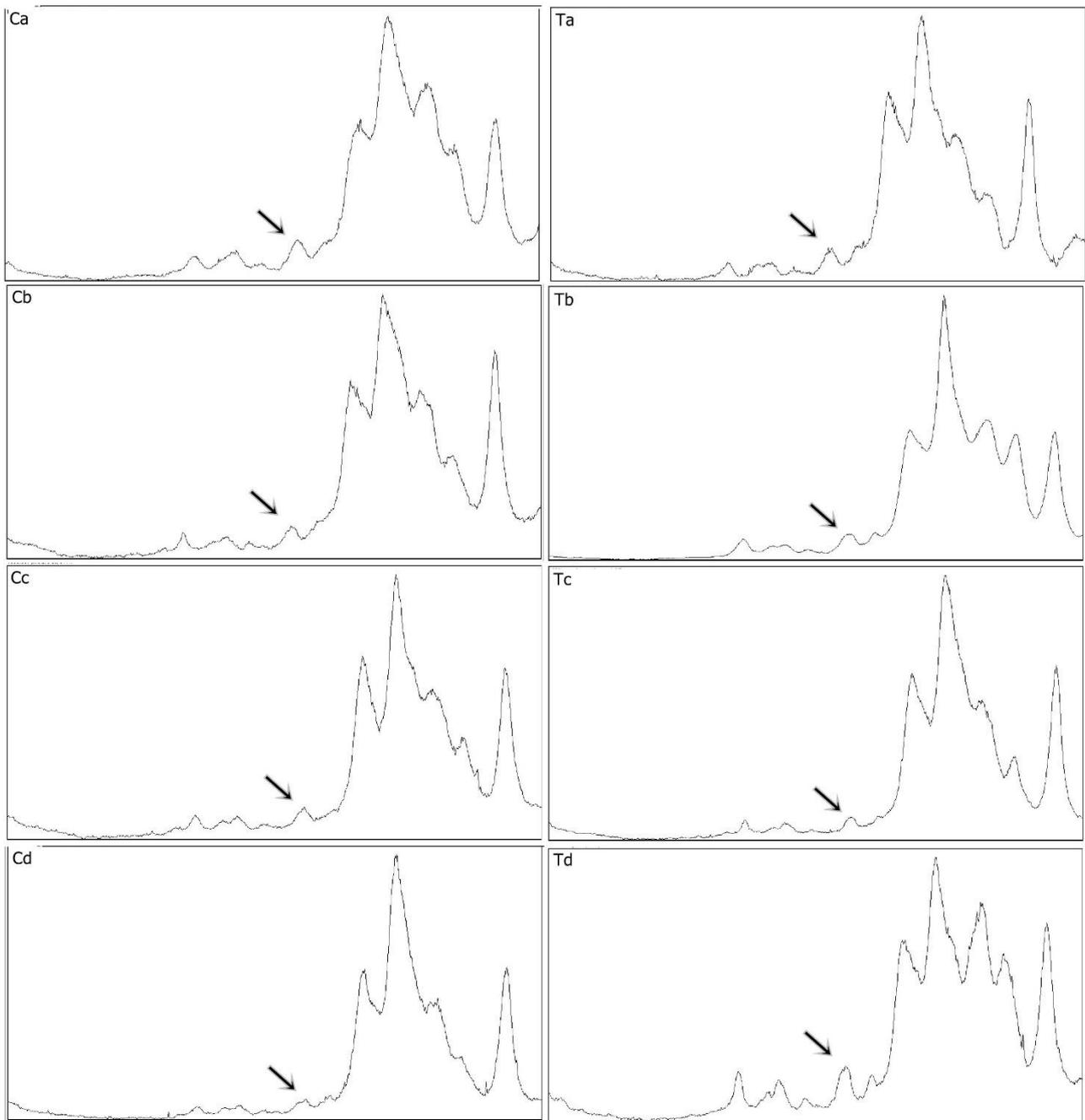


Figura 5. Perfiles de intensidades del gel electroforético SDS-PAGE, entre el marcador 1 y 4

La flecha en cada gráfico indica la posición del pico V. Calles C-a, -b, -c y -d: replicas biológicas de controles; Calles T-a, -b, -c y -d = replicas biológicas de tratamientos. Autoría.

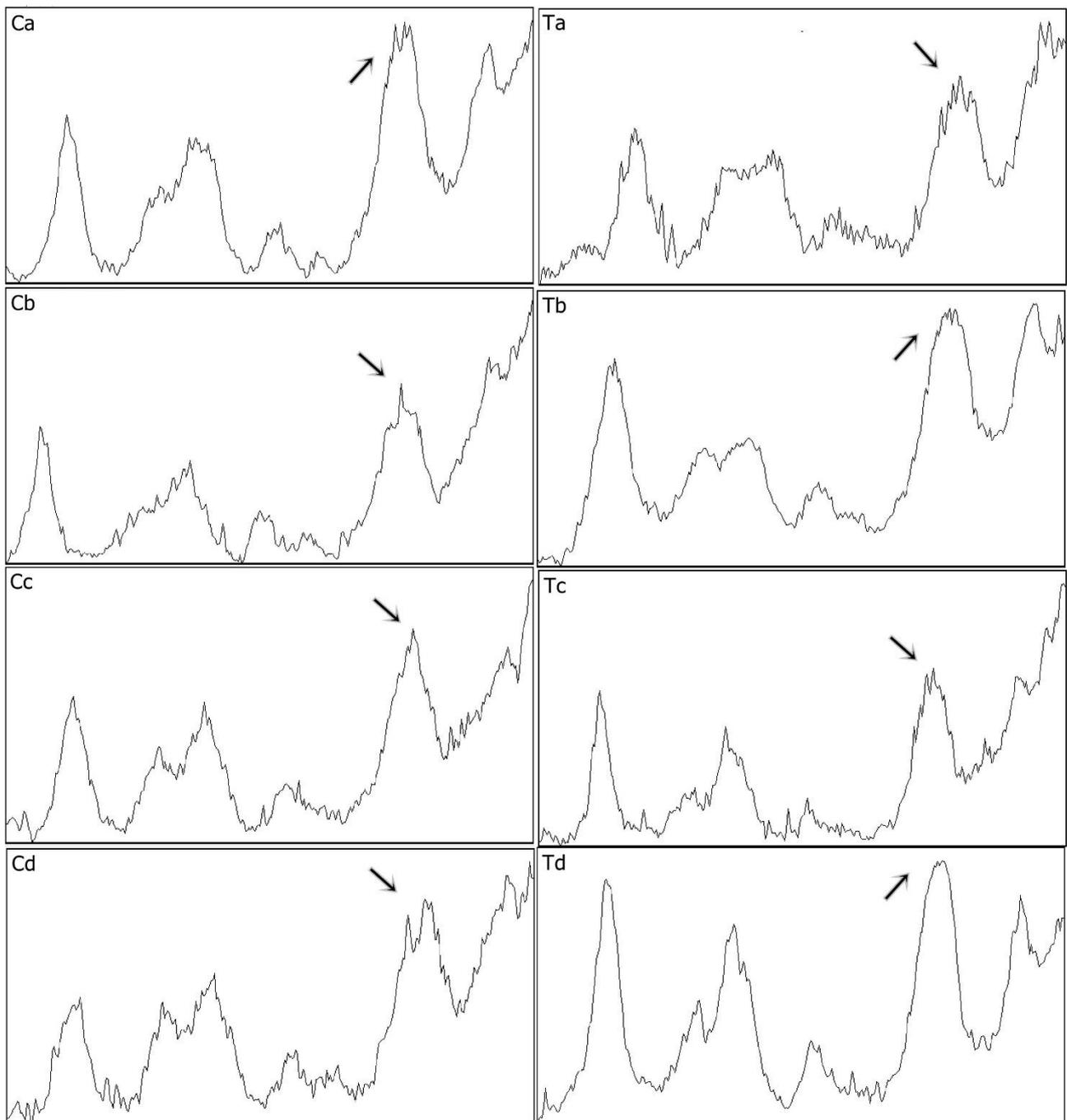


Figura 5. Perfiles de intensidades del gel electroforético SDS-PAGE, entre el marcador 2 y 3

La flecha en cada gráfico indica la posición del pico V. Calles C-a, -b, -c y -d: replicas biológicas de controles; Calles T-a, -b, -c y -d = replicas biológicas de tratamientos. Autoría.

ANEXO: TABLAS

Exp.	Muestra	PTS (mg/ml)	A	EU	EURM	Norm. (p-valor)	Hom. de la Var. (p-valor)
1	T	2,04	0,0058	3,85E-04	0,73	0.7303	0.2664
	T	2,14	0,0071	5,24E-04	1,00		
	T	2,33	0,0071	4,82E-04	0,92		
	C	2,12	0,0064	4,43E-04	0,85		
	C	2,44	0,0064	3,85E-04	0,73		
	C	2,31	0,0046	2,04E-04	0,39		
	C	2,18	0,0051	2,76E-04	0,53		
	blanco	-	0,0028	-	-		
2	T	5,27	0,0123	4,91E-04	0,94	0.1436	0.3397
	T	4,89	0,0117	4,97E-04	0,95		
	T	5,26	0,0094	3,47E-04	0,66		
	T	5,08	0,0126	5,25E-04	1,00		
	C	4,91	0,0064	2,13E-04	0,41		
	C	4,65	0,0070	2,59E-04	0,49		
	C	5,40	0,0097	3,53E-04	0,67		
	blanco	-	0,0024	-	-		
3	T	1,24	0,0059	7,38E-04	1,00	0.6871	0.6955
	T	1,44	0,0057	5,98E-04	0,81		
	T	5,44	0,0114	4,32E-04	0,59		
	C	1,12	0,0040	3,72E-04	0,50		
	C	1,30	0,0055	6,24E-04	0,85		
	blanco	-	0,0024	-	-		
4	T	0,68	0,0064	1,77E-03	0,70	0.7584	0
	T	1,35	0,0149	2,53E-03	1,00		
	C	1,29	0,0067	9,90E-04	0,39		
	C	1,44	0,0118	1,82E-03	0,72		
		blanco	-	0,0018	-		
5	T	0,62	0,0577	2,35E-02	0,90	0.8003	0.8187
	T	0,99	0,0647	1,66E-02	0,63		
	T	1,09	0,1114	2,62E-02	1,00		
	C	1,85	0,0509	6,94E-03	0,27		
	C	0,86	0,0477	1,39E-02	0,53		
	C	1,63	0,0600	9,35E-03	0,36		
	C	0,70	0,0471	1,70E-02	0,65		
	blanco	-	0,0018	-	-		

Tabla 1. Resultados experimentales de la actividad LOX.

Exp. = Experimentos: número y orden del experimento en cuestión. Muestra: tratamientos (T) y controles (C), cada uno es una réplica biológica; PTS = proteínas totales solubles; A = pendiente en bruto [min^{-1}]; EU = actividad enzimática específica LOXs; EURM = EU relatividad al mayor valor dentro del experimento ($\text{EU}_x/\text{EU}_{\text{mayor}}$); Norm. = Normalidad: p-valor de test de Shapiro-Wilks ($\alpha = 0,05$); Hom. de la Var. = Homogeneidad de la varianza: p-valor del test de Levene ($\alpha = 0,05$). Los p-valores de ambos test resultan indistintos según se tome la variable EU o EURM. El p-valor = 0 del experimento 4 se explica por el bajo número de datos en el mismo (dos tratamientos y dos controles).
Autoría

Tabla 2.
Valores de las Áreas Relativas de los picos V a XI para las muestras de maíces.

Muestra	Picos						
	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Ta	0,0049	0,0421	0,1083	0,0472	n/c	n/c	0,0910
Tb	0,0054	0,0340	0,0960	0,0542	0,0355	0,0590	0,0845
Tc	0,0039	0,0453	0,1332	0,0717	n/c	0,0229	0,1039
Td	0,0040	0,0318	0,0638	0,0556	n/c	0,0624	0,0624
Ca	0,0039	0,0337	0,1350	0,0557	0,0581	0,0561	0,0871
Cb	0,0033	0,0353	0,0924	0,0612	n/c	n/c	0,1063
Cc	0,0020	0,0366	0,0867	0,0767	n/c	n/c	0,0839
Cd	0,0029	0,0491	0,1286	0,0859	n/c	n/c	0,1136

Muestras: corresponden a cariopsis de maíces que han sido expuestos ("T", tratamiento) y no expuestos ("C", control) a los COVs fúngicos; cada letra indica que son muestras biológicas independientes (replicas). Las 8 muestras pertenecen a un mismo gel electrforético; n/c = no se calcula. Autoría.

Tabla 3.
Ensayo de actividad antifúngica y UFC.

Muestra	Diámetro (cm)		
	48hs	72hs	contaminación
Ta	1,15	2,5	120
Tb	1	2,5	148
Tc	1	2	136
Ca	1,1	2,75	5
Cb	1,3	2,75	11
Cc	1	2,8	20
Cd	1,15	3	5

Muestras: corresponden a cariopsis de maíces que han sido expuestos ("T", tratamiento) y no expuestos ("C", control) a los COVs fúngicos; cada letra indica que son muestras biológicas independientes (replicas). La contaminación del medio de cultivo se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC) de colonias que son extrañas. Cabe destacar que cada muestra se le ha hecho un duplicado de técnica, y se ha realizado cada una de manera intercalada, de modo que esa diferencia observable en el n° de UFC se debe a una consecuencia biológica de la exposición de maíces.

Tabla 4.
COVs emitidos por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

<i>Nombre IUPAC*</i>	<i>PM</i>	<i>Substrato</i>	<i>momento de medición</i>	<i>Autor (año)</i>
2-metilpropil acetato	116,16	PDA; CVZm	8 y 21 dpi	Rizzi <i>et al.</i> , 2009
3-metilbutan-1-ol	88,15	PDA; CVZm	8 y 21 dpi	Rizzi <i>et al.</i> , 2009
		CAZm	5 dpi	Bartelt & Wicklow, 1999
		CAZm	7 dpi	Nuestro laboratorio
octan-3-ona	128,21	PDA; CVZm	no presente a los 21 dpi	Rizzi <i>et al.</i> , 2009
		Mazorca	24 dpi	Becker <i>et al.</i> , 2014
		CAZm	7 dpi	Nuestro laboratorio
oct-1-en-3-ona	126,20	CAZm	7 dpi	Nuestro laboratorio
oct-1-en-3-ol	128,21	Harina de trigo esterilizada***	3-4 dpi	Kaminski <i>et al.</i> , 1974 **
		CAZm	7 dpi	Nuestro laboratorio
octan-3-ol	130,23	mazorca	24 dpi	Becker <i>et al.</i> , 2014
		CAZm	7 dpi	Nuestro laboratorio
Etanol	46,07	CAZm	1 y 5 dpi	Bartelt & Wicklow, 1999
Acetaldehido	44,05			
propan-1-ol	60,09			
Etilacetato	88,1			
2-metilpropan-1-ol	74,12			
4-etil-2-metoxifenol	152,19		5 y 8 dpi	
1-etil-4-metoxibenceno	136,19		8 dpi	
4-etilfenol	122,16			
4-etil-1,2-dimetoxibenceno	166,22			
3-hexen-1-ol	100,16	mazorca	24 dpi	Becker <i>et al.</i> , 2014
heptan-2-ol	116,2			
pentan-1-ol	88,15			
alpha-Ylangeno (SQT)	204,35			
alpha- y beta-Selineno (SQT)	204,35			
beta-macrocarpeno (SQT)	204,35			
(+)-Cyclosativene (SQT)	204,35			

* consultado en www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; ** no especifica la especie de *Fusarium* estudiada; *** 60% de humedad; PM: Masa molecular [g/mol], chequeado en www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; CVZm: cariopsis vivos de maíz; PDA medio Agar Papa Dextrosa; CAZm cariopsis autoclavados de maíz; dpi: días post-inoculación.

LISTA DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abadía, B., de la Torre, D., Giorda, J. J., Bartosik, R. & Cardoso, L. (2013). *Manejo eficiente del grano en la poscosecha*. En Abaía, B. & Bartosik, R. (ed.) (2013). *Manual de Buenas Prácticas en Poscosecha de Granos. Hacia el agregado de valor en origen de la producción primaria*. Bs. As, Arg.: Ediciones INTA - ERREGE & Asociados. ISBN: 978-987-679-264-6.
- Agrios G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th Ed.). USA: Elsevier. ISBN: 0-12-044565-4
- Aguaysol, N. C., González, V., De Lisi, V., Reznikov, S., Stegmayer, C. A., Henríquez, D. & Ploper, L. D. (2013). *El Maíz en el NOA. Incidencia de Fusarium verticillioides y Fusarium graminearum en granos de híbridos comerciales de maíz, cosechados en la campaña 2011/2012 en seis localidades de las provincias de Tucumán y Salta*. Publicación Especial EEAOC N° 46. ISSN: 03287300.
- Alexandrov, N. N., Brover, V. V., Freidin, S., Troukhan, M. E., Tatarinova, T. V., Zhang, H., Swaller, T. J., Lu, P., Bouck, J., Flavell, R. B. & Feldmann, K. A. (2009). Insights into corn genes derived from large-scale cDNA sequencing. *Plant Mol Biol*, 69, 179-194.
- Andreou, A. & Feussner, I. R. (2009). Lipoxygenases: structure and reaction mechanism. *Phytochemistry*, 70(13), 1504-1510.
- Andreou, A., Brodhun, F. & Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in lipid research*, 48(3), 148-170.
- Aranda-Sicilia, M. N., Trusov, Y., Maruta, N., Chakravorty, D., Zhang, Y., & Botella, J. R. (2015). Heterotrimeric G proteins interact with defense-related receptor-like kinases in Arabidopsis. *Journal of plant physiology*, 188, 44-48.
- Asociación de Maíz Argentina (2013). *La cadena del maíz y las oportunidades para el desarrollo en la Argentina. Consultoría elaborada por encargo del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura*. Bs As. Arg. Recuperado de www.maizar.org.ar/ (Consultado el 05/11/16).
- Australian Government. Department of Health. Office of the Gene Technology Regulator (2008). *The Biology of Zea mays L. ssp mays (maize or corn)*. Recuperado de <http://www.ogtr.gov.au/> (Consultado el 05/11/16).
- Bacon, C. W., Yates, I. E., Hinton, D. M. & Meredith, F. (2001). Biological control of Fusarium moniliforme in maize. *Environmental Health Perspectives*, 109(2), 325.
- Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., Robledo, C. W. (2008). *InfoStat. Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Barón López, F. J. & Téllez Montiel, F. (2004). *Apuntes de Bioestadística. Tercer Ciclo en Ciencias de la Salud y Medicina*. Universidad de Malaga, Recuperado de: www.bioestadistica.uma.es (Consultado 03/11/2016)
- Bartelt, R. J. & Wicklow, D. T. (1999). Volatiles from *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and Their Attractiveness to Nitidulid Beetles. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2447-2454.
- Bartholomew, D. P. (1965). *Physiology of dry Zea mays grain*. Retrospective Theses and Dissertations. Iowa State University of Science and Technology. Ann Arbor, Michigan, EE.UU: University Microfilms, Inc. Recuperado de <http://lib.dr.iastate.edu/rtd> (consultado 13/11/16)
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14, 1-16.
- Becker, E. M. (2013). *New strategies for the detection of Fusarium infection and mycotoxin contamination of cereals and maize* (Doctoral dissertation) Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen. Alemania.
- Becker, E. M., Herrfurth, C., Irmisch, S., Köllner, T. G., Feussner, I., Karlovsky, P. K. & Splivallo, R. (2014). Infection of Corn Ears by *Fusarium spp.* Induces the Emission of Volatile Sesquiterpenes. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 5226–5236.
- Becraft, P. W. & Asuncion-Crabb, Y. (2000). Positional cues specify and maintain aleurone cell fate in maize endosperm development. *Development*, 127, 4039-4048.
- Becraft, P. W. & Yi, G. (2011). Regulation of aleurone development in cereal grains. *Journal of Experimental Botany*, 62(5), 1669-1675.
- Bennett, J. W. & Inamdar, A. A. (2015). Are Some Fungal Volatile Organic Compounds (VOCs) Mycotoxins?. *Toxins*, 7(9), 3785-3804.
- Bethke, P. C., Swanson, S. J., Hillmer, S. & Jones, R. L. (1998). From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. *Annals of Botany*, 82(4), 399-412.
- Bianchini, A. & Bullerman, L. B. (2014). *Mycotoxin: Classification*. En Batt, C. A. and Tortorello, M. L. (ed.) (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (2th ed.) Volume 2. USA: Academic press. ISBN: 9780123847300.
- Blanco, A. & Blanco, G. (2011). *Química biológica*. Bs. As.: El Ateneo. ISBN: 9789500205757

- Blande, J. D. (2016). Plant Communication With Herbivores. *Advances in Botanical Research*. In press.
- Bohn, L., Meyer, A. S. & Rasmussen, S. K. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165-191.
- Bommert, P. & Werr, W. (2001). Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene*, 271(2), 131-142.
- Botta, G. & Gonzalez, M. (2012). *Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz*. En Eyhérbide, G. H. (2012). *Bases para el manejo de cultivos de maíz*. Bs As, Argentina: Ediciones INTA.
- Bradbury, D. Wolf, M. J. & Dimler, J. R. (1961). The Hilar Layer of White Corn. *Cereal chem.* 39, 72-78.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brodhun, F. & Feussner, I. (2011). Oxylipins in fungi. *FEBS journal*, 278(7), 1047-1063.
- Browse, J. (2005). Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitamins & Hormones*, 72, 431-456.
- Buckler, E. S. & Stevens, N. M. (2006). *Maize Origins, Domestication, and Selection*. In Motley, T. J., Zerega, N. & Cross, H. (Eds.) (2006). *Darwin's Harvest: New Approaches to the Origins, Evolution, and Conservation of Crops*. USA: Columbia University Press. ISBN: 9780231133166
- Carmona, M. & Scandiani, M. (2011). *Enfermedades maíz 2011: Importancia y control de Fusarium verticillioides en semillas de maíz. Propuesta para su manejo*. Aapresid. Recuperado de www.aapresid.org.ar. (Consultado el 30/08/2016)
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Salta, Argentina: Ediciones UNSA. ISBN 987-9381-19X.
- Casalins, A. C. (s.f.). *Cuadernillo de actualización técnica capacidad de almacenaje cubicaje*. Escuela de recibidores de granos de buenos aires. Recuperado de www.ciacordoba.org.ar (consultado el 18/02/2017)
- Casini, C. & Santajuliana, M. (2008). *Control de Plagas en Granos Almacenado*. Informes técnicos - PRECOP - INTA EEA Manfredi. Recuperado de www.cosechaypostcosecha.org/ (consultado 18/02/2017)
- Casini, C. (2007). *Factores a considerar para disminuir el deterioro de granos de cereales y oleaginosas, almacenados con alto contenido de humedad en bolsas plásticas*. Actualización técnica - PRECOP - INTA EEA Manfredi. Recuperado de www.cosechaypostcosecha.org/ (consultado 01/12/2016)
- Casini, C., Rodríguez, J. C. & Bartosik, R. (ed.) (2009). *Almacenamiento de granos en bolsas plásticas. Resultados de investigación - Convenio de Vinculación Tecnológica: INTA – Empresas Fabricantes de Bolsas Plásticas - INTA EEA Manfredi, Cba. Arg: INTA Precop*. ISSN: 1667-9199.
- Castellari, C. C., Cendoya, M. G., Valle, F. J. M., Barrera, V. & Pacin, A. M. (2015). Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.*, 47(4), 350-359.
- Chase, M. W. & Reveal, J. L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 122-127.
- Christensen, S. A., Huffaker, A., Kaplan, F., Sims, J., Ziemann, S., Doehle, G., ... & Mori, N. (2015). Maize death acids, 9-lipoxygenase-derived cyclopentenone derivatives, display activity as cytotoxic phytoalexins and transcriptional mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11407-11412.
- Christensen, S. A., Nemchenko, A., Borrego, E., Murray, I., Sobhy, I. S., Bosak, L., ... & Herrfurth, C. (2013). The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. *The Plant Journal*, 74, 59-73.
- Christensen, S. A., Nemchenko, A., Park, Y. S., Borrego, E., Huang, P. C., Schmelz, E. A., ... & Kolomiets, M. V. (2014). The novel monocot-specific 9-lipoxygenase ZmLOX12 is required to mount an effective jasmonate-mediated defense against *Fusarium verticillioides* in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1263-1276.
- Clemente, G., Casini, C., Pagliaro, M. & Quartucci, J. (2006). *Efecto de la temperatura exterior sobre la atmósfera interior del sistema silo-bag, durante el almacenamiento de granos-2003*. Curso Internacional de Agricultura de Precisión. Expo de Máquinas Precisas (julio de 2006). Manfredi, Córdoba. AR.
- Cocucci, A. E. & Hunziker, A. T. (1994). *Los ciclos biológicos en el reino vegetal* (2ª ed.). Córdoba. Argentina: Academia Nacional de Ciencias. ISSN 0325-3406
- Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. C. & Burton, K. S. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, 47(6), 317-326.
- Constantino, N., Mastouri, F., Damarwinasis, R., Borrego, E., Moran-Diez, M. E., Kenerley, C. M., ... & Kolomiets, M. V. (2013). Root-expressed maize lipoxygenase 3 negatively regulates induced systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in shoots. *Frontiers in plant science*, 4, 510.

- Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V. & Stegehuis, G. (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* (50), 19 -22.
- Danho, M., Gaspar, C. & Haubruge, E. (2002). The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research*, 38(3), 259-266.
- Das, A. K. & Singh, V. (2015). Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and Flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *Journal of functional foods*, 13, 363-374.
- De la Torre, D. A., Cardoso, M. L., Depetris, G. J. y Bartosik, R. E. (s.f.). *Almacenamiento de maíz en silo bolsa para alimentación animal*. EEA INTA Balcarce, Bs. As. Recuperado de www.inta.gov.ar. (Consultado 11/02/2017).
- De la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E. & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin: Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP*, 17, 77-91.
- De Lucca, A. J. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *R. iberoamericana de micología*, 24, 3-13.
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal biology* (4th ed.). UK: John Wiley & Sons. ISBN-13: 978-1-4051-3066-0
- Desjardins, A. E. & Proctor, R. H. (2007). Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119, 47-50.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (2th ed.). UK: John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 0471496405.
- Drapron, R. (1985). *Enzyme activity as a function of water activity*. In *Properties of water in foods*. Springer Netherlands. In Simato, D. and Multon, J. L. (Ed.). France: Martinus Nijhoff Publishers. ISBN-13: 978-94-010-8756-8
- Duncan, K. E. & Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular plant-microbe interactions*, 23, 6-16.
- Fagali, N. S. (2011). *Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes*. Tesis Doctoral. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7713-7716.
- Favre, M. L. (2012). Conceptos básicos del ensilaje para obtener excelentes resultados. procesos fermentativos dentro del silo. *Producir XXI*, 20(243)
- Feussner, I. & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology*, 53, 275-297.
- Funk, C. D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294(5548), 1871-1875.
- Gaffney, B. J., Su, C. & Oliw, E. H. (2001). Assignment of EPR transitions in a manganese-containing lipoxygenase and prediction of local structure. *Applied magnetic resonance*, 21(3-4), 411-422.
- Gao, X., Brodhagen, M., Isakeit, T., Brown, S. H., Göbel, C., Betran, J., ... & Kolomiets, M. V. (2009). Inactivation of the lipoxygenase ZmLOX3 increases susceptibility of maize to *Aspergillus* spp. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(2), 222-231.
- Gao, X., Shim, W. B., Göbel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeley, R., ... & Kolomiets, M. (2007). Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(8), 922-933.
- García Pérez, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*, 1(2), 31-4.
- García-Mateos, R. & Pérez-Leal, R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9, 5-10.
- Gardner H.W. & Weisleder (1970). Lipoxygenase From *Zea mays*: 9-0 -Hydroperoxy-trans-1 0, cis-12-octadecadienoic Acid From Linoleic Acid. *Lipid* 5(8), 678-683.
- Gear, J. R. (2006). El cultivo del maíz en la Argentina. Serie de Informes Especiales de ILSI Argentina, Volumen II: *Maíz y Nutrición*, 4.
- Giannitti, F., Diab, S. S., Pacin, A. M., Barrandeguy, M., Larrere, C., Ortega, J. & Uzal, F. A. (2011). Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B1 and B2 in Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(5), 407-412.
- Gibian, M. J., & Vandenberg, P. (1987). Product yield in oxygenation of linoleate by soybean lipoxygenase: the value of the molar extinction coefficient in the spectrophotometric assay. *Analytical biochemistry*, 163(2), 343-349.
- Gimeno, A. (2009). *Revisión de las concentraciones máximas tolerables para ciertas micotoxinas*. Portal Veterinaria Albéitar. Recuperado de www.engormix.com. (Consultado 6/11/2016).
- Glenn, A. E. (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 137(3), 213-240.

- Graham, C., Mueller, N. & Todey, D. (2013). *Heat Stress On Late Grain-Filling In Corn*. Recuperado de www.igrow.org/agronomy/corn/
- Griffin, D. H. (1996). *Fungal Physiology* (2° ed.). New York, USA: John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-16615-3.
- Griffiths, G. (2015). Biosynthesis and analysis of plant oxylipins. *Free radical research*, 49(5), 565-582
- Grossman, S., & Zakut, R. (1979). Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Methods of Biochemical Analysis*, 25, 303-329.
- Hart, H. Craine, L. E., Hart, D. J. & Hadad, C. M (2007). *Química Orgánica* (12ª ed.). Madrid, España: McGraw-Hill. ISBN: 0-618-59073-0
- Hassan, M. N., Zainal, Z. & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 727-739.
- Heil, M. & Bueno, J. C. S. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5467-5472.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M. ... (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in plant science*, 6(9), 431-438.
- Holding, D. R. (2014). Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. *Frontiers in Plant Science*, 5(276).
- Hornok, L., Waalwijk, C., & Leslie, J. F. (2007). Genetic factors affecting sexual reproduction in toxigenic *Fusarium* species. *International journal of food microbiology*, 119, 54-58.
- Huang, H., Møllerc, I. M. & Song, SQ. (2011). Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics*, 75, 1247-1262.
- Hughes, R. K., De Domenico, S. & Santino, A. (2009). Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *ChemBioChem*, 10(7), 1122-1133.
- Husson, F., Bompas, D., Kermasha, S. & Belin, J. M. (2001). Biogenesis of 1-octen-3-ol by lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus*. *Process Biochemistry*, 37(2), 177-182.
- Ibañez, C. M. (2008). *Puertos cerealeros de argentina (infraestructura y exportaciones)*. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos - Subsecretaria Agroindustria y Mercados - Dirección Nacional de Mercados - Dirección de Mercados Agroalimentarios - Área de infraestructura comercial y regímenes especiales (responsable: Ibañez, C. M.). Recuperado de www.sagpya.mecan.gov.ar/dimeagro (Consultado el 18/02/2017).
- International Agency for Research on Cancer (2002). *Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, WHO & IARC: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene* (No. 82). WHO. Lyon, France: IARCPress. ISBN: 92 832 1282 7.
- Karov, I., Mitrev, S. & Kostadinovska, E. (2009). *Giberella fujikuroi* (Wollenweber) the new parasitical fungus on rice in the Republic of Macedonia. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad*, 116, 175-182.
- Keller, L. A. M., Pereyra, M. G., Keller, K. M., Alonso, V. A., Oliveira, A. A., Almeida, T. X. ... & Rosa, C. A. R. (2013). Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. *J. Stored. Prod. Res.*, 52, 42-47.
- Koster, K. L. (1991). Glass Formation and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiol*, 96, 302-304
- Kyle, D. J. & Styles, E. D. (1977). Development of Aleurone and Sub-aleurone Layers in Maize. *Planta*, 137, 185-193.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Lanubile, A., Ferrarini, A., Maschietto, V., Delledonne, M., Marocco, A. & Bellin, D. (2014). Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC genomics*, 15, 710.
- Lemfack, M. C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R. & Piechulla, B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 24, 744-748.
- Leprince, O. & Buitink, J. (2015). Introduction to desiccation biology: from old borders to new frontiers. *Planta*, 242(2), 369-378.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Ames, IA, USA: Blackwell Pub. ISBN: 978-0-8138-1919-8
- Leslie, J. F., Plattner, R. D., Desjardins, A. E. & Klittich, C. J. R. (1992). Fumonisin B1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*, 82(3), 341-345.

- Leubner-Metzger, G. (2016). *The Seed Biology Place*. Recuperado de www.seedbiology.de. (consultado 29/08/16)
- Li, N., Alfiky, A., Vaughan, M. M., & Kang, S. (2016). Stop and smell the fungi: fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. *Fungal Biology Reviews*, 30(3), 134-144.
- López, M. L. (2012). *Aleloquímicos terpenoides en las interacciones entre plantas*. En Zygadlo, J. A. (2012). *Aceites Esenciales. Química, Ecología, Comercio, Producción y Salud*. Córdoba, Arg.: Universitas, editorial científica universitaria. ISBN: 978-978-1457-63-2.
- Lucca, F. A. (2017). *Informante Clave*. Amigo y se desempeña como empleado de *Serviagro J.C. S.A., venta de insumos y acopio de cereal*. Comunicación vía telefónica (17 y 21/02/2017).
- Maffei, M. E., Arimura, G. I., & Mithöfer, A. (2012). Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Natural product reports*, 29(11), 1288-1303.
- Marín-García, P. (2010). *Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "Fusarium"*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III. Madrid, España.
- Martinez, M. I. & Moschini, R. C. (2014). *Riesgo climático de la región pampeana argentina con respecto a la contaminación con fumonisina en grano de maíz*. Instituto de Clima y Agua, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.
- Maschietto, V., Marocco, A., Malachova, A. & Lanubile, A. (2015). Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. *Journal of plant physiology*, 188, 9-18.
- McDonald M. B. (2004). *Orthodox Seed Deterioration and Its Repair*. In Benech Arnold, R. L. & Sánchez, R. A. (2004). *Handbook of Seed Physiology: Applications to Agriculture*. Binghamton, NY. Haworth Press. ISBN 1-56022-928-4
- McNeill, J., Turland, N. J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V.,... & Prud'homme van Reine, W. F. (2011). *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Australia. Recuperado de www.iapt-taxon.org/ (Consultado 30/08/2016).
- Megan, N. & Evans, P. (2000). Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *Journal of Stored Products Research*, 36, 319-340.
- Merrill J, A. H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A. & Riley, R. T. (2001). Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental health perspectives*, 109(2), 283.
- Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R. & Axelrod, B. (1996). Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry*, 35(33), 10687-10701.
- Miquel, M., López-Ribera, I., Ràmia, M., Casillas, S., Barbadilla, A. & Vicent, C. M. (2011). MASISH: a database for gene expression in maize seeds. *Bioinformatics*, 27(3), 435-436.
- Monzón, A. & Rodríguez, T. J. L. (2001). *Infecciones causadas por el género Fusarium*. Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud, SEIMC. Majadahonda. Recuperado de www.seimc.org/ (consultado 24/05/2016)
- Morath, S. U., Hung, R. & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biology reviews*, 26, 73-83
- Mosblech, A., Feussner, I. & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 511-517.
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J. P. & Rosenkranz, M. (2013). Volatile profiles of fungi-chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology*, 54, 25-33.
- Munkvold, G. P. & Desjardins, A. E. (1997). Fumonisins in maize: can we reduce their occurrence? *Plant disease*, 81(6), 556-565.
- Naylor, C. E., Eaton, J. T., Howells, A., Justin, N., Moss, D. S., Titball, R. W. & Basak, A. K. (1998). Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nature Structural & Molecular Biology*, 5(8), 738-746.
- Nelson, P. E. (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117(1-2), 29-36.
- Nemchenko, A., Kunze, S., Feussner, I., & Kolomiets, M. (2006). Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of experimental botany*, 57(14), 3767-3779.
- Nidera S.A. (s.f.). *Nidera semillas® – Maiz – AX887*. Recuperado de www.niderasemillas.com.ar/. (Consultado: 14/11/2016)
- Nielsen, R. L. (2013). *Field Drydown of Mature Corn Grain*. Purdue University, Department of Agronomy. *Corny News Network*. Recuperado de www.agry.purdue.edu (Consultado 03/09/2016)
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 465-493.

- Ogawa, M., Kadowaki, A., Yamada, T., & Kadooka, O. (2011). Applied Development of a Novel Fungicide Isotianil (Stout). *Sumitomo Kagaku*, 1, 1-15.
- Oldham, M. L., Brash, A. R. & Newcomer, M. E. (2005). Insights from the X-ray Crystal Structure of Coral 8R-Lipoxygenase calcium activation via a c2-like domain and a structural basis of product chirality. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39545-39552.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D. & Sharon, A. (2003). Early events in the Fusarium verticillioides-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1695-1701.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (1993). *El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición* (Nº25). Roma, Italia: Departamento de Agricultura. ISBN 92-5-303013-5. Recuperado de <http://www.fao.org/> (Consultado 10/08/2016).
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2003). *Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas*. Roma, Italia. ISBN 92-304611-2. Recuperado de <http://www.fao.org> (consultado el 09/03/2016)
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2015). *Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. N° 4. Sistema mundial de información y alerta sobre la alimentación y la agricultura (SMIA)*. Dirección de Comercio y Mercados (EST). Recuperado de <http://www.fao.org>. (Consultado el 18/05/2016).
- Pammenter, N. W. & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, 9, 13-37
- Piesik, D., Lemńczyk, G., Skoczek, A., Lamparski, R., Bocianowski, J., Kotwica, K., & Delaney, K. J. (2011a). Fusarium infection in maize: Volatile induction of infected and neighboring uninfected plants has the potential to attract a pest cereal leaf beetle, *Oulema melanopus*. *Journal of plant physiology*, 168(13), 1534-1542.
- Piesik, D., Pańka, D., Delaney, K. J., Skoczek, A., Lamparski, R., & Weaver, D. K. (2011b). Cereal crop volatile organic compound induction after mechanical injury, beetle herbivory (*Oulema* spp.), or fungal infection (*Fusarium* spp.). *Journal of plant physiology*, 168(9), 878-886.
- Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J. & Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium BP maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5019-5024.
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical mycology*, 38, 17-22.
- Porta, H. & Rocha-Sosa, M. (2001). Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event?. *Microbiology*, 147(12), 3199-3200.
- Porta, J. F. (2017). *Informante Clave*. Amigo y Productor Tambero de la localidad de Vila, departamento Castellanos, Sta. Fe, Arg. Comunicación vía telefónica (16/02/2017).
- Poulsen, M., Schwab, C., Jensen, B. B., Engberg, R. M., Spang, A., Canibe, N., ... & Weckwerth, W. (2013). Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature Communications*, 4, 1428.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M. J., Kift, N., ... & Castresana, C. (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant physiology*, 139(4), 1902-1913.
- Qu, R., Wang S., Lin, Y., Vance, V. B. & Huang, A. H. C. (1986). Characteristics and biosynthesis of membrane proteins of lipid bodies in the scutella of maize (*Zea mays* L.). *Biochem. J.*, 235, 57-65.
- Raisman, J. & Gonzalez, A. M. (2016). *Hipertextos del Área de la Biología*. FCA, UNNE. Corrientes, Argentina. Recuperado de www.biologia.edu.ar/ (Consultado 29/08/16)
- Ramos-Madrigal, J., Smith, B. D., Moreno Mayar, J. V., Gopalakrishnan, S., Ross Ibarra, J., Gilber, M. T. P. & Wales, N. (2016). Genome Sequence of a 5,310-Year-Old Maize Cob Provides Insights into the Early Stages of Maize Domestication. *Current Biology*, 26(23), 3195 – 3201.
- Rao, J., Cheng, F., Hu, C., Quan, S., Lin, H., Wang, J., Chen, G., Zhao, X., Alexander, D., Guo, L., Wang, G., Lai, J., Zhang, D. and Shi, J. (2014). Metabolic map of mature maize kernels. *Metabolomics*, 10, 775-787.
- Rao, J., Yang, L., Wang, C., Zhang, D. and Shi, J. (2015). Digital gene expression analysis of mature seeds of transgenic maize overexpressing *Aspergillus niger* phyA2 and its non-transgenic counterpart. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 4(2), 98-108.
- Reed, C. (2005). *Maíz estadounidense: almacenamiento en climas tropicales* (No. Folleto 1306). Washington, D.C., USA: Grains Council.
- Ritchie, S., Swanson, S. J. & Gilroy, S. (2000). Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research*, 10, 193-212.

- Rizzi, L., Galuppi, R., Simioli, M., Canestrari, G., Bonoli, C. & Tampieri, M. P. (2009). Grains colonised by moulds: fungal identification and headspace analysis of produced volatile metabolites. *Ital. J. Anim. Sci.*, 8(2), 334 - 336.
- Rodríguez, J. C., Bartosik, R. E., Malinarich, H. D., Exilart, J. P. & Nolasco, M. E. (2010). *Almacenaje de Granos en Bolsas Plásticas: Sistema Silobag*. EEA INTA Balcarce. Recuperado de <http://www.mejoravegetal.criba.edu.ar/> (consultado 13/06/2016).
- Rodriguez-Saona, C. (2012). La ecología química de interacciones tri-tróficas. *Temas selectos en Ecología química de insectos. El colegio de la Frontera Sur, Tapachula*, 315-341.
- Salas-Lizana, R. (2007). *La recombinación: relevancia evolutiva y métodos de estimación, con énfasis en microorganismos*. En Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. (Eds.) (2007). *Ecología molecular*. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología, UNAM, CONABIO, México. ISBN 978-968-817-839-3
- Salinas, P. (s.f.). VENADO TUERTO - Jornada con novedades en "El Recuerdo". *Nuevo ABC Rural SA*. Nardi J. L. (dir.). Extraído de www.nuevoabcrrural.com.ar/ (consultado 14/11/2016)
- Sampietro, D. A., Fauquel, C. M., Vattuone, M. A., Presello, D. A. & Catalán, C. A. N. (2012). Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Eur J Plant Pathol*, 135, 105–113.
- Sánchez-López, Á. M., Bahaji, A., De Diego, N., Baslam, M., Li, J., Muñoz, F. J., ... & Novák, O. (2016). Plant response to fungal volatiles is triggering by mechanisms independent of plastid phosphoglucose isomerase. *Plant Physiology*, pp-00945.
- Sanjeev, P., Chaudhary, D. P., Sreevastava, P., Saha, S., Rajenderan, A., Sekhar, J. C. & Chikkappa, G. K. (2014). Comparison of fatty acid profile of specialty maize to normal maize. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(6), 1001-1005.
- Sarandón S. & Flores, C (ed.) (2014). *Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables*. UNLP. ISBN: 978-950-34-1107-0
- Schaller, A. & Stintzi, A. (2008). *Jasmonate Biosynthesis and Signaling for Induced Plant Defense against Herbivory*. In Schaller, A (Ed.). *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer. ISBN: 978-1-4020-81811
- Schneider, C., Pratt, D. A., Porter, N. A. & Brash, A. R. (2007). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & biology*, 14(5), 473-488.
- Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., ... & Logrieco, A. (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research*, 107(06), 643-644.
- Sen A., Bergvinson, D., Miller, S. S., Atkinson, J., Fulcher R. G. & Amason, J. T. (1994). Distribution and Microchemical Detection of Phenolic Acids, Flavonoids, and Phenolic Acid Amides in Maize Kernels. *J. Agric. Food Chem*, 42, 1879-1883.
- Sheldon, J. L. (1904). A corn mold (*Fusarium moniliforme* n. sp.). *Agric. Exp. Stn. Nebraska, Annu. Rept*, 17, 23-43.
- Shephard, G. S., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Alberts, J. F. & Cawood, M. E. (1994). Distribution and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B 1 in a non-human primate. *Toxicon*, 32(6), 735-741.
- Shewry, P. R. & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of experimental botany*, 53(370), 947-958.
- Smith, M. C., Madec, S., Coton, E. & Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), 94.
- Surrey, K. (1964). Spectrophotometric method for determination of lipoxygenase activity. *Plant Physiology*, 39, 65.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3th Ed.). Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc., Publishers. ISBN 10: 0878938230.
- Theerakulkait, C. & Barrett, D. M. (1994). Partial purification and characterization of sweet corn germ lipoxygenase. *Journal of food Biochemistry*, 18(5), 355-372.
- Theerakulkait, C. & Barrett, D. M. (1995). Lipoxygenase in sweet corn germ: isolation and physicochemical properties. *Journal of food science*, 60(5), 1029-1033.
- Thrane, U. (2004). *Fusarium*. En Batt, C. A. and Tortorello, M. L. (ed.) (2014). *Encyclopedia of food microbiology* (2th ed.) Volume 2. USA: Academic press. ISBN: 978-0-12-384730-0
- Tovar-Benitez, T. (2008). *Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (Zea mays L) obtenido por diferentes métodos de aislamiento*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.
- Trematerra, P., Ianiro, R., Athanassiou, C. G. & Kavallieratos, N. G. (2013). Behavioral responses of *Sitophilus zeamais* Motschulsky adults to conditioned grain kernels. *Journal of stored products research*, 53, 77-81.
- Ueno, Y. (2000). Plenary lecture in international congress of Mycotoxins. Risk of multi-exposure to natural toxins. *Mycotoxins* 50, 13-22.

- Universidad Nacional de Córdoba (2012). *Morfología Vegetal: complemento teórico* (11ª ed.). Cátedra de Morfología vegetal, Escuela de Biología, FCEfyN, UNC. Córdoba.
- US Food and Drug Administration (2001). *Background paper in support of fumonisin levels in corn and corn products intended for human consumption*. US FDA: Silver Spring, MD, USA. Recuperado de www.fda.gov/food/ (consultado 06/11/2016)
- Usseglio, V. (2016). *Análisis de la actividad lipoxigenasa en posible relación con el mecanismo de defensa frente al ataque de Sitophilus zeamais Motschulsky y Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg en granos de Zea mays L.* Tesina de Grado, Carrera de Cs. Biológicas, FCEfyN, UNC.
- Usseglio, V., Pizzolitto, R., Rodriguez, C., Zunino, M., Zygadlo, J., Areco, V. & Dambolena, s. (s.f.). Volatile organic compounds from the interaction between Fusarium verticillioides and maize kernels as natural repellents of Sitophilus zeamais. *Manuscript* (en proceso de publicación)
- Vance, V. B. & Huang, A. H. C. (1987). The Major Protein from Lipid Bodies of Maize. Characterization and structure based on cDNA cloning. *The journal of biological chemistry* 262(23), 11275-11279.
- White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P. & Rivin, C. J. (2000). Gibberellins and Seed Development in Maize. I. Evidence That Gibberellin/Abscisic Acid Balance Governs Germination versus Maturation Pathways. *Plant Physiology*, 122, 1081-1088
- Williams, R. J. & Leopold, A. C. (1988). The Glassy State in Corn Embryos. *Plant Physiol*, 89, 977-981
- World Health Organization (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth [56rd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO technical report series 47.
- World Health Organization (2011). *Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth [74rd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. WHO technical report series; no. 966
- Wu, J. H., Wang, W. Q., Song, S. Q. & Cheng, H. Y. (2009). Reactive Oxygen Species Scavenging Enzymes and Down-Adjustment of Metabolism Level in Mitochondria Associated with Desiccation-Tolerance Acquisition of Maize Embryo. *Journal of integrative plant biology*, 51(7), 638-645.
- Wu, X., Liu, H., Wang, W., Chen, S., Hu, X. & Li, C. (2011). Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta physiologiae plantarum*, 33, 181-191.
- Xu, W., Wang, T., Xu, S., Li, F., Deng, C., Wu, L., ... & Bian, P. (2016). UV-C-Induced alleviation of transcriptional gene silencing through plant-plant communication: Key roles of jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. In Press
- Yan, Y., Christensen, S., Isakeit, T., Engelberth, J., Meeley, R., Hayward, A., ... & Kolomiets, M. V. (2012). Disruption of OPR7 and OPR8 reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense. *The Plant Cell*, 24(4), 1420-1436.
- Yeats, T. H. & Rose, J. K.C. (2013). The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant Physiology*, 163, 5-20.
- Zhang, W. (2000). Phylogeny of the grass family (Poaceae) from rpl16 intron sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15, 135-146.
- Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Rubinstein, H. R., Zygadlo, J. A. & Dambolena, J. S. (2015). Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus Fusarium verticillioides and the Maize Weevil Sitophilus zeamais. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7743-7749.
- Zygadlo, J. A. (2012). *Los Aceites Esenciales. Aspectos básicos de su química y biosíntesis. Composición de los aceites de plantas aromáticas argentinas*. En Zygadlo, J. A. (2012). *Aceites Esenciales. Química, Ecología, Comercio, Producción y Salud*. Córdoba, Arg.: Universitas, editorial científica universitaria. ISBN: 978-978-1457-63-2.

En esta última página aprovecharé para agradecer a todas las personas que de manera directa e indirecta formaron parte del presente trabajo. Trabajo éste, cuya importancia, para mí, recae en que deja plasmado, físicamente, un arduo proceso de formación y cierre de una importantísima etapa de mi vida. Un cierre que da lugar al inicio de otro proceso, otra etapa, que he anhelado alcanzar estos últimos años...

Así, en primera instancia agradeceré a mis padres, Gustavo y Silvana, que hace aprox. 7 años me dieron la libertad de elegir a gusto la carrera universitaria a seguir y por bancar un casi destierro de un hijo.

Sentimiento padecido por mí durante el inicio de dicha odisea. También a mis hermanos, abuelos, tíos, padrino Marcelo Jacquat y madrina Silvana Candiano, primos y familia en general. Quienes de manera más o menos directa, me han acompañado en estos 7 años también. Puntualmente agradezco y dedico también este trabajo a mi abuelo Omar Candiano, cuya presencia física se encuentra en los átomos y moléculas elementales de la vida, pero su recuerdo perdura hasta la actualidad. Lo mismo vale para su hija, mi tía, Raquel Candiano. Gran parte de mi primera infancia fue forjada con él. También a mi abuelo Alberto Jacquat que me acompañó y me acompaña en la actualidad y fue quien contempló caprichos, no tan típicos, de un nieto. A todos, gracias.

*En segunda instancia al Dr, Julio Zygodlo, director de la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales que fue por quien pedí, y quien me recibió, cuando un capricho mío por hacer una ayudantía en investigación me llevó hacia tal sitio, allá por el 2012 si mal no recuerdo. Unos pares de meses trabajando con el gorgojo de la harina *Tribolium castaneum*, bajo la dirección de la Dra. María Paula Zunino... y luego abandone.*

En tercer lugar a los Drs. Paula Zunino y Sebastián Dambolena, quienes me recibieron allá por el 2014 y me dirigieron en la "interminable" tesina de grado, hasta el día de hoy. Cabe destacar el apoyo profesional y moral, y consejos que recibí de ambos directores lo que me ayudó marcadamente a desarrollarme personal y académicamente. Son sin dudas dos ejemplos a seguir. Estoy muy agradecido.

También quiero dar mis gracias a la Dra, Alicia Lamarque por su calidez y buena predisposición a enseñarme la técnica electroforética, resultado también de capricho por "saber qué es lo que faltaba o se adicionaba de proteínas en esos maíces" después de los tratamientos. A todos mis compañeros del laboratorio, con quienes compartimos un montón de tiempo dentro de esas paredes llenas de artefactos, y entre bichos y hongos, mates y comidas... Compañeros que forman parte también del grupo "bioplaguicidas", grupo que se reúne regularmente a festejar con una torta, cual recibida o cumpleaños se presente. Sumado a esto, también están todos los miembros de la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales que también forman parte de tal memorable, sana y cálida "tradición".

Fuera de este espacio académico también quiero agradecer a mis amigos de la vida, infancia y adolescencia, de la primaria, secundaria y de la universidad, del asado de fin de semana, de la "joda" y de otros ambientes, que nos hemos cruzados en distintos momentos, y que con algunos no hemos distanciado naturalmente y con otros los lazos siguen firmes. La gran mayoría de ellos seguro tuvo que aguantar algún monólogo mío o alguna idea incoherente u otro capricho. No quiero dar nombre particulares...

Volviendo un poco, puntualmente quiero agradecer a mis amigos Juan Porta y Fabricio Lucca que me brindaron información clara sobre distintos aspectos de temas desarrollados en la presente, y a Guillermo Flores por el "abstract".

Fin