

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**“Participación de la fumonisina B1 como factor de
patogenicidad en la interacción maíz (*Zea mays*)-
Fusarium verticillioides”**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Autor: Silvina Lorena Arias

Director de Tesis: Dr. Héctor R. Rubinstein

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología- CIBICI
(CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias
Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

AÑO: 2014

BIBLIOTECA DE QUÍMICA ORGÁNICA

Clasificación: B-T
576.763
A
Número: 13.824
Autor: Autor
Fecha de compra: 14/09/20

gml

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Director de Tesis:



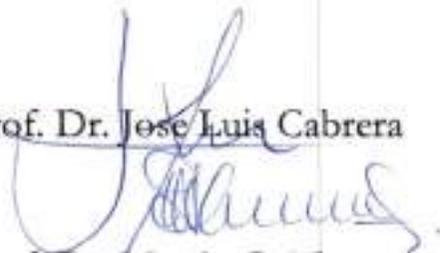
Prof. Dr. Héctor R. Rubinstein

Comisión asesora:



Prof. Dra. María Elena Álvarez

Prof. Dr. José Luis Cabrera



Prof. Dr. Martín G. Theumer

Evaluador externo:



Prof. Dra. Lilia Cavaglieri

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Rubinstein por abrirme las puertas de su laboratorio, escuchar mis ideas, darme libertad para trabajar, y guiarme con afecto sin soltarme la mano, por este camino.

A Martín, por tu tiempo, paciencia y calidez, por enseñarme tantas cosas, por el afecto y todos los momentos compartidos.

A los miembros de la Comisión de Tesis, Dra Álvarez y Dr. Cabrera, por sus valiosos aportes y ayudarme a crecer y superarme.

A mis padres, Carlos y Susana, por creer en mí, por su amor y acompañamiento incondicional.

A mis hermanas Vale y Dani y a Ceci y Fer y a mi solcito Agustina, a Carolina, a Luci, a Juli, Augusto y a mis queridos amigos y amigas, por estar siempre y brindarme tanta alegría.

A mis compañeros del laboratorio y docencia: Vero, Santi, Seba, Abel y a cada uno de los integrantes del laboratorio 109, a Luciana, Lore, Vero, Dai, Flor, Cristian, Franco, Ana Paula, Marianela, José y Laura Ch. y Laura C. por todos los momentos compartidos y quienes hacen del trabajo un lugar muy ameno.

Al Doctor Wunderlin, al Doctor Urcelay y al Doctor Alemano por su inmensa ayuda, excelente predisposición y consejos.

Al Doctor Presello por su amabilidad y generosidad.

A todos los integrantes del Dpto de Bioquímica Clínica y del CIBICI, especialmente a Adriana, Ale, Laura, Lili, por compartir todos estos años.

A cada uno de los integrantes del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), y del Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), por extenderme la mano y darme un lugar cada vez que lo necesité.

A cada uno de los miembros del Laboratorio de Bromatología, del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC), a Nati, Gabi, Ana, Rocío, Romi, Euge, Mariana, Vero, Teté, Vale, Turco, Lucas, Lidwina, por recibirme e integrarme con cordialidad y por su gran ayuda y colaboración desde los inicios de este trabajo.

A la Doctora Waldina Reyes, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, por el cariño y el respeto y la valiosa experiencia vivida.

ABREVIATURAS	V
RESÚMEN	VI
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. LAS MICOTOXINAS: HONGOS PRODUCTORES Y SU IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE CEREALES Y ALIMENTOS EN BASE A CEREALES.....	2
2. ESPECIES DE <i>Fusarium</i> : INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.....	4
2.1. Patosistema: <i>Fusarium verticillioides</i> - <i>Zea mays</i>	5
2.2. <i>F. verticillioides</i> : Agente causal de enfermedades relacionadas con deterioros y pudrición de la semilla y pudrición de raíces en plantas jóvenes de maíz.....	6
2.3. Resistencia de los cultivares de maíz.....	7
3. FUMONISINAS: ESTRUCTURA QUÍMICA, BIOSÍNTESIS Y TOXICIDAD.....	7
3.1. Toxicidad en animales y humanos.....	9
3.2. Toxicidad y mecanismos de detoxificación en plantas.....	10
4. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS.....	12
4.1. Defensa basal o PTI.....	13
4.2. Defensa específica o ETI.....	14
4.3. Rutas de señalización implicadas en la defensa.....	15
4.4. Metabolismo de los esfingolípidos en plantas.....	17
OBJETIVOS	20
RESULTADOS	22
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL PATOSISTEMA <i>Zea mays</i>-<i>Fusarium verticillioides</i>	23
1. PERFIL TOXICOGÉNICO DE <i>F. verticillioides</i> RC2024.....	23
2. EFECTOS DE LA INFECCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL.....	23
2.1. Altura y longitud de la raíz principal.....	23
2.2. Peso seco de la porción aérea, raíz y biomasa total.....	24
3. DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA INVASIÓN DEL MAÍZ POR <i>F. verticillioides</i>	27
3.1. Microscopía.....	27
3.2. Aislamiento fúngico.....	27
4. EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES.....	28

4.1. Morfología del sistema radical: Diferencia entre genotipos de maíz.....	29
4.2. Longitud específica de raíz	30
5. CONCLUSIÓN.....	31
CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LOS EFECTOS FITOTÓXICOS DE LA FB1 EN MAÍZ.....	32
1. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FB1.....	32
2. EFECTOS DE LA FB1 SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL.....	33
2.1. Altura y longitud de la raíz principal.....	33
2.2. Peso seco de la porción aérea, raíz y biomasa total.....	33
3. ACCIÓN FITOTÓXICA DE LA FB1.....	35
4. CONTENIDO EN LA MATERIA SECA DE HOJA.....	36
5. EFECTO DE LA INFECCIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES.....	37
5.1. Longitud específica de raíz	38
6. CONCLUSIÓN.....	39
CAPÍTULO III: BIODISTRIBUCIÓN DE FB1 EN TEJIDO VEGETAL Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO.....	41
1. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE FB1.....	41
1.1. Identificación y cuantificación de FB1 en híbridos de maíz.....	41
1.2. Bioacumulación de FB1 en raíces.....	42
1.3. Bioacumulación de FB1 en parte aérea de las plántulas.....	44
1.4. Bioacumulación de FB1 en arena.....	46
2. ALTERACIONES ASOCIADAS AL METABOLISMO LIPÍDICO EN MAÍZ INDUCIDOS POR <i>F. verticillioides</i> y FB1.....	47
2.1. Identificación y cuantificación de bases esfingoides en plántulas de maíz.....	47
2.2. Cambios en los niveles endógenos de esfinganina (Sa) en tejidos vegetales.....	49
2.3. Cambios en los niveles endógenos de fitoesfingosina (Pso) en tejidos vegetales.....	51
2.4. Bioacumulación de bases esfingoides durante la respuesta de defensa del maíz al patógeno <i>F. verticillioides</i> y a FB1.....	54
3. CONCLUSIÓN.....	56
CAPÍTULO IV: MUERTE CELULAR Y PERFIL DE FITOHORMONAS	57
1. MUERTE CELULAR CAUSADA POR <i>F. verticillioides</i>	57
2. PERFIL DE FITOHORMONAS INDUCIDO POR LA INFECCIÓN CON <i>F. verticillioides</i> Y POR LA EXPOSICIÓN A FB1.....	58
3. CONCLUSIÓN.....	59

DISCUSIÓN	60
1. CRONOLOGÍA DE LA COLONIZACIÓN FÚNGICA SISTÉMICA EN HR E HS.....	61
2. DIFERENCIAS EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN CON <i>F. verticillioides</i>	62
3. EFECTOS DEL RIEGO CON FBI EN EL CRECIMIENTO Y EN LA MANIFESTACIÓN DE SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.....	64
4. BIODISTRIBUCIÓN DE FBI.....	67
5. DISRUPCIÓN EN EL METABOLISMO DE ESPINGOLÍPIDOS EN MAÍZ Y SU EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA A <i>F. verticillioides</i> Y A FBI.....	69
6. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DE OTRAS FITOHORMONAS EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN Y FBI.....	72
7. CONCLUSIÓN FINAL.....	74
 MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. MATERIALES.....	76
1.1. Reactivos.....	76
1.2. Medios de cultivo.....	76
1.3. Genotipos de maíz: Selección de las semillas.....	77
1.4. Cepa fúngica.....	77
a) Preparación del inóculo.....	77
b) Evaluación de la capacidad toxicogénica.....	78
c) Extracción y cuantificación de fumonisinas por HPLC- FL.....	78
2. PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS EN BIORREACTOR.....	79
3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	79
3.1. Acondicionamiento e infección de las semillas.....	81
3.2. Condiciones de siembra.....	81
4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD.....	81
4.1. Estudio de parámetros de desarrollo de las plántulas.....	81
4.2. Evaluación macroscópica de síntomas de enfermedad.....	82
5. CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN FÚNGICA.....	82
5.1. Aislamiento fúngico.....	82
5.2. Evaluación microscópica.....	82
6. MORFOLOGÍA RADICAL.....	83

7. CONTENIDO DE MATERIA SECA DE HOJA.....	83
8. CUANTIFICACIÓN DE FB1 Y BASES ESFINGOIDES (Sa y Pso) POR LC-MS/MS	83
9. EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR.....	84
10. CUANTIFICACIÓN DE FITOHORMONAS POR LC-MS/MS.....	84
11. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA.....	85
REFERENCIAS.....	86
PUBLICACIONES.....	101

ABREVIATURAS

ABA:	Ácido Abscísico
BE:	Bases esfingoides
CS:	Ceramida sintetas
DAMP:	Patrón molecular asociado a daño
dps:	Días post-siembra
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
ETI:	Inmunidad gatillada por efectores
FB:	Fumonisinias de la serie B
FB1:	Fumonisina B1
FB2:	Fumonisina B2
FB3:	Fumonisina B3
FB4:	Fumonisina B4
FH:	Fitohormona
GA:	Giberelina
HR:	Híbrido resistente
HS:	Híbrido susceptible
JA:	Ácido Jasmónico
LCB:	Base de cadena larga
LDMC:	Contenido en la materia seca en hojas
LEME:	Leucoencefalomalacia equina
MAMP:	Patrón molecular asociado a microorganismos
MCP:	Muerte celular programada
PAMP:	Patrón molecular asociado a patógenos
PKS	Policétido sintasa
Pso:	Fitoesfingosina
Pso-1-P:	Fitoesfingosina 1- fosfato
PTI:	Inmunidad gatillada por PAMPs
RH:	Respuesta hipersensible.
RSA:	Resistencia sistémica adquirida
SA:	Ácido salicílico
Sa:	Esfinganina
Sa-1-P:	Esfinganina 1- fosfato
So:	Esfingosina
SRL:	Longitud radical específica

RESÚMEN

Fusarium verticillioides es el principal patógeno del maíz y limitante de la productividad del cultivo en el mundo, ocasionando considerables pérdidas económicas año tras año. El hongo hemibiotrófico puede infectar a la semilla desde su formación y sobrevivir en ésta para luego acceder a la plántula durante la germinación y desarrollo post-germinativo e inducir enfermedades como vuelco y podredumbre de espiga y granos. *F. verticillioides* puede producir fumonisina B1 (FB1), cuya presencia en productos agrícolas causa gran preocupación, debido a los efectos que ocasionan cuando animales y humanos la consumen. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar otro aspecto relevante de la biología de la FB1: su posible contribución como factor de patogenicidad de *F. verticillioides* en maíz.

En este estudio se estableció un sistema de infección de semillas de maíz con la cepa toxicogénica de *F. verticillioides* RC2024 y un sistema de toxicidad mediante riego con solución acuosa de FB1, a dos concentraciones: 1 y 20 ppm, a los 2, 4 y 6 días post-siembra (dps). En los ensayos se utilizaron plántulas de maíz obtenidas a partir semillas de híbridos resistente (HR) y susceptible (HS), cosechadas a los 7, 14 y 21 dps.

La FB1 reprodujo, en gran parte, los síntomas de enfermedad observados en la infección fúngica. Sin embargo, se registraron variaciones de acuerdo a la dosis de toxina utilizada. A niveles de 1 ppm, FB1 causó disminución en la biomasa inicial de ambos híbridos, sin embargo a los 21 dps se restablecieron los parámetros de crecimiento vegetativos, sugiriendo la posible existencia de mecanismos de detoxificación eficientes para ese nivel de exposición. A niveles de 20 ppm, los procesos de detoxificación no serían efectivos, afectando severamente el ciclo de desarrollo (*developmental timing*) de las plántulas e induciendo posiblemente una senescencia temprana en maíz. Los síntomas de enfermedad causados por *F. verticillioides* estarían relacionados en parte con los desbalances lipídicos generados en la planta por exposición a la toxina. En plántulas resistentes, específicamente en raíz, el incremento de las bases esfingoides liderado por esfingarina, activaría las rutas de señalización que conducen a inducir muerte celular, que acompañado de incrementos de ácido salicílico, determinarían una respuesta de defensa fenotípicamente resistente. Por otro lado, en el HS FB1 induciría un aumento principalmente de fitoesfingosina, cuyo incremento no estaría operando en la vía de señalización que conduce a la muerte celular y que conjuntamente con la participación del ácido abscísico como regulador negativo de la resistencia, contribuirían a direccionar un perfil de respuesta de susceptibilidad a la patogénesis.

Teniendo en cuenta las evidencias bioquímicas del efecto fitotóxico de la FB1 en tejidos de plántulas de maíz, esta micotoxina incrementaría la capacidad de *F. verticillioides* para producir enfermedad, al interferir con funciones específicas de la célula hospedera y, promover la colonización del microorganismo en el tejido vegetal.

De acuerdo a los resultados de los estudios realizados en este trabajo de tesis, FB1 es un factor de fitopatogenicidad de *F. verticillioides* en maíz.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is the major pathogen of maize (*Zea mays*) worldwide causing significant yield and economic losses. The hemibiotrophic fungus can infect the plant through the seed. The infection can start from fungal conidia or mycelia that are carried inside the seeds, develop inside the young plant, and induce diseases such as root rot, stalk rot, wilting and lodging. *F. verticillioides* can produce fumonisin B1 (FB1) that cause a potential health risk when contaminated grain is consumed in human and animal food products. The aim of this thesis was to evaluate another important aspect of the biology of FB1: their potential role as pathogenicity factor of *F. verticillioides* in maize.

In this study, the different parameters were analyzed in seedlings from maize seeds of resistant (RH) and susceptible (SH) hybrids inoculated with a toxicogenic strain of *F. verticillioides* RC 2024 (infection system) or watered with 1 and 20 ppm solutions of fumonisins (toxicity system) at 7, 14 and 21 days after planting (dap).

FB1 displayed lesions similar to those seen in *F. verticillioides* seedling disease. However, varying responses according fumonisin concentration were recorded. In the case of a low dose (1 ppm), the toxin caused initial reduction in biomass in both hybrids, resulting in the restore of the vegetative growth parameters at 21 dap. According to the results, the detoxification/excretion processes could be a strategy for the host to achieve the compensatory response. On the other hand, detoxification process could not be effective at levels of 20 ppm, affecting the developmental timing of the seedlings; inducing probably an early senescence in maize.

The disease symptoms caused by *F. verticillioides* could be related, at least in part, with lipid changes observed in the plant due to FB1 exposure. In resistant seedling, specifically in root, the high accumulation of sphingoid bases mainly by sphinganine, could activate signaling pathways that lead to induce cell death, which with the salicylic acid increase, determine a phenotypically resistant defense response. On the other hand, in SH, FB1 may induce mainly high levels of phytosphingosine, the increase may not be operating in the signaling pathway leading to cell death and these effects with the participation of abscisic acid as a negative regulator of the resistance, help to address a response profile of pathogenesis susceptibility.

Considering the biochemical evidence of the phytotoxic-effect of FB1 in tissues of maize seedlings, this mycotoxin may increase the ability of *F. verticillioides* to cause disease by interfering with specific functions of the host cell and promoting the colonization of the microorganism in the plant tissue.

According to the results of the studies in this thesis, FB1 is a phytopathogenicity factor of *F. verticillioides* in maize.

INTRODUCCIÓN

1. LAS MICOTOXINAS: HONGOS PRODUCTORES Y SU IMPACTO EN LA PRODUCCIÓN DE CEREALES Y ALIMENTOS EN BASE A CEREALES

Las micotoxinas son sustancias frecuentemente encontradas en los cereales y alimentos a base de cereales, sintetizadas por hongos filamentosos cuando el micelio está sujeto a limitaciones de algunos nutrientes, pero con disponibilidad de fuentes carbonadas. La biosíntesis de estos compuestos ocurre fundamentalmente cuando el desarrollo del micelio se ha detenido durante la fase estacionaria de crecimiento. El metabolismo primario genera productos que son usados como sustratos del metabolismo secundario, mediante el cual son sintetizadas las micotoxinas, las cuales carecen, en su mayoría, de funciones conocidas para la fisiología del hongo que las produce [1].

Actualmente se cree que estos compuestos podrían tener diferentes funciones en el crecimiento, supervivencia y defensa de los hongos que la producen, actuando como factores de virulencia, favoreciendo la colonización fúngica, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos o actuando como hormonas sexuales o factores de diferenciación [2-3]. Además, se han establecido conexiones genéticas entre la esporulación y la producción de toxinas [4-5]. Algunos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, estimulan la formación de esporas, las protegen en el medioambiente y pueden favorecer o inhibir su germinación [3]. Esta observación hace pensar en la posible relación beneficiosa para el hongo entre la esporulación y el metabolismo secundario. Este último podría favorecer la diseminación y supervivencia del micelio, proporcionando un mecanismo mediante el cual se reprima la germinación de esporas cuando no existan condiciones ambientales favorables para su desarrollo.

Las aproximadamente cuatrocientas micotoxinas que han sido aisladas y caracterizadas químicamente hasta el presente son producidas fundamentalmente por cuatro géneros fúngicos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* [6]. A pesar de esto, no todas las especies incluidas dentro de estos géneros tienen la capacidad para sintetizarlas y, por otro lado, dentro de un género y especie fúngica productora de micotoxinas, puede haber cepas que presenten diferente capacidad toxicogénica [7]. Estos mohos son clasificados como ambientales y algunos de ellos pueden comportarse como endófitos, e infectar tempranamente a los cereales durante su cultivo en el campo.

Las micotoxinas que tienen mayor importancia en la salud y en la actividad agronómica son: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, toxinas tremorgénicas y los alcaloides del cornezuelo de centeno [8]. En los últimos años existe un interés creciente por las denominadas micotoxinas emergentes, particularmente en la fusaproliferina, beauvericina, enniatinas y moniliformina. La identificación y cuantificación de nuevos metabolitos secundarios de mohos toxicogénicos, aún en muy bajas concentraciones, se debe al desarrollo de nuevos métodos analíticos con mayores

sensibilidades como por ejemplo la espectrometría de masas [9]. Por otro lado, son necesarios estudios predictivos de la producción de micotoxinas relacionados con el cambio climático global, como medida de prevención ante posibles expansiones de las zonas geográficas, con temperaturas que se convertirán en óptimas para el crecimiento y toxicogénesis de especies productoras [10].

Actualmente, el riesgo toxicológico asociado con las micotoxinas se ha convertido en un aspecto central del problema de la invasión fúngica de los cultivos o de los granos almacenados [11]. Luego de su síntesis durante el crecimiento y almacenamiento de los cereales, los tratamientos tecnológicos de elaboración de alimentos no logran destruirlas eficientemente, e ingresan en la cadena alimentaria de humanos y de animales de producción causando micotoxicosis, originando pérdidas anuales de varios millones de dólares, no sólo debido a los problemas causados en la salud pública, sino además por la desvalorización de los productos agrícolas. El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los principales cereales que se cultivan y consumen en el mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se produce almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios, como así también parte de la producción se destina para la obtención de biocombustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y, tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan como forraje [12].

Según la proyección de la FAO 2013/2014 a nivel mundial, la Argentina seguirá ocupando el 3° lugar como país exportador de maíz, luego de los Estados Unidos y Brasil [13], y el 5° lugar como país productor, con un tamaño de cosecha record registrada en el 2013 que ascendió a los 32 millones de toneladas anuales [14]. Este dato adquiere relevancia si se tiene en cuenta que la producción de 2012 fue de 21,2 millones de toneladas y la de 2011 de 23,8 millones. En este aspecto, la Provincia de Córdoba ocupa un lugar de singular importancia económica para la Argentina, ubicándose entre los primeros lugares en la producción de este cereal, constituyendo el cinturón maicero junto a las Provincias de Bs. As. y Santa Fe [15].

En lo que respecta al consumo interno, en la Argentina existe escasa reglamentación actualizada sobre los límites máximos permitidos de micotoxinas en alimentos destinados tanto para consumo humano como de animales. Actualmente algunas disposiciones internacionales regulan estrictamente los niveles permitidos de estos contaminantes, afectando directamente al comercio internacional y por lo tanto a productores y proveedores [16].

Aumentar las competitividades de los productos argentinos en los mercados internacionales es una meta crítica para conservar y mejorar los posicionamientos logrados. Recientemente, la legislación de la Unión Europea sobre la autorización y uso de pesticidas ha determinado la salida del mercado de

muchos compuestos usados para el control de enfermedades de los cultivos. Estas resoluciones impactarán fuertemente en la producción aumentando sus costos, disminuyendo los rindes, e incrementando los riesgos de mayor resistencia a pesticidas en los patógenos más frecuentes [17]. Se espera, además, que estas reglamentaciones sean cada vez más estrictas, limitando el uso de tóxicos para la salud o el medioambiente. Por esto, es necesario explorar nuevas estrategias para el control de enfermedades de los cultivos.

2. ESPECIES DE *Fusarium*: INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Fusarium es un género cosmopolita de hongos filamentosos ascomicetos (Sordariomicetos: Hipocreales: Nectriaceae) que incluye especies fitopatógenas productoras de toxinas de importancia para la agricultura [18]. Están ampliamente distribuidos en suelos, aguas y sustratos orgánicos y se encuentran en todas las regiones agroclimáticas [19]. La clave de Nelson, Tousson y Marasas divide al género *Fusarium* en 12 secciones [20]. Las especies toxicogénicas comúnmente aisladas de alimentos están incluidas en las secciones *Liseola* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. rygamaei*, *F. subglutinans*), *Sporotrichiella* (*F. sporotrichioides*, *F. poae*), *Gibbosum* (*F. equiseti*), *Discolor* (*F. graminearum*, *F. colmorum*) y *Elegans* (*F. oxysporum*) [21]. Asimismo, *Gibberella fujikuroi* (Sawada) es el teleomorfo de muchas de las especies de anamorfos conidiales en el género *Fusarium* sección *Liseola*, incluyendo *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (ex *F. moniliforme* Sheldon), *F. subglutinans* (Wollenweber y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas; y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (Nelson y cols.). *G. fujikuroi* comprende al menos 7 poblaciones de apareamiento, designadas de la A a la G [22], siendo la población A, la más común en maíz y la población F la que con mayor frecuencia se encuentra en sorgo. Según el concepto evolutivo de especies, los estados teleomorfos de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* pertenecen a las poblaciones de apareamiento A y D, respectivamente. Esta es una distinción importante dado que la población A contiene muchas especies prolíficas productoras de fumonisinas.

Colectivamente, las patologías causadas por *Fusarium* spp. comprenden enfermedades de la plántula, podredumbres, tizones o fusariosis, marchitamientos y úlceras de muchos cultivos hortícolas, extensivos, ornamentales y forestales, en los ecosistemas tanto agrícolas como naturales. Aunque estos patógenos afectan un amplio rango de cultivos y están ampliamente distribuidos, alguna de estas especies, como *F. verticillioides* y *F. graminearum*, tienen un rango estrecho de hospedadores, afectando principalmente a los cereales. De manera contraria, *F. oxysporum* infecta a un rango amplio de vegetales, incluyendo plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas [23]. Además de presentar diferencias en la especificidad y adaptación al hospedador, estas especies fúngicas también varían en relación a su estrategia reproductiva (Figura 1). Algunas, como *F. oxysporum*, son asexuales, mientras que *F.*

verticillioides y *F. graminearum* poseen ambas condiciones reproductivas: asexual (autofertilidad u homotalismo) y sexual (conjugación obligada o heterotalismo) [23].

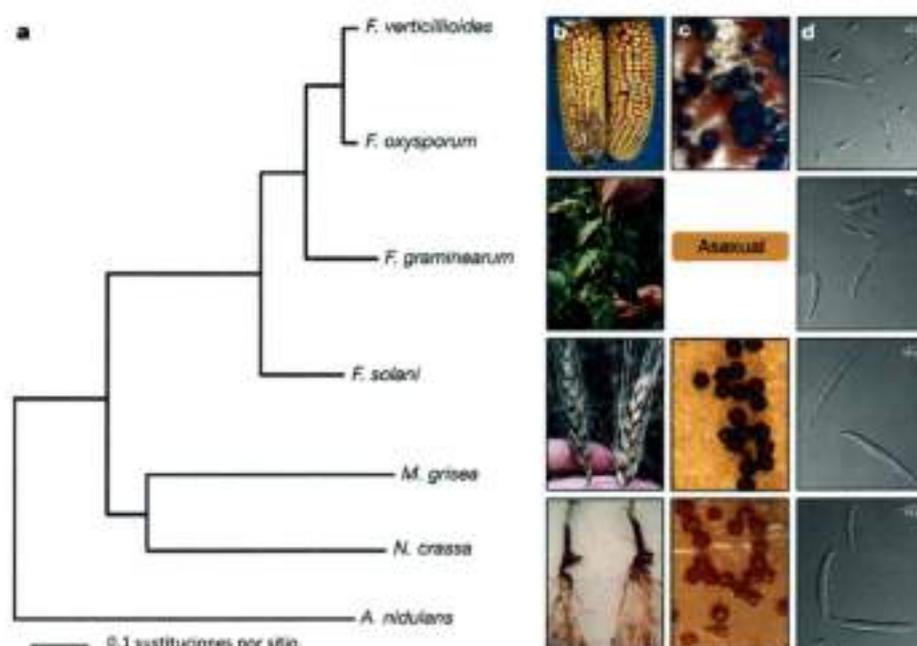


Figura 1: Relación filogenética de 4 especies de *Fusarium* en relación a otros hongos ascomicetos y variaciones fenotípicas.

a, Árbol filogenético obtenido mediante el método de verosimilitud usando secuencias de proteínas concatenadas basados en el análisis de 100 genes seleccionados al azar a partir de 4694 genes ortólogos de *Fusarium* spp. que poseen una correlación 1:1:1:1 entre los genomas de *Fusarium* spp. y una única conexión con *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*. **b-d**: Variación fenotípica de 4 especies de *Fusarium* de importancia agronómica: **b**, síntomas de enfermedad (de arriba hacia abajo): podredumbre de la mazorca por *F. verticillioides*, marchitez del tomate por *F. oxysporum*, Fusariosis de la espiga de trigo por *F. graminearum* y podredumbre de la raíz de plantas de arvejas por *F. solani*; **c**, estado teleomórfico o peritecial de *F. verticillioides* (*Gibberella fujikuroi*), *F. oxysporum* (no posee estado sexual), *F. graminearum* (*G. zeae*) y *F. solani* (*Nectria haematococca*); y **d**, micro- y macroconidias de *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. graminearum* y *F. solani*. (*F. graminearum* produce sólo macroconidias) Adaptado de Ma y cols., 2010 [23].

2.1. Patosistema: *Fusarium verticillioides*-*Zea mays*

Fusarium verticillioides es una de las especies que con mayor frecuencia contamina el maíz en todo el mundo, y en donde pasa la mayor parte de su ciclo de vida. Además, el hongo puede existir como saprófito facultativo, y sólo en esta etapa se ha podido observar su fase teleomórfica [24].

El ciclo de infección y enfermedad en el sistema *F. verticillioides*-maíz es complejo. El hongo puede infectar las semillas y/o raíces de la planta a partir de su presencia en los residuos de las plantas o en el

suelo, en donde el mismo no produce clamidosporas, pero puede producir una hifa de mayor grosor que aparentemente prolonga su sobrevivencia. Puede permanecer en el suelo dentro de los fragmentos de los tallos enterrados a 30 cm. de la superficie, con humedad de 5 a 35% y temperatura de 5 a 10 °C durante 12 meses. *Fusarium verticillioides* produce macroconidias y abundantes microconidias, las cuales pueden ser liberadas bajo condiciones cálidas y húmedas y ser diseminadas por el viento hasta los tallos y espigas del maíz, pudiendo penetrar directamente a través de las heridas e iniciar la infección primaria. Las microconidias pueden, a su vez, facilitar el movimiento fúngico dentro de la planta. Existe otra vía de dispersión de las esporas por el viento en la superficie de las hojas, de donde son dispersadas hacia las vías foliares y tallo, y desde allí la infección secundaria podrá progresar hacia el tallo, las hojas y las espigas a través de los canales de los estilos [25-26].

Es importante reconocer que no todos los hongos fitopatógenos actúan sobre sus hospedadores de la misma manera. En relación a esto, *F. verticillioides* y otras especies de *Fusarium* como por ejemplo *F. graminearum* y *F. oxysporum*, se pueden clasificar como hemibiotróficos [27-28] dado que luego de la infección, mantienen al huésped vivo, estableciendo una relación de nutrición a largo plazo, de manera similar a los biotróficos, pero luego matan al tejido de la planta y continúan su ciclo como saprófito, incluyendo generalmente la esporulación.

2.2. *Fusarium verticillioides* agente causal de enfermedades relacionadas con deterioro y pudrición de las semillas y pudrición de raíces en plantas jóvenes de maíz

Fusarium verticillioides ataca todos los estados de crecimiento de la planta y a diferentes partes de la misma induciendo enfermedades pre y post-cosecha, afectando la calidad de la semilla/grano. La enfermedad del maíz es iniciada por diferentes factores, la mayoría desconocidos. Entre las enfermedades originadas por *F. verticillioides* se encuentran el tizón de plántula y el vuelco (podredumbre de raíz y tallo) y podredumbre de la espiga y granos.

Sin embargo, las principales enfermedades del maíz están relacionadas con las fases de establecimiento del cultivo, donde ocurren problemas de germinación y muerte de la plántula [29]. En Argentina, *F. verticillioides*, es el patógeno más frecuentemente detectado en semillas y es uno de los principales agentes causales de pudriciones de raíces y tallos en plántulas de maíz [29-30]. Puede causar pudrición de la semilla y a medida que la plántula se desarrolla, infectar a las raíces primarias, luego a las raíces seminales y mesocótilo. En esta fase, en general, los daños provocados pueden pasar inadvertidos y difícilmente se logra identificar al agente causal. Los síntomas secundarios, en la parte aérea de la planta, pueden manifestarse como marchitamiento, amarilleamiento y subdesarrollo. En el cultivo, las plantas afectadas son más visibles en suelos compactados, encharcados y con desequilibrio nutricional. Puede ocurrir también muerte de la plántula en la pre o post-emergencia. Los síntomas más comunes son del

tipo pudrición blanda, verificados en la pre-emergencia cuando la siembra es realizada profundamente y en suelo húmedo y frío (<15 °C).

Cuando la pudrición causada por *F. verticillioides* afecta las raíces, base del tallo y nudos inferiores, puede causar el quiebre del tallo y vuelco, madurez prematura y muerte precoz de la planta. Uno de los principales problemas con este patógeno es que todavía existen pocas opciones para un manejo efectivo de la enfermedad que causa en maíz [30], por lo que resulta importante promover, desde los inicios del cultivo, un sistema radicular sano que genere plantas con una altura normal y con cañas más gruesas, de manera de incrementar su tolerancia a las podredumbres de raíz y tallo que afectan a plantas adultas.

2.3. Resistencia de los cultivares de maíz

Con respecto a las enfermedades del maíz causadas por *F. verticillioides*, investigaciones previas indican una estrecha correlación entre la severidad de síntomas y la concentración de micotoxinas cuando se expone un rango de resistencia genética del hospedante a infecciones por este patógeno. Por lo tanto, una de las formas para prevenir la contaminación con toxinas fúngicas, es el uso y desarrollo de cultivares menos susceptibles a la enfermedad [31-34]. Sin embargo, en la actualidad, tanto híbridos de maíces comerciales como líneas endogámicas no alcanzan el nivel de resistencia deseada [35-36].

Presello y cols. [32] evaluaron la resistencia a *F. verticillioides* y *F. graminearum*, en híbridos argentinos en Canadá y Argentina y concluyeron que el genotipo de los híbridos fue más importante que los efectos genotipo-especies fúngicas o que los efectos de interacción genotipo-especie fúngica-medioambiente. Sin embargo, resultados subsecuentes indicaron que el rol de las toxinas de *F. verticillioides* (las fumonisinas) depende del medio ambiente y del contexto genético en esta interacción patógeno-planta [37]. Se ha estudiado que la resistencia a la podredumbre de espiga causada por *Fusarium* spp. está bajo control poligénico y se encuentra fuertemente influenciada por factores ambientales, sin haberse descubierto, hasta el momento, genotipos completamente resistentes [31; 38].

3. FUMONISINAS: ESTRUCTURA QUÍMICA, BIOSÍNTESIS Y TOXICIDAD

En 1988, Gelderblom y cols. [39] describieron que las fumonisinas, una nueva clase de micotoxinas identificadas a partir de cultivos de *Fusarium verticillioides* (Syn. *Fusarium moniliforme*), poseían actividad promotora de cáncer. Este hallazgo representó un quiebre en lo que respecta a la investigación de enfermedades humanas y de animales asociadas con el consumo de maíz contaminado con *F. verticillioides*. Adicionalmente, despertó el interés en el estudio de la fitopatología de los patógenos más importantes del maíz.

Químicamente, las fumonisinas son aminopolioles cuya estructura principal consiste en una cadena lineal de 20 átomos de carbono, la cual tiene un grupo amino en el carbono 2, junto con grupos

metilos, hidroxilos y ácidos tricarbóxicos en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado [40] (Figura II). Según los grupos químicos presentes a lo largo de la cadena lineal, las fumonisinas se pueden clasificar en cuatro series: fumonisinas A, B, C y P [41-42]. Las fumonisinas de la serie B (FB) son las más abundantes en maíz contaminado de manera natural [43] y en función de la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 se distinguen a cuatro fumonisinas: FB1, FB2, FB3 y FB4 [40]. La fumonisina más importante es la FB1, por toxicidad y por abundancia, ya que puede constituir hasta el 70% de todas las fumonisinas presentes en los alimentos [43]. Las otras fumonisinas de la serie B, especialmente FB2 y la FB3, aparecen en niveles más bajos, constituyendo entre el 10 y el 20% del contenido total de fumonisinas, respectivamente [42].

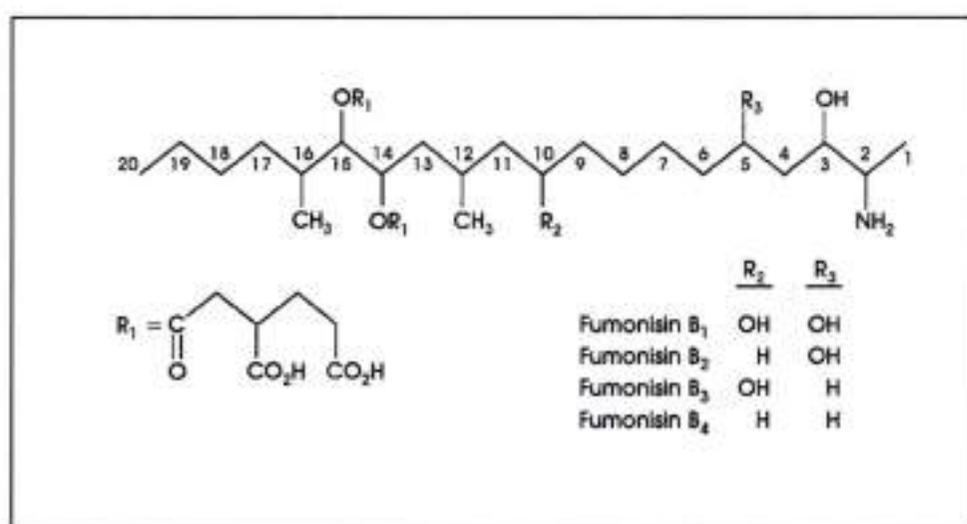


Figura II: Estructura química de las principales fumonisinas del grupo B (FB). FB2, FB3 y FB4 difieren estructuralmente de la FB1 en el número y la ubicación de los grupos hidroxilo sobre la cadena principal de la molécula.

El gen *FUM1* fue el primer gen descrito relacionado con la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Codifica para la enzima policétido sintasa (PKS), que cataliza el primer paso de la síntesis de las fumonisinas que consiste en la formación de la cadena lineal desde el carbono 3 al 20 [44], a partir de un derivado del acetato. Las PKSs están presentes en hongos, bacterias y plantas produciendo metabolitos secundarios tan variados como pigmentos, micotoxinas, factores de virulencia o antibióticos. Se ha descrito que la PKS que codifica el gen *FUM1* tiene 7 dominios catalíticos, que se encuentran en el mismo polipéptido. Estos dominios son el β -cetoacil sintasa, acil-transferasa, deshidratasa, metil transferasa, enoil reductasa, β -cetoacil reductasa, y proteína transportadora de grupos acil [37; 44]. Al interrumpir este gen se observó que no se producen las fumonisinas.

Los genes relacionados con la síntesis de las fumonisinas se encuentran juntos, organizados en un cluster que consta de 42 kilobases [37]. Los genes *FUM2* y *FUM3* confieren la capacidad de hidroxilar la cadena de la molécula en las posiciones C-10 y C-5, respectivamente [45]. Las fumonisinas B1, B2 y B3 se sintetizan, por tanto, a partir de un precursor menos hidroxilado, y con la participación de diferentes enzimas codificadas por los diferentes genes.

3.1. Toxicidad en animales y humanos

La toxicidad del maíz infectado con *F. verticillioides* ha sido bien documentada por más de 100 años. Una enfermedad de animales de granja conocida como "envenenamiento por maíz con moho" fue descrito por primera vez en los Estados Unidos en 1850. El agente causal no se conoció hasta que Sheldon y cols. identificaron a *F. moniliforme* y lo asociaron con un brote de la enfermedad en caballos, vacas, mulas, cerdos, y gallinas alimentados con de maíz con contaminación fúngica en Nebraska [46]. Pero la manifestación más dramática de la intoxicación es una patología conocida como leucoencefalomalacia equina (LEME), que causa, la muerte del animal en el término de unas pocas horas a una semana [47]. En 1971, la LEME se manifestó en caballos alimentados a base de alimentos contaminados con cultivo puro de *F. moniliforme*, quedando establecido firmemente la participación de este hongo como agente causal. El grupo de investigadores sudafricanos que logró identificar y caracterizar las fumonisinas por primera vez, también demostró que la FB1 pura era capaz de reproducir la LEME en caballos [48]. Los equinos se presentan como uno de los animales más sensibles a la acción de las fumonisinas. Experimentos llevados a cabo para determinar la dosis mínima de fumonisinas asociadas con la aparición de la sintomatología indicaron que equinos que consumían alimentos naturalmente contaminados con FB1 a niveles tan bajos como 8 µg/g se encuentran en peligro de desarrollar LEME [49]. Posteriormente, se pudo confirmar que estas micotoxinas podían causar el síndrome de edema pulmonar en cerdos, que produjo la muerte de miles de estos animales en USA en 1989 [50]. Por otro lado, estudios realizados en modelos experimentales en ratas, demostraron que FB1 posee efectos carcinogénicos, hepatotóxicos y apoptóticos en el hígado de estos animales [51-52].

Para explicar los efectos tóxicos de FB1 en animales se han propuesto varios mecanismos dos de los cuales cuentan con mayor respaldo de evidencia experimental, y es posible que estén estrechamente relacionados. En uno de ellos la FB1 produce inhibición de ceramida sintetasa, una enzima clave en el metabolismo de esfingolípidos. En el otro mecanismo una variación en la proporciones de ácidos grasos y fosfolípidos celulares inducirían cambios en la síntesis de eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos y otros derivados oxigenados. Esta disrupción del metabolismo de esfingolípidos produciría desbalances en el contenido de fosfoglicerolípidos, ácidos grasos y colesterol. Según estas

hipótesis FB1 causa directa o indirectamente, un espectro amplio de cambios en el metabolismo lipídico y en las vías bioquímicas de las células. Ambas situaciones tienen como consecuencia alteraciones en la señalización mediada por lípidos y en reacciones metabólicas importantes para el crecimiento, diferenciación y muerte celular. Varios estudios indican que FB1 induce cambios en enzimas involucradas en la regulación del ciclo celular, diferenciación y apoptosis [53-54].

Con respecto a la toxicidad de fumonisinas en humanos, Sydenham y cols. [55] observaron una relación directa entre la exposición a altos niveles de FB1 y una mayor incidencia de cáncer de esófago en la población de Transkei, Sudáfrica. Observaciones similares fueron realizadas por Chu y cols. en China [56] y por Doko en Italia [57]. Con respecto a esto, se informó que en ciertas regiones de los países mencionados, el maíz utilizado para la alimentación humana contenía niveles de FB1 por encima de 100 mg/kg. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) clasificó a las fumonisinas como compuestos probablemente carcinogénicos para humanos (grupo 2B) [58].

3.2. Toxicidad y mecanismos de detoxificación en plantas

Las enfermedades del maíz pueden ser iniciadas por una variedad de factores, la mayoría de los cuales se desconocen, como así también no se ha precisado la cronología de la síntesis y acumulación de fumonisinas en las distintas partes de la plántula tras la invasión fúngica. Desde un enfoque práctico es posible decir que buscando resistencia a toxinas, se puede hallar resistencia a patógenos, ya que la toxina puede tener un rol decisivo en el establecimiento de la enfermedad. En general, se podría considerar que FB1 actuaría como factor de patogenicidad, debilitando al hospedador o retardando sus respuestas de defensa [59]. Existen varios modelos en plantas que indican que la FB1, estructuralmente similar a las micotoxinas producidas por *Alternaria alternata lysoperici*, que colectivamente se conocen como toxinas de AAL, factor de virulencia en tomate y a la esfingarina (Sa) (Figura III), inhibe a la enzima ceramida sintetasa, con la consecuente disrupción del metabolismo de lípidos celulares [60-61]. Como consecuencia se bloquea la síntesis de esfingolípidos complejos, produciendo acumulación de compuestos bioactivos, como por ejemplo Sa y derivados fosforilados, lo que podría explicar, al menos parcialmente, la toxicidad de esta micotoxina. Los esfingolípidos tienen un papel estructural en las membranas biológicas pero también poseen una funciones regulatorias en la célula, participando en la señalización de la respuesta de defensa a patógenos. Como ejemplo de este último aspecto, cabe mencionar la modulación de las actividades de enzimas reclutadas en dichas membranas, y una serie de eventos que pueden disparar una respuesta hipersensible (RH) que consiste en la muerte rápida y localizada de las células infectadas [62]. En este sentido es necesario profundizar el conocimiento sobre las consecuencias bioquímicas de la inhibición de la ceramida sintetasa en plantas por acción de FB1,

especialmente en lo referente a la inducción de síntomas de enfermedad en plántulas de maíz infectadas por *F. verticillioides*.

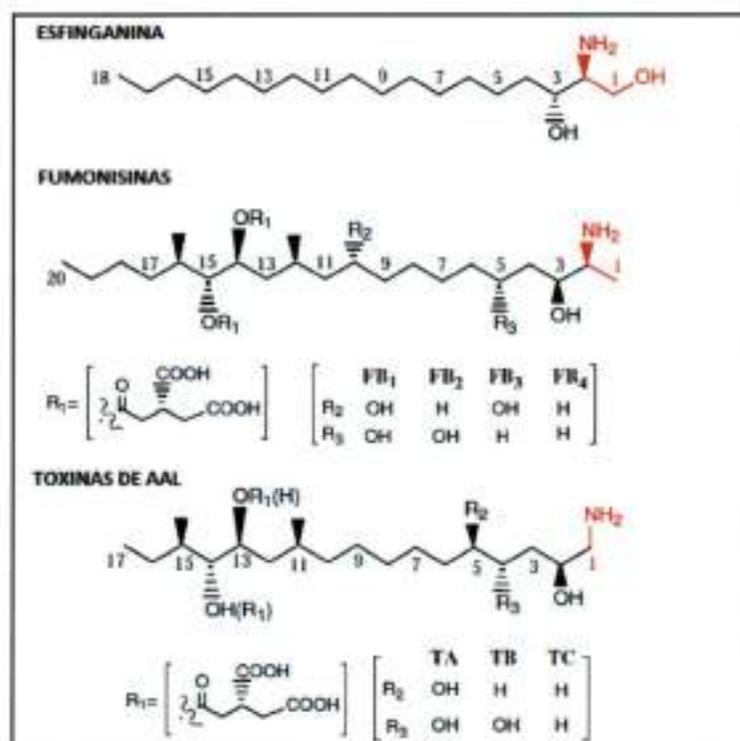


Figura III: Estructura química de la esfinganina (Sa, d18:0) y micotoxinas análogas: fumonisinas B (FBs) y toxinas de AAL (Adaptado de Du y cols., 2008 [63]).

Dado que el impacto de la FB1 en la interacción maíz-*F. verticillioides* y su rol potencial como factor de patogenicidad en plántulas de maíz no está del todo esclarecido, se llevaron a cabo análisis genéticos en algunas cepas de *F. verticillioides* no productoras de la toxina y se observó que esto se debía a alelos no funcionales en el cluster *FUM1* [64]. Más aún, tras un cruzamiento entre de cepas altamente virulentas (*FUM+*) y con un bajo grado de virulencia (*FUM-*), sólo progenies productoras de fumonisina (*FUM+*) se relacionaron con un nivel de virulencia alto [65]. Por el contrario, en el mismo trabajo, estos investigadores identificaron un aislamiento poco común de *G. fujikuroi* proveniente de Nepal, no productora de la toxina que presentó una considerable virulencia. Esta cepa no productora de FB1 fue utilizada en ensayos posteriores realizados a campo, y resultó ser tan agresiva como las productoras de FB1 en la inducción de podredumbre de espiga de maíz [66]. Resultados similares fueron obtenidos por Jardine y cols. [67] quienes describieron que la capacidad toxicogénica *in vitro* no se correlacionó con la

podredumbre de tallo, en dos líneas de maíces endogámicos, en un estadio maduro de la planta. Sin embargo, en un estudio más reciente, Glenn y cols. restituyeron, por medio de complementación genética molecular, la síntesis de fumonisinas, y la patogenicidad en plántulas de maíz, en una mutante natural (*FUM-*) patógena de banano, llevándolos a concluir que la producción de fumonisinas por *F. verticillioides* es necesaria para el desarrollo de la enfermedad foliar en maíz [68].

Mecanismos de detoxificación

Aunque existe información limitada sobre el metabolismo de micotoxinas en plantas, es posible realizar algún tipo de comparación con respecto a lo que sucede en animales. En general las plantas pueden metabolizar compuestos xenobióticos incluyendo micotoxinas como parte de su mecanismo de defensa contra patógenos.

Se ha comprobado que dos tipos de reacciones "detoxificantes" son responsables de las modificaciones químicas de los xenobióticos en plantas al igual que en animales: reacciones de fase I (transformación enzimática como reducciones, oxidaciones o hidrólisis) y de fase II (procesos de conjugación como glucosilación, glucuronidación o sulfatación) [69-71]. Las reacciones de fase II generalmente conducen a la formación de un compuesto más hidrofílico, lo que facilita su eliminación.

Las principales diferencias entre plantas y animales ocurren a nivel de la distribución y eliminación de los compuestos tóxicos. En plantas, se ha descrito una fase III en la detoxificación de xenobióticos que involucra el secuestro de compuestos conjugados en la vacuola, o su unión química irreversible a la pared celular. En este sentido, los productos de detoxificación son almacenados permanentemente en el tejido vegetal, siendo la exudación radicular el único proceso efectivo de excreción vegetal [72].

4. MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS

Las plantas se encuentran expuestas a una gran variedad de patógenos, sin embargo estas cuentan con mecanismos defensivos tan eficientes que la colonización y el desarrollo de las enfermedades correspondientes (reacción compatible) sólo ocurre en un número muy reducido de las posibles interacciones planta-patógeno [73].

Las defensas contra patógenos pueden ser clasificadas, de acuerdo a su forma de expresión, en constitutivas e inducibles. Las primeras involucran barreras estructurales o químicas pre-formadas que se asocian generalmente a componentes de la superficie vegetal tales como la cutícula, capas de cera, la pared celular, y metabolitos secundarios antimicrobianos. Estos componentes impiden físicamente el

crecimiento y la dispersión de patógenos [74]. Por otro lado, las defensas inducibles involucran la activación de cascadas de defensa frente al reconocimiento del patógeno. Las defensas inducibles incluyen a su vez dos subtipos, que se distinguen por la naturaleza de la interacción planta-patógeno que las estimula. Estas son, la defensa basal o PTI (*PAMP triggered immunity*; inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos) y la defensa específica o ETI (*Effector triggered immunity*; inmunidad activada por efectores) (Figura IV) [75-76].

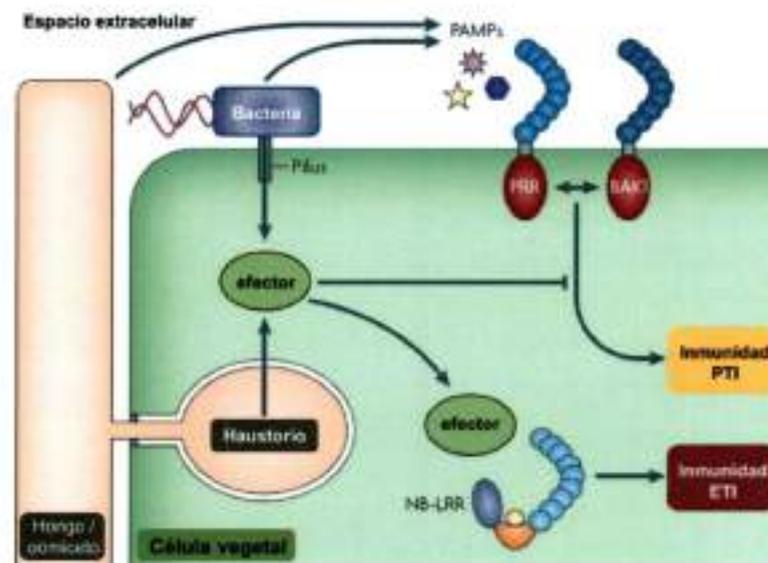


Figura IV. Esquema de la activación de la defensa basal o inmunidad PTI (activada por PAMPs) y de la defensa específica o ETI (activada por efectores). Tras evadir las barreras constitutivas, el patógeno es reconocido por la planta mediante los receptores PRR, que activan la inmunidad PTI. Los patógenos adaptados son capaces de suprimir la inmunidad PTI mediante la liberación de efectores al interior celular. Las plantas a su vez, reconocen estos efectores mediante las proteínas R o NB-LRR, que son receptores citoplasmáticos. Esta interacción, denominada resistencia gen a gen, es específica para cada interacción planta – patógeno, y activa la inmunidad ETI (Adaptado de Dodds y Rathjen, 2010 [76]).

4.1. Defensa basal o PTI

La PTI, formalmente llamada resistencia horizontal o basal, está basada en un reconocimiento de los PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*) o MAMPs (*microbe-associated molecular pattern*). Estas últimas son moléculas conservadas y vitales que se encuentran en la superficie de los patógenos y que son reconocidas por los receptores de la planta localizados en la membrana plasmática. Se han identificado varios PAMPs como: i) flg22, un péptido de 22 aminoácidos (aa) que forma parte de la flagelina del filamento de las bacterias Gram negativas [77]; ii) el péptido elf 18, un fragmento de 18 aa perteneciente al factor de elongación bacteriano EF-TU [78]; y iii) la quitina, componente mayoritario de la pared de

los hongos, como así también componentes de la membrana como α -glucanos y ergosterol [79-80]. Por otro lado, la planta reconoce también moléculas propias, como fragmentos de la pared o de la cutícula que son liberados por la acción de enzimas de patógenos. Estos pequeños fragmentos se denominan DAMPs (*danger-associated molecular pattern*) y su reconocimiento activa la defensa de la planta [76]. La respuesta inmune activada por PAMPs, MAMPs o DAMPs ocurre cuando estas moléculas son reconocidas por receptores específicos PRR (*pattern recognition receptor*) situados en la superficie celular de la planta [75]. Los receptores PRR son proteínas de transmembrana, que en su mayoría se agrupan en la familia de quinasas tipo RLK (*receptor-like kinase*). Éstas se caracterizan por la presencia de un dominio extracelular implicado en la percepción del PAMP, un dominio transmembrana de función estructural y un dominio intracelular de tipo quinasa responsable de la transducción de la señal que desencadena la PTI [81]. Las respuestas intracelulares asociadas a la PTI incluyen una rápida difusión de iones a través de la membrana plasmática y aumento notable de la concentración de calcio, la activación de la cascada de proteínas MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) o quinasas dependientes de Calcio CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*), la temprana y transitoria acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO), el engrosamiento de la pared celular, el cierre de los estomas, la activación transcripcional y generación de compuestos antimicrobianos, entre otros [76; 82-83]. La PTI en plantas es funcionalmente similar a la inmunidad innata en animales, y este conjunto de defensa puede ser estimulado por un gran número de interacciones planta-patógeno, que contribuyen en distinto grado a la resistencia [84-85]. En algunos casos, tales respuestas son suficientes para impedir o detener la infección del patógeno, y en esta condición la resistencia ocurre en ausencia de muerte celular [86-87].

4.2. Defensa específica o ETI (Inmunidad activada por el reconocimiento de efectores)

Por definición, un patógeno adaptado es aquel capaz de evadir o suprimir la PTI activada por los receptores PRR. Los patógenos liberan en el interior de la célula vegetal moléculas denominadas efectores o determinantes de la virulencia, como fitotoxinas y compuestos proteicos, que suprimen la PTI y que están implicadas en la liberación de nutrientes necesarios para el crecimiento y la propagación del patógeno [88]. Las plantas han desarrollado receptores, denominados proteínas de resistencia R o NB-LRR, que se localizan en el citosol o en el núcleo y que son capaces de reconocer a estos efectores. Estos receptores intracelulares presentan un dominio de unión a nucleótido (NB) implicado en la multimerización y activación, y una región LRR implicada en la percepción. Las proteínas NB-LRR han evolucionado para reconocer los efectores específicos de cada patógeno. Esta interacción determina la denominada resistencia gen a gen [89] y puede ocurrir de varias formas: (i) directamente, cuando el efector se une físicamente a la proteína NB-LRR; (ii) indirectamente cuando el efector modifica otra proteína, que puede ser la diana o blanco y que será reconocida por el receptor NB-LRR, y (iii) cuando

el receptor sólo reconoce al efector si está interactuando con otra proteína [76]. Los efectores que son reconocidos por proteínas R y que dejan de promover la virulencia, son designados factores de avirulencia (Avr) y el patógeno que los produce se denomina avirulento. El reconocimiento R:Avr, que desencadena la defensa "gen a gen", involucra un hospedante resistente y una interacción con el patógeno incompatible [90]. Por el contrario, en ausencia de correspondencia R:Avr, la planta es susceptible y la interacción con el patógeno es compatible.

El reconocimiento de los efectores activa la ETI, una respuesta inmediata e intensa de activación de la defensa, lo que produce generalmente la muerte del tejido infectado. La RH limita a los patógenos de su acceso a nutrientes y agua, evitando así su replicación y subsecuente proliferación sobre tejidos sanos [91]. Así la RH es mayormente efectiva contra patógenos hemi/biotrofos (que se alimentan de tejido vivo) siendo, por el contrario, un rasgo de susceptibilidad contra patógenos necrotrofos (que se alimentan de tejido muerto) [92]. A través de estos mecanismos, la ETI induce la expresión de genes relacionados con la patogénesis o genes *PR* (*pathogenesis related*) [93] y propaga la señal a tejidos no infectados. Consecuentemente, se genera una resistencia de larga duración que es eficaz ante un segundo ataque por el mismo patógeno. Este evento, que es dependiente de la señalización del ácido salicílico (SA, *salicylic acid*), se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*), y es efectivo contra un rango amplio de patógenos virulentos y avirulentos [93].

A nivel molecular, la RH induce respuestas, como la acumulación de SA, ERO e intermediarios del óxido nítrico, la activación de cascadas de señalización mediadas por MAPK, cambios en los niveles intracelulares de calcio, reprogramación transcripcional y síntesis de compuestos antimicrobianos. Entre estos, el incremento de SA y el estallido oxidativo, son sus rasgos principales [81]. Los niveles de SA son diferentes en las distintas regiones de la lesión de la RH. Este componente alcanza altas concentraciones en el centro de la lesión donde contribuye a inducir la muerte celular. Al contrario, en el tejido perisférico, los niveles de SA son menores y pueden actuar como señales inductoras de funciones antioxidantes que impiden que la muerte se propague en todo el tejido [94].

Varios estudios indican que la muerte celular programada (MCP) inducida por toxinas fúngicas comparte características fisiológicas y moleculares con la RH que ocurre de manera frecuente en ETI [62].

4.3. Rutas de señalización implicadas en la defensa

La respuesta de defensa es el resultado de una regulación compleja de múltiples vías de señalización mediadas por hormonas y señales como las ERO y el óxido nítrico (NO). Las principales fitohormonas implicadas en las interacciones planta-patógeno son el ácido salicílico (SA, *salicylic acid*), el ácido jasmónico (JA, *jasmonic acid*) y el etileno (ET). Otras hormonas como el ácido abscísico (ABA, *abscisic*

acid), auxinas, citoquininas y giberelinas (GA, *gibberellic acid*) también participan en las respuestas de defensa [95]. Algunos patógenos han adquirido la capacidad de manipular esta red hormonal con el objetivo de provocar desequilibrios y una activación inapropiada de la defensa que pueda beneficiarlos [95-96].

El SA es una hormona esencial en la defensa contra patógenos hemi/biótrofos, así como en la activación de la SAR [97]. Los mutantes alterados en la percepción o acumulación de SA están afectados en la resistencia frente a este tipo de patógenos. Los niveles de SA aumentan en la planta tras la percepción del patógeno, y su aplicación exógena provoca la inducción de genes relacionados con la patogénesis (*PR*, *pathogenesis related*) aumentando la resistencia a un amplio rango de patógenos [95].

Por otro lado, las hormonas JA y ET están asociadas en la respuesta de defensa contra patógenos necrótrofos e insectos herbívoros. El JA o los jasmonatos, son moléculas derivadas del ácido α -linolénico implicadas en diversos procesos, como el desarrollo y la señalización a estrés de tipo biótico y abiótico. El JA es un regulador esencial de la defensa frente a patógenos necrótrofos, pero también está implicado en la SAR. El ET es una hormona volátil implicada en diferentes funciones del desarrollo vegetal, como la germinación, la senescencia, y las respuestas a estrés abiótico y biótico.

En algunas ocasiones, los mecanismos de defensa inducidos por las hormonas SA y JA-ET funcionan de forma sinérgica, pero en general presentan una relación antagonista [98-100]. Esto sugiere que la especificidad de la respuesta de defensa depende del modo de patogenicidad y que ésta no puede ser sólo clasificada como biótrofa o necrótrofa [101]. En un medio natural, las plantas se enfrentan a varios patógenos al mismo tiempo. El hecho de que las rutas de defensa estén interconectadas permite a la planta priorizar entre ellas para activar una respuesta apropiada. Uno de los reguladores de las rutas mediadas por SA y JA es la proteína NPR1 (*non-expressor of PR genes 1*), que interacciona con factores de transcripción tipo TGA. Esta interacción activa genes *PR* dependientes del SA y a la vez reprime la expresión de genes de respuesta a JA [102-103].

El ABA controla varios procesos del desarrollo de la planta, como germinación, maduración del embrión, senescencia de la hoja, apertura de estomas y respuesta a estrés de tipo ambiental, como la sequía [104]. Su participación en la respuesta de defensa ha sido descrita en numerosas ocasiones [101; 105-107] aunque ejerce una función positiva o negativa según el tipo de interacción planta-patógeno [96]. En los mutantes de biosíntesis de ABA, *aba1* y *aba2*, tiene lugar la inducción de los genes que responden a JA-ET. La aplicación exógena de ABA suprime la activación de los genes marcadores de las rutas de JA-ET [101; 108].

Las GA inducen la expresión de genes relacionados con el crecimiento mediante la desestabilización de las proteínas represoras DELLA [109]. Las mutaciones en estas proteínas estimulan la biosíntesis y la

señalización de SA que, al mismo tiempo, inhibe la señalización mediada por JA. Como consecuencia, estos mutantes presentan un incremento y una disminución de la resistencia a patógenos biótrofos y necrótrofos, respectivamente [96; 109]. Se han identificado 126 formas giberélicas, siendo GA1, GA3, GA4 y GA7 las formas activas principales. A su vez, GA4 es la principal GA en *Arabidopsis* spp. y GA3 en hongos [110].

4.4. Metabolismo de los esfingolípidos en plantas

En las plantas, los esfingolípidos son unos de los principales componentes de la membrana plasmática, tonoplasto y endomembranas [111]. En adición a su función estructural, en la actualidad varios estudios sugieren que estos compuestos podrían participar en mecanismos de defensa en plantas debido a que i) podrían modular la MCP asociada con la defensa y enfermedad, ii) podrían ser considerados potenciales compuestos bioactivos (o moléculas de señalización) en MCP y defensa, y iii) intervienen en la formación de los "rafts" lipídicos y polarización de la membrana/tráfico de proteínas asociados con la defensa [111-112].

La síntesis de los esfingolípidos tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y comienza con la condensación de serina y palmitoil-CoA por la enzima serina palmitoil transferasa (SPT) [62; 113] (Figura V). El producto de esta reacción, la 3-ceto esfingánina, es reducida para dar lugar a la esfingánina (Sa) o C-1, C-3 dihidroxi base de cadena larga (LCB, *long chain base*) de 18 C, designada también como d18:0 (dos grupos hidroxilos (d) en una cadena de 18 carbonos (18) sin insaturaciones (0)). A partir de la Sa y por adición de un grupo hidroxilo en el C-4 por acción de 4-hidroxi esfingánina, se produce la fitoesfingosina (Pso) o trihidroxi-LCB o t18:0. A su vez, ambas LCB libres pueden presentar su derivado fosforilado en el C-1. Por otro lado, se ha descrito en plantas más de 9 estructuras de LCB libres, ya que estas pueden presentar insaturaciones en la posición $\Delta 4$ de dehidroxi LCB y/o en la posición $\Delta 8$ de dihidroxi o trihidroxi LCB.

Las LCB resultantes luego de la condensación con ácidos grasos de 16 a 28 C, generan las ceramidas, siendo esta reacción catalizada por la ceramida sintetasa. Las ceramidas son transportadas al complejo de Golgi, donde adquieren diferentes grupos polares, como carbohidratos o alcoholes fosforilados, que forman la cabeza polar de los esfingolípidos complejos, como por ejemplo la glucosilceramida (GlcCer), inositolfosfoceramida (IPC), glicosil inositolfosfoceramida (GIPC), entre otros.

Las GlcCer y GIPC en las plantas presentan distinta composición en relación a la ceramida: GlcCer se encuentran enriquecidas en dihidroxi LCB y ácidos grasos de C16, mientras que GIPC poseen abundante trihidroxi LCB y ácidos grasos de cadenas muy largas (VLCFA, $\geq C20$) [111].

A partir de estudios realizados con AAL y FB1 con distintas mutantes de *Arabidopsis*, se demostró que algunas perturbaciones en el metabolismo de esfingolípidos podrían conducir a la MCP y que este proceso de muerte estaría asociado estrechamente a mecanismos de defensa SA-dependientes. Sin embargo, en la actualidad no han sido suficientemente caracterizados los efectos de la FB1 en el ambiente natural donde se desarrolla la enfermedad, ni los esfingolípidos específicos involucrados en desencadenar la MCP. Existen ciertas discrepancias con respecto a las especies LCB involucradas de manera primaria o en forma más potente en la inducción de la MCP basados, en aplicaciones exógenas. Shi y cols. [114] mostraron que d18:0 (Sa), t18:0 (Pso) o d18:1 podían inducir MCP en plántulas de *Arabidopsis* spp. en agar, siendo Sa menos potente que Pso. Estos resultados fueron consistentes con estudios previos realizados por Tanaka y cols. [115], quienes encontraron que Pso presentó mayor fitotoxicidad que Sa. Recientemente, por el contrario, Saucedo y cols. [116] informaron que Sa indujo MCP en plántulas de *Arabidopsis*, pero este efecto no era causado por Pso. Aunque la causa exacta de esas diferencias no están claras, es importante tener en cuenta que las concentraciones fisiológicas de algunos esfingolípidos bioactivos, en particular la LCB libres, pueden ser muy bajas, por lo que una leve alteración de estos niveles podría reflejarse en un cambio metabólico importante. Proporcionando aún mayor complejidad a este sistema, no se descarta la posible sensibilización del metabolismo lipídico de las plantas, tras el primer contacto de las fumonisinas, fenómeno ya descrito por Wang y cols. en animales de experimentación [117]. Estos autores mostraron que tras la primera exposición a FB1, niveles 10 veces inferiores de la toxina son suficientes para causar el mismo efecto sobre el desbalance lipídico en ratas.

Resulta necesario dilucidar si la MCP inducida por esfingolípidos forma parte del mecanismo de defensa en la resistencia a patógenos hemi/biotróficos.

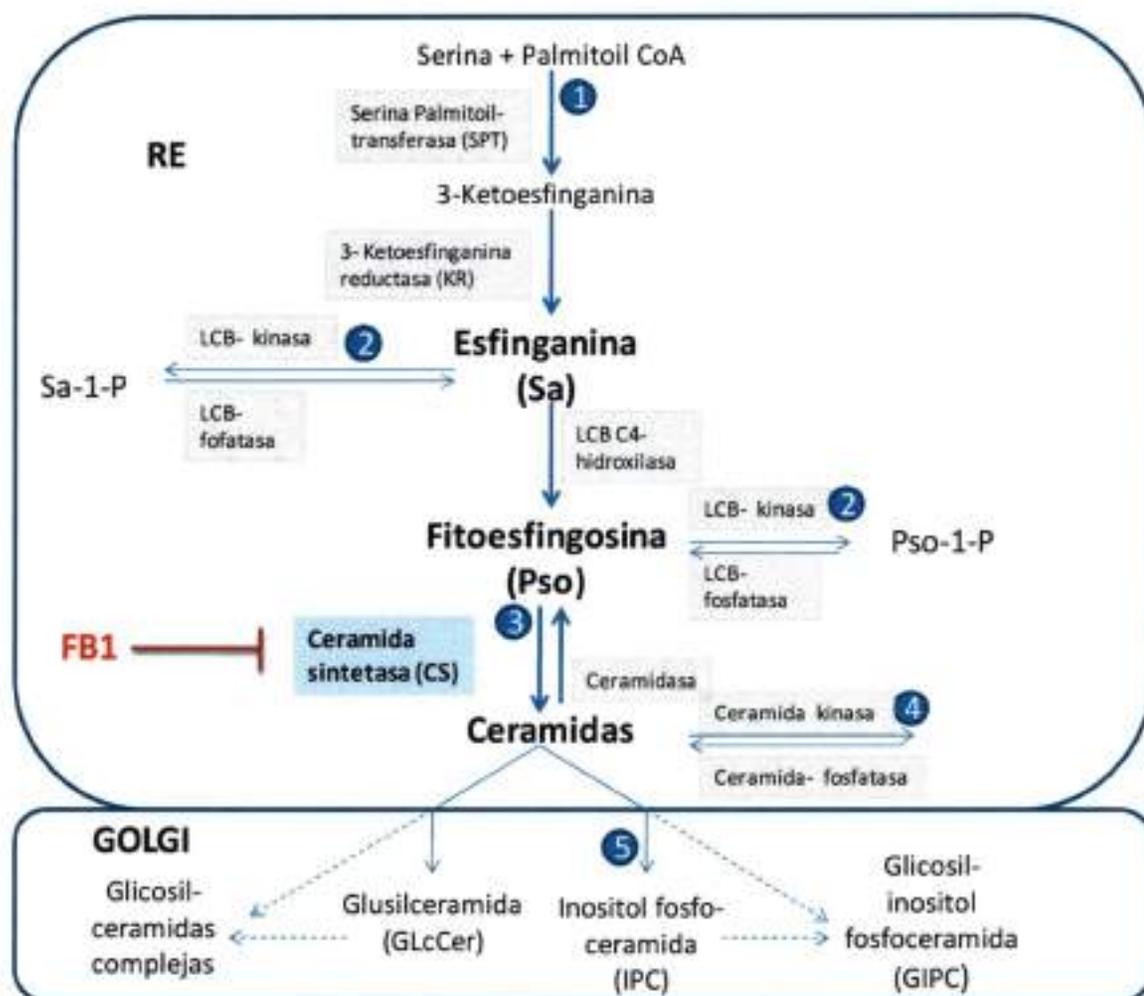


Figura V: Esquema de las principales reacciones que intervienen en el metabolismo de esfingolípidos en plantas. La síntesis *de novo* de la ceramida ocurre en el retículo endoplásmico (RE), mientras que la síntesis de los esfingolípidos complejos suceden en el aparato de Golgi. El nombre de las enzimas se encuentran en los recuadros recuadros grises, excepto la ceramida sintetasa que se encuentra en el recuadro celeste. 1-5: Pasos metabólicos críticos para la regulación de MCP en plantas caracterizados genéticamente (Adaptado de Berkey y cols 2012 [62]).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la probable participación de FB1 como factor de fitopatogenicidad en el patosistema maíz-*Fusarium verticillioides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar los cambios fenotípicos y funcionales de plántulas de maíz de híbridos resistentes y sensibles a la infección con *F. verticillioides*, con respecto a la dinámica espacio-temporal de la invasión fúngica.
- 2- Estudiar la capacidad de la FB1 para reproducir en ambos híbridos de maíz, síntomas de enfermedad asociados a la infección por *F. verticillioides*.
- 3- Evaluar la participación de los principales componentes del metabolismo lipídico en la respuesta diferencial de ambos híbridos frente a la infección y a la exposición a FB1 en forma individual.
- 4- Analizar mecanismos de muerte celular como respuesta diferencial entre híbridos y evaluar niveles de fitohormonas involucradas en la respuesta al estrés biótico.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DEL PATOSISTEMA *Zea mays-Fusarium verticillioides*

1. PERFIL TOXICOGÉNICO DE *Fusarium verticillioides* RC2024

En esta etapa se realizaron infecciones experimentales de maíz con una cepa de *F. verticillioides* productora de FB1 (RC2024). El estudio de la capacidad toxicogénica permitió determinar que la cepa RC2024 produjo 1.444 µg de FB1/g de maíz fermentado (n=4) de FB1, con una relación FB1:FB2:FB3 de 88:5:7.

2. EFECTOS DE LA INFECCIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

2.1. Altura y longitud de la raíz principal

En la Tabla 1 se resumen los efectos de la infección con la cepa micotoxicogénica de *F. verticillioides* sobre el crecimiento de las plántulas de maíz, mediante la medición de la altura (parámetro usado como un indicador del vigor de la planta) y de la longitud de la raíz primaria a los 7, 14 y 21 días post-siembra (dps).

F. verticillioides RC2024 promovió el crecimiento en HR siendo la altura significativamente mayor en este híbrido comparada con las de las plántulas no-inoculadas ($p < 0.0001$ a los 7 y 14 dps, y $p < 0.05$ a los 21 dps). Además, la longitud de la raíz primaria fue mayor a los 14 y 21 dps en plantas infectadas con respecto a los controles ($p < 0.0001$). Por el contrario, la infección del HS redujo el crecimiento de la parte aérea ($p < 0.05$ a los 21 dps) y de la raíz primaria ($p < 0.05$ a los 14 y 21 dps).

Tabla 1. Efectos de la infección en híbridos resistentes y susceptibles de maíz con *Fusarium verticillioides* sobre el desarrollo de las plántulas a los 7, 14 y 21 dps*.

Tratamiento ^Y	Altura de la plántula (cm) [†]			Longitud de la raíz primaria (cm)		
	días post-siembra			días post-siembra		
	7	14	21	7	14	21
HRC	1.9 ± 0.1	10.9 ± 0.4	20.8 ± 1.3	4.8 ± 0.4	7.4 ± 0.4	10.6 ± 0.6
HRI	3.3 ± 0.3d	16.5 ± 0.7d	25.6 ± 1.7c	5.8 ± 0.4	12.8 ± 0.4d	14.2 ± 0.6d
HSC	3.5 ± 0.2	13.3 ± 0.2	27.8 ± 0.6	6.7 ± 0.2	12.6 ± 0.3	17.1 ± 0.5
HSI	3.2 ± 0.2	13.8 ± 0.6	25.2 ± 0.9c	7.1 ± 0.2	11.4 ± 0.4c	15.4 ± 0.6c

*Los datos están expresados como la media ± error estándar (n≥10).

^YHRC: Híbrido resistente control. HRI: Híbrido resistente infectado. HSC: Híbrido susceptible control. HSI: Híbrido susceptible infectado.

†Las letras c y d indican que el valor de p de los grupos infectados son significativamente ($c, p < 0.05$; $d, p < 0.0001$) diferentes con respecto a su correspondiente grupo control.

2.2. Peso seco de la porción aérea, raíz y biomasa total

Con estos datos es posible evaluar los patrones de asignación de recursos de las plantas bajo condiciones de estrés. En relación a esto, la masa de un determinado órgano de la planta tiende a reflejar el costo de su construcción.

En la Figura 1 se muestran los efectos de la infección por *F. verticillioides* RC2024 sobre la biomasa de la parte aérea, raíz y total de las plántulas de maíz de los dos híbridos usados en este modelo experimental.

F. verticillioides incrementó significativamente la acumulación de materia seca en HR, en donde la biomasa total de las plántulas infectadas superó a la de las plantas control, a los 7 y 14 dps ($p < 0.0001$), debido principalmente a la mayor contribución de la parte aérea. Este hongo tuvo un efecto opuesto en el HS, donde se indujo una reducción importante en la biomasa total a los 14 ($x\%$; $p < 0.001$) y 21 dps ($y\%$; $p < 0.0001$) debido a menores desarrollos tanto de la parte aérea como de raíz. Estos efectos sobre el desarrollo del HS se evidenciaron a los 7 dps (parte aérea) y 14 dps (raíz); manteniéndose estas diferencias hasta la finalización del esquema experimental. En este último caso, el total de la masa seca tanto de raíz como de parte aérea fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) en el día 21 con respecto al día 7, indicando que, si bien se observó inhibición, la plántula continuó su crecimiento después del día 7 pero en forma reducida con respecto al control.

En este estudio, *F. verticillioides* induce repuestas opuestas en el patrón de asignación de recursos en el HR y en el HS. En HR, *F. verticillioides* no suprime el crecimiento en plántulas resistentes, e incluso promueve, en algunos casos, su desarrollo. Estos resultados fueron inesperados durante los primeros días después de la germinación de semillas infectadas, dado que el hongo y la plántula pueden estar compitiendo por las reservas de nutrientes almacenados en el endosperma del grano. En HS, la infección causó un compromiso en la asignación de recursos que se tradujo en la reducción del crecimiento tanto de la parte aérea como subterránea.

Los efectos de la infección de las plántulas con *F. verticillioides* se comenzaron a evidenciar a los 14 dps, fundamentalmente en el HS, como se observa en las Figuras 2 y 3. Los síntomas de enfermedad en HS incluyeron crecimiento reducido de las partes aéreas y radicales y lesiones del tipo necróticas en mesocótilo y partes del tallo. Por otro lado, la infección indujo mayor desarrollo de las plántulas del híbrido resistente inoculado.

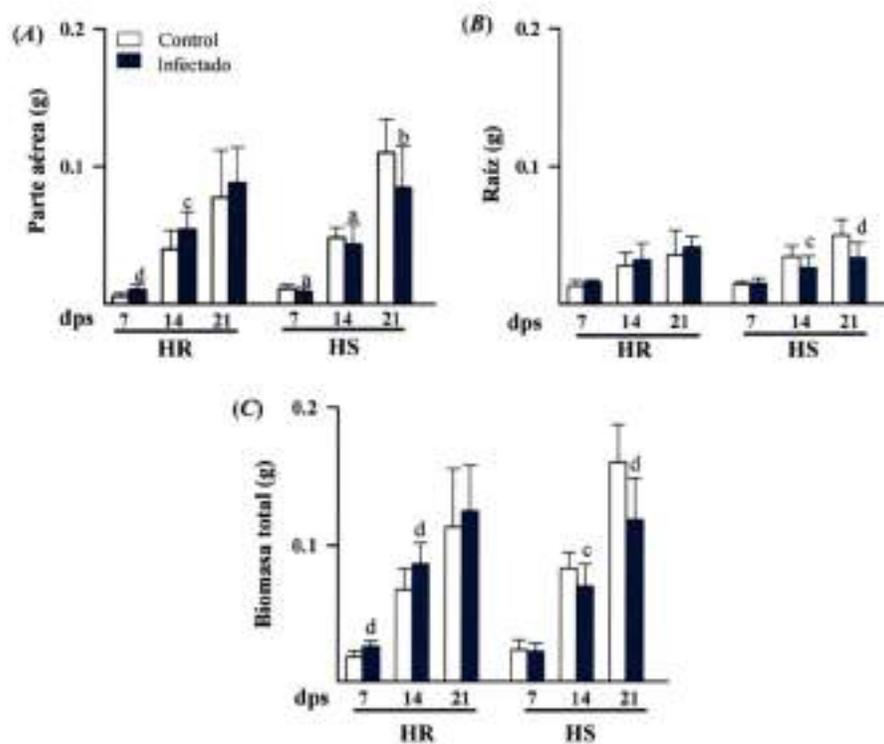


Figura 1: Efectos de la infección fúngica sobre el crecimiento del híbrido resistente y susceptible de maíz.

Medición de la biomasa (peso seco) de la parte aérea (A), radical (B) y total (C) en HR y HS, a los 7, 14 y 21 días post-infección. Los datos están expresados como la media \pm error estándar ($n \geq 10$). $^*p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$; $^d p < 0.0001$, cuando los maíces infectados son comparados con su correspondiente grupo control.

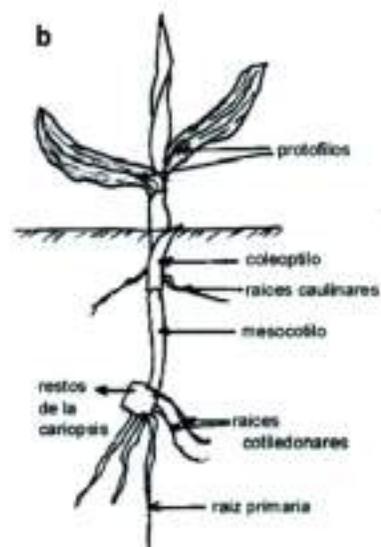


Figura 2: Lesiones particulares observadas en el híbrido susceptible infectado con *F. verticillioides* RC2024 y esquema de una plántula de maíz donde se puede visualizar partes específicas de la misma.

(a) Inset muestra lesiones pardas a negras en mesocótilo y parte de la porción aérea del HS a los 14 dps. (b) Segmentos específicos de una plántula de maíz: se puede observar la raíz primaria y al sistema de raíces que reemplazará a la misma y que pueden nacer del nudo cotiledonar (raíces cotiledonares), del nudo coleoptilar (raíces caulinares) y aún del mesocótilo (primer entrenudo). Además se muestra las primeras hojas o protofilos.



Figura 3: Alteraciones macroscópicas inducidas por la infección del maíz (híbrido resistente, HR e híbrido susceptible, HS) con *F. verticillioides* RC2024 a los 14 y 21 días post-siembra.

Promoción de crecimiento en HR desarrollados a partir de semillas inoculadas con solución conidial de la cepa micotoxicogénica RC2024 de *F. verticillioides* (HRI) con respecto a plántulas controles (HRC). Menor desarrollo radicular y de la porción aérea en HSI en comparación con el crecimiento de plántulas controles (HSC) a partir de semillas no infectadas. La suspensión de conidias fúngicas fue preparada luego de disgregar mecánicamente las colonias desarrolladas durante siete días a 25 °C en medio agar papa glucosado (APG), con una solución estéril de Tween 20 (2,5 % en PBS). Las suspensiones obtenidas se dejaron decantar durante 30 seg, ajustándose luego su turbidez a 0.1 DO con espectrofotómetro a 600 nm, esta densidad representó 10^{12} ufc/ml.

HRC: Híbrido resistente control. HRI: Híbrido resistente infectado. HSC: Híbrido susceptible control HSI: Híbrido susceptible infectado.

3. DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE LA INVASIÓN DEL MAÍZ POR *Fusarium verticillioides*

Se evaluó la infección fúngica del tejido radical y foliar de plántulas resistentes y susceptibles mediante el análisis microscópico y aislamiento fúngico:

3.1. Microscopía:

Las observaciones microscópicas de HR e HS inoculados revelaron colonización moderada tanto en tejido radical como foliar (Figura 4). A partir del día 7, y hasta los 21 dps, la infección fúngica se localizó principalmente en raíz, en donde se pudieron observar hifas septadas ubicadas en forma paralela al eje mayor de la célula (Figura 4a). Con respecto a las hojas, el micelio se detectó a partir de 7 dps observándose en mayor densidad a los 21 dps. Se observaron las hifas septadas de *F. verticillioides*, ramificadas entre las células del hospedante (Figura 4b) y emergiendo a través de los estomas (Figura 4c). En todos los casos la ubicación de las hifas fue mayoritariamente en el córtex, sin infiltrar la vasculatura, y el crecimiento fúngico fue de localización intercelular.

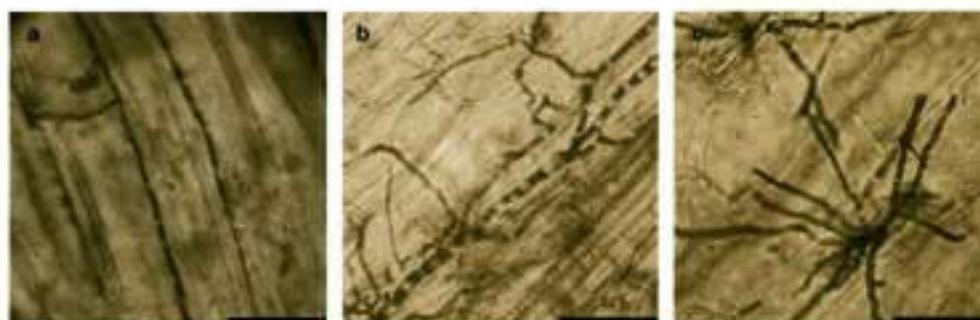


Figura 4: Colonización sistémica de *F. verticillioides* RC2024 en híbrido susceptible infectado a los 21 días post-siembra.

Se pueden observar las hifas ubicadas en paralelo en los espacios intercelulares del tejido radical (a), en hojas (b) y emergiendo a través de los estomas (c). Coloración con azul de tripan 0.05%. (Magnificación: 400x). Barras: (a-c): 50 μ m.

3.2. Aislamiento fúngico

El proceso de colonización de *F. verticillioides* fue además investigado aislando al patógeno en medio de cultivo APG, a partir de segmentos específicos de las plántulas de maíz infectado y cosechados a los 7, 14, y 21 dps (Figura 5). Las colonias desarrolladas en este medio presentaron un micelio aéreo denso cuyo reverso presentó un color pardo, como se muestra en la Figura 5a. Se confirmó por microscopía, la presencia de estructuras características del *F. verticillioides* (Figura 5b), como las microconidias en cadenas largas (flecha) y las falsas cabezas conidiales (cabeza de flecha).

El hongo fue recuperado de todos los segmentos de las plántulas (Figura 5c; R, raíces; M, mesocótilo; N, nudo; T, tallo; y H, hoja) de HR e HS en todos los días evaluados. Sin embargo, en el HS se observó mayor frecuencia de infección y diseminación que en HR. En este último, la región de la plántula infectada con mayor frecuencia fue mesocótilo, seguido por el nudo y raíz y, en menor proporción, las porciones aéreas de las plántulas (hojas y tallos). En HS, a partir de los 7 dps, el mayor porcentaje de recuperación fúngica fue no sólo a partir de mesocótilo, también fue a partir del nudo, y en menor porcentaje en raíz, hojas y tallos. No obstante, estos últimos porcentajes fueron superiores a los observados en el HR. A los 14 y 21 dps, la raíz fue otro de los tejidos (junto al nudo y mesocótilo) que presentó la mayor infección.

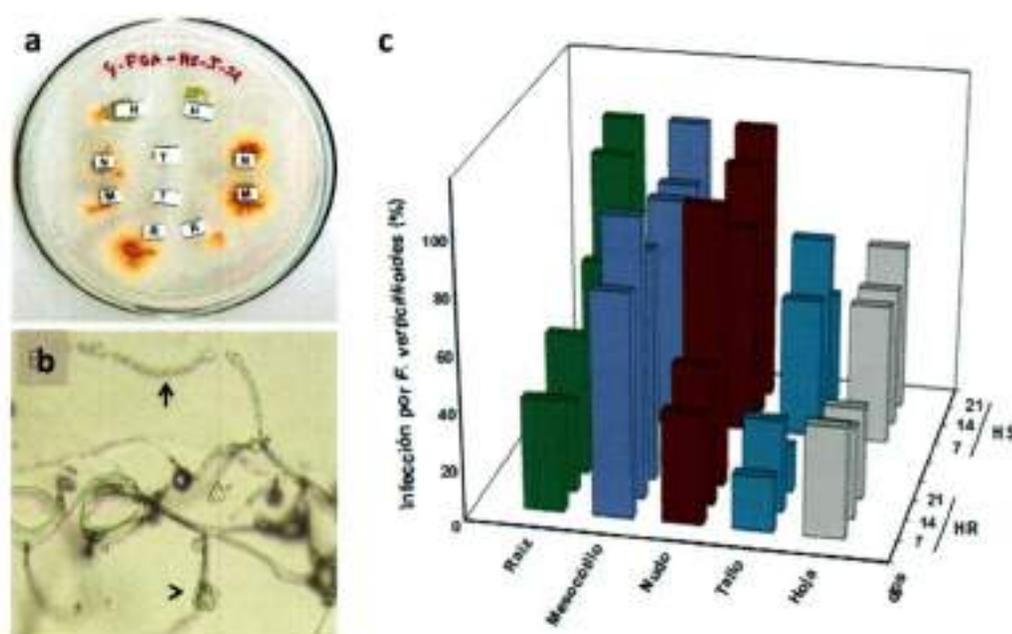


Figura 5: Dinámica espacio-temporal de la infección fúngica de plántulas de maíz (híbrido resistente, HR e híbrido susceptible, HS) por *F. verticillioides* R2024.

(a) Aislamiento fúngico en medio APG a partir de secciones específicas de HS infectados, a los 21 dps. (b) Examen microscópico de microconidias en cadenas largas (flecha) y cabeza falsa (cabeza de flecha), características de *F. verticillioides*, desarrolladas a los 5 días en agar-agua. (Magnificación 400x). (c) Porcentaje de infección de raíces (R), mesocótilo (M), nudo (N), tallo (T), y 1^o hoja (H) de plántulas resistentes y susceptibles infectadas, a los 7, 14 y 21 dps. La distribución fúngica se determinó en duplicados de segmentos vegetales específicos de 0.5 a 1 mm (n=6).

4. EFECTO DE LA INFECCIÓN FÚNGICA SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES

Se estudiaron los efectos de la infección fúngica de los HR y HS, mediante el análisis de las imágenes digitalizadas de las raíces, con el software WR-RIPL 2.0.

En la Figura 6 se muestran fotografías representativas de plántulas de HR e HS (controles e infectadas) cosechadas a los 21 dps. La parte izquierda de cada panel muestra la imagen escaneada de las raíces

suspendida en bandeja acrílica contra un fondo oscuro para el aumento de contraste, mientras que a la derecha se observa la imagen digitalizada procesada, la cual fue sometida a análisis mediante el software WR-RIPL 2.0. En forma macroscópica, se pudo apreciar que el sistema radical del HS infectado (Figura 6d) presentó menor desarrollo y una disminución marcada de las raíces laterales con respecto a su control (Figura 6c) y a las raíces del HR (Figura 6a-b).

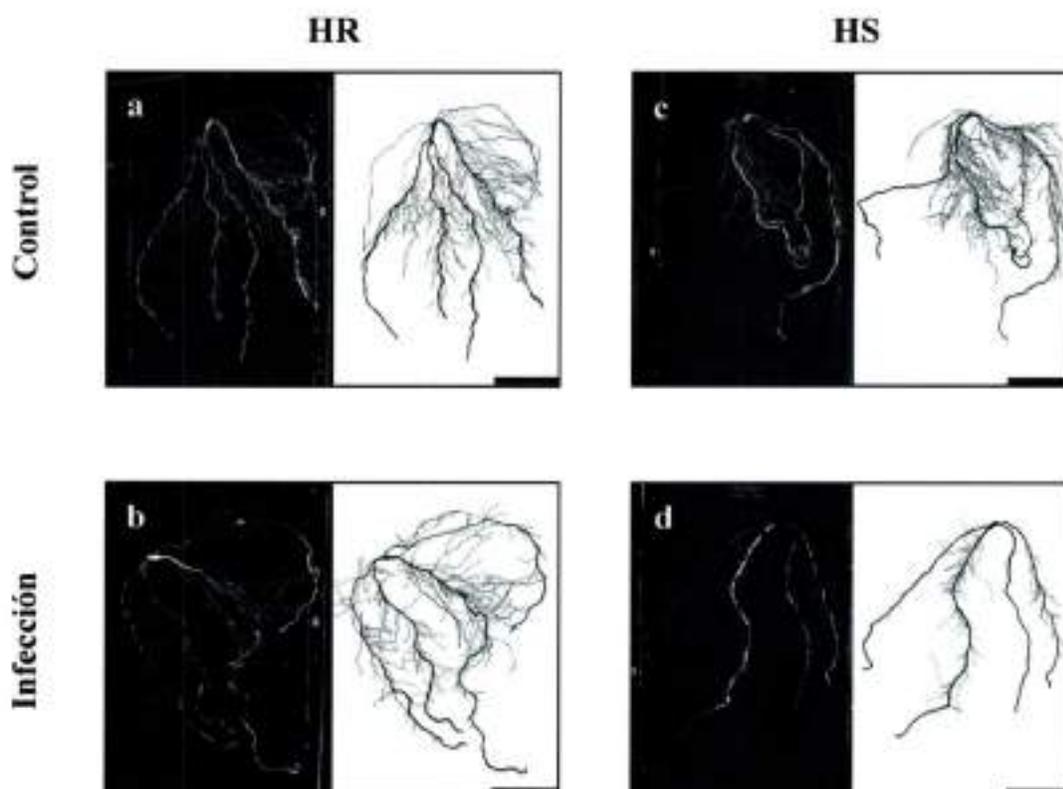


Figura 6: Efectos de la infección fúngica sobre el desarrollo radical de HR e HS: Análisis morfológico. Comparación de imágenes digitales de los sistemas radicales de raíces entre HR y HS crecidos a partir de semillas inoculadas con *F. verticilloides* (b, d) y sus respectivos controles (a, c), a los 21 dps. Barras (a-d): 3.8 cm.

4.1. Morfología del sistema radical: diferencias entre genotipos de maíz

Fusarium verticilloides RC2024 tuvo efectos opuestos sobre las estructuras de las raíces, caracterizadas a través de los parámetros de longitud total, superficie y volumen total obtenidos tras el análisis de las imágenes digitalizadas de las raíces, con el software WR-RIPL 2.0. (Figura 7). Las raíces del HR, presentaron mayor longitud total, superficie y volumen a los 14 dps en comparación con las raíces de plántulas no infectadas ($p < 0.001$). Sin embargo, en HS inoculados se observaron efectos perjudiciales en los tres parámetros evaluados, principalmente a los 21 dps ($p < 0.05$) con respecto a los controles.

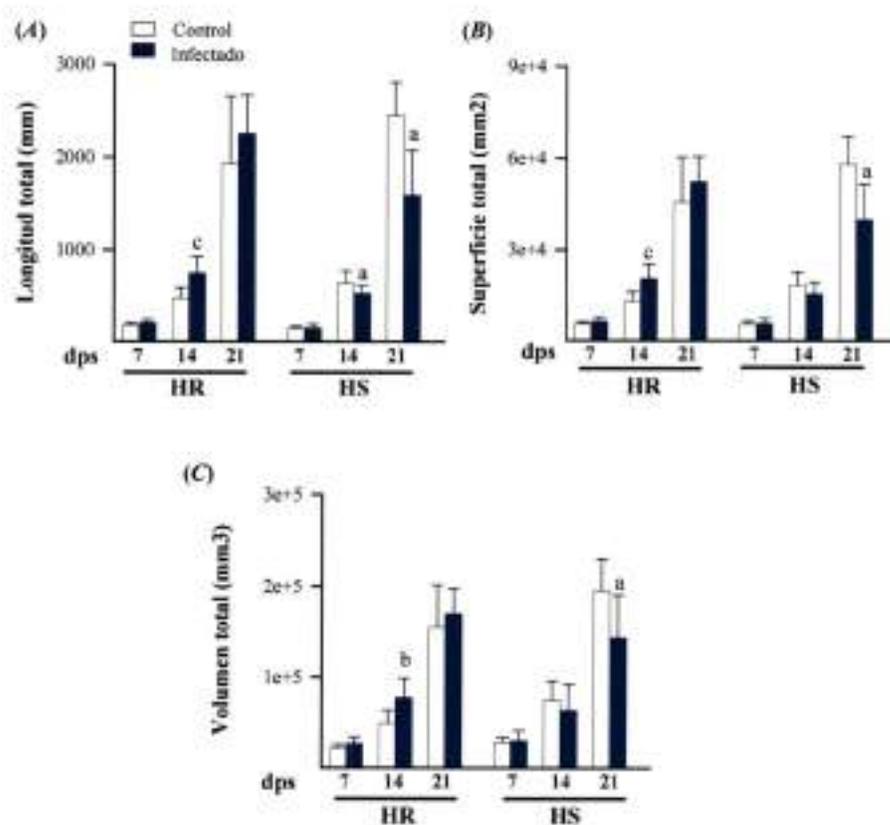


Figura 7: Efectos de la infección fúngica de HR y HS sobre la morfología radical.

Medición de la longitud (A), superficie (B) y volumen (C) total de raíces de plántulas de maíz a los 7, 14 y 21 dps. Los datos están expresados como la media \pm error estándar ($n \geq 10$). ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$, cuando los maíces infectados son comparados con su correspondiente grupo control.

4.2. Longitud específica de raíz

La longitud específica de raíz (SRL, *Specific Root Length*) es un parámetro que relaciona la longitud total y el peso seco radical, donde incrementos en la SRL se asocian con una alta respiración de las raíces finas que reflejan una gran actividad metabólica relacionada con la asimilación y captación de nutrientes. Debido a esto último, la SRL es considerada un índice importante que permite caracterizar funcionalmente al tejido radical. La longitud total se obtuvo luego de analizar las imágenes digitalizadas de las raíces, con el software WR-RIPL 2.0.

En este estudio, se observaron cambios en la SRL, los cuales fueron dependientes del híbrido analizado. La infección fúngica del HR determinó a los 14 dps una SRL 1,4 veces mayor que la observada en el mismo híbrido, pero en ausencia de infección. *Fusarium verticillioides* podría promover un mejor funcionamiento de la raíz de plántulas resistentes, aumentando su capacidad para la captación de agua y nutrientes, su respiración y su tasa metabólica. Por otro lado, en plántulas susceptibles infectadas se

registró una disminución del SRL, a los 21 dps, de 0.8 veces con respecto al control, afectando negativamente las funciones del tejido radical.

5. CONCLUSIÓN CAPÍTULO I:

Fusarium verticillioides RC2024 colonizó en forma sistémica tanto al híbrido resistente como susceptible de maíz. Sin embargo se registró una mayor frecuencia de infección y velocidad de diseminación en segmentos específicos de plántulas susceptibles con respecto a las resistentes. La localización fúngica fue preferencialmente en mesocótilo, nudo y raíz y en menor medida en hoja y tallo, en ambos híbridos. Sin embargo, en HR se aisló con mayor frecuencia a partir de mesocótilo, mientras que en HS además de situarse en mesocótilo, fue importante su localización en raíz y nudo coleoptilar.

El hongo micotoxicogénico tuvo efectos estimulantes sobre la elongación de la raíz primaria, altura y biomasa total en plantas resistentes, y efectos negativos en los mismos parámetros, pero de plántulas del HS. Los efectos de promoción de crecimiento no se asocian a la actividad de ciertos microorganismos pertenecientes a la microbiota de la rizósfera del suelo, dado que en el modelo experimental se utilizó arena previamente autoclavada y lavada. El incremento en el desarrollo vegetal, sugiere que *F. verticillioides* podría producir fitohormonas que intervienen en este proceso. Por otro lado, en este estudio, se registró que el hongo afectó la morfología de la raíces, impactando en forma positiva en la captación de agua y nutrientes, favoreciendo por lo tanto el crecimiento de la plántula. En HS, la disminución de la biomasa total de las plántulas, las lesiones del tipo necrótica observadas, y la menor eficiencia en la funcionalidad de la raíz, se correlacionaron con una mayor invasión fúngica con respecto al HR. En HS el proceso de infección y colonización se desarrolló en forma más agresiva y rápida que en HR, sugiriendo que podrían generarse condiciones que favorezcan el cambio del hongo hacia una fase más virulenta, asociada por ejemplo con la secreción de toxinas, debilitando al hospedador o retardando o inhibiendo las respuestas de defensa.

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DEL MODELO DE TOXICIDAD EN MAÍZ CON FB1

1. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE FB1

En el presente trabajo de tesis, la FB1 requerida para el tratamiento de las plántulas de maíz fue producida en medio de cultivo líquido Myro en biorreactor, el cual se inició a partir de la inoculación de la suspensión de conidias de *F. verticilloides* RC2024, como se describe en los Materiales y Métodos. Luego de 28 días de incubación, el medio líquido fermentado fue autoclavado, clarificado y acondicionado para su utilización en el esquema experimental de fitotoxicidad. La identificación y cuantificación de los niveles de fumonisinas en el medio Myro fermentado y acondicionado, se realizó mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. Las concentraciones de las fumonisinas B1, B2 y B3 en el caldo de cultivo se calcularon mediante extrapolación de las áreas de los picos correspondientes a la toxina (Figura 8), sobre una curva de calibración construida con estándares comerciales de las toxinas (PROMEC, Republic of South Africa). La concentración de FB1 fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ ($n=5$).



Figura 8: Perfil toxicogénico sintetizado por *F. verticilloides* RC2024 en el biorreactor.

Cromatograma obtenido por HPLC-FL, indicando la presencia de FB1, FB2 y FB3 en el extracto de cultivo de *F. verticilloides*, derivatizadas con o-ftaldialdehído (OPA). La separación se realizó con una columna C-18 de fase reversa, usando como fase móvil la mezcla metanol:NaH₂PO₄ 0.1 M (75:25), a pH: 3.35 y a un flujo de 1.5 ml/min.

2. EFECTOS DE LA FB1 SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

2.1. Altura y longitud de la raíz principal

Se realizó la medición de la altura de las plántulas y de la longitud de la raíz principal en HR e HS regados con soluciones de FB1 a dos concentraciones, 1 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, como se muestra en la Tabla 2. Ambos híbridos expuestos a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la toxina presentaron una disminución en la altura a los 7 dps, aunque este efecto se mantuvo hasta el día 14 sólo en el HS. A los 21 dps no se detectaron cambios en comparación con el control. Con respecto a la longitud de la raíz principal, sólo se observó reducción significativa ($p < 0.05$) en HS a los 7 dps, pero este parámetro se normalizó a los 14 y 21 dps.

El riego con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ indujo a una inhibición severa de los dos parámetros (longitud de tallo y raíz), en ambos híbridos y en los 3 días de cosecha, comparados con sus respectivos controles. Las reducciones de las longitudes de las raíces primarias de HR (14 y 21 dps) y del HS (7, 14 y 21 dps) fueron más importantes en el riego con 20 ppm de la toxina, con respecto al riego con la concentración más baja. En cuanto a la altura de las plántulas, los efectos más importantes fueron observados en el riego con 20 ppm de FB1 pero en menor medida que en raíz: sólo se registraron diferencias a los 21 dps en el HR y a los 7, 14 y 21 dps en el HS.

Tabla 2. Efectos del riego con soluciones de FB1 sobre el desarrollo de plántulas de maíz de híbrido resistente y susceptible*

Cultivares ^v	FB ₁ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Altura de la plántula (cm) ^{††}			Longitud de la raíz primaria (cm)		
		Días post-inoculación			Días post-inoculación		
		7	14	21	7	14	21
HR	0	15.4 ± 0.7	38.7 ± 0.4	52.4 ± 2.5	16.0 ± 0.5	23.4 ± 2.2	32.3 ± 4.0
	1	7.2 ± 0.4d	29.4 ± 2.1	53.9 ± 1.3	12.6 ± 0.9	20.3 ± 0.9	28.9 ± 2.6
	20	10.7 ± 1.2c	16.6 ± 1.5d	24.0 ± 2.1df	7.1 ± 1.3d	5.2 ± 0.8df	7.2 ± 1.3df
HS	0	16.6 ± 0.6	38.2 ± 1.1	49.5 ± 0.9	17.6 ± 0.7	20.0 ± 0.9	32.6 ± 0.9
	1	7.4 ± 0.5d	32.3 ± 1.1c	49.0 ± 1.1	9.2 ± 0.7c	20.2 ± 1.3	27.4 ± 1.5
	20	10.3 ± 0.5de	18.4 ± 2.1bf	27.0 ± 2.6df	4.9 ± 0.2de	8.3 ± 0.9df	7.9 ± 1.9df

*Los datos están expresados como la media \pm error estándar ($n \geq 10$). Las macetas fueron regadas con 100 ml de solución de FB1, a 0, 1 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a los 2, 4 y 6 días post-siembra.

^vHR: Híbrido resistente. HS: Híbrido susceptible.

[†]Las letras c y d indican que el valor p de los grupos tratados con FB1 (1 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) difieren significativamente ($c, p < 0.05$; $d, p < 0.001$) de su respectivo grupo control (FB1: 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

[‡]Las letras e y f indican que el valor p del grupo tratado con FB1 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ es significativamente ($e, p < 0.05$; $f, p < 0.001$) diferente con respecto al grupo tratado con FB1: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.2. Peso seco de la porción aérea, raíz y biomasa total

Se determinó la biomasa total de las plántulas del HR y del HS, como así también el peso seco de parte aérea y sistema radical (Figura 9). El riego con FB1 a un nivel de 1 ppm disminuyó la biomasa total en

ambos híbridos debido a las reducciones del crecimiento de la raíz y la parte aérea, a los 7 y 14 dps. Sin embargo, este efecto se revirtió en ambos cultivares a los 21 dps, donde las características fenotípicas de las plántulas tratadas fueron similares a sus respectivos controles.

El riego con 20 ppm de FB1 causó reducciones en la biomasa total de las plántulas de ambos híbridos, efectos determinados por los menores desarrollos radicales registrados en los tres días de cosecha estudiados, y por las disminuciones de los pesos de las partes aéreas a los 14 y 21 dps. Más aún, FB1 (20 ppm) determinó la ausencia de crecimiento significativo de las raíces de las plántulas de ambos híbridos, lo cual se deduce por no haberse registrado cambios en el peso seco radical entre los 21 dps y los 14 dps.

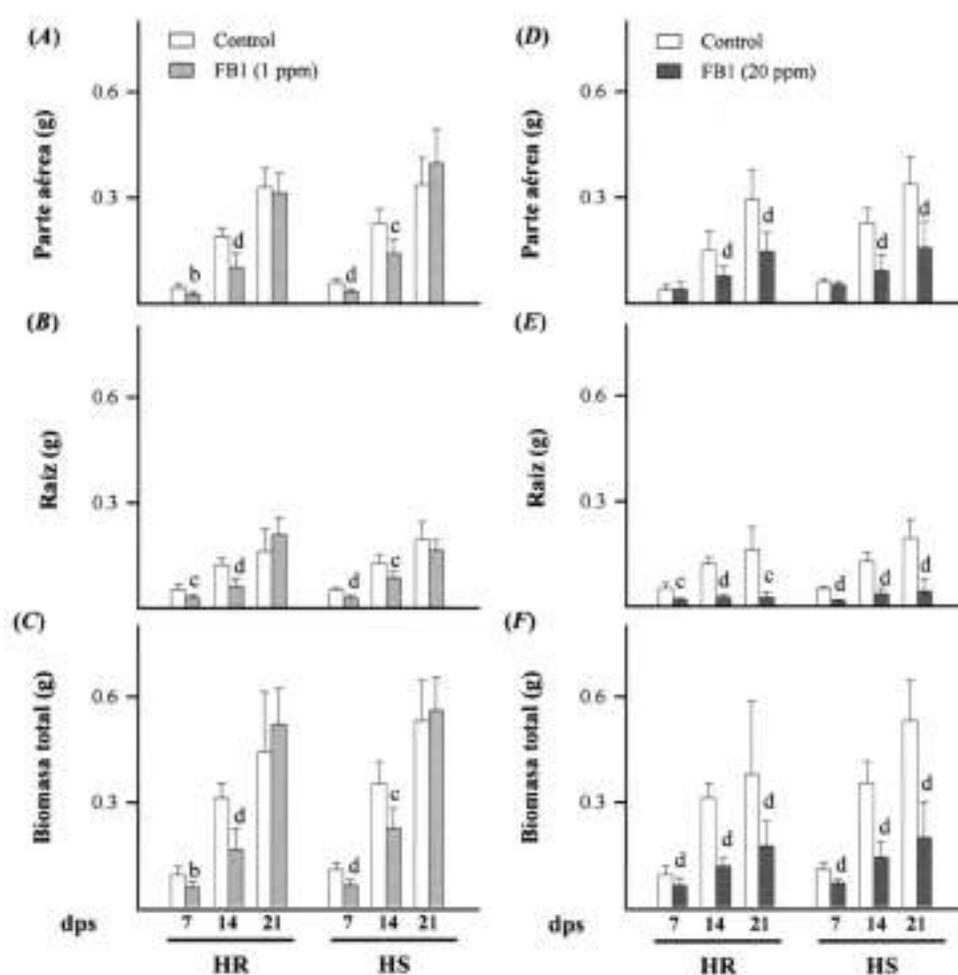


Figura 9: Efectos del riego con FB1 sobre el crecimiento de híbrido resistente y susceptible (HR y HS) de maíz.



Medición de la biomasa de la parte aérea (**A**), (**D**), radical (**B**), (**E**), y total (**C**), (**F**) de las plántulas, expuestas a niveles de toxina de 0 (controles, barras blancas), 1 (barras gris claro) y 20 ppm (barras gris oscuro).

Los datos están expresados como la media \pm error estándar ($n \geq 10$). ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ^d $p < 0.0001$, de los maíces expuestos a FB1 con respecto a su correspondiente control, a los 7, 14 y 21 dps.

Aunque todas las plántulas regadas con la toxina presentaron una severa reducción en la biomasa, en las tratadas con la menor concentración de FB1, este efecto fue transitorio, adquiriendo nuevamente el fenotipo de las plántulas control, a los 21 dps.

3. ACCIÓN FITOTÓXICA DE LA FB1

Se investigó la acción fitotóxica de la FB1 en el crecimiento y morfología de las plántulas (Figura 10). Los síntomas de enfermedad incluyeron marchitamiento y subdesarrollo de las plántulas, amarilleamiento y enrollamiento de hojas. Además, se observaron lesiones de tipo necróticas foliares y radicales (flechas; b, d, g, i), las cuales fueron evidentes desde el día 7 y persistieron hasta los 21 dps en HR e HS regados con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FB1. El sistema radical también fue afectado negativamente, mostrando crecimiento reducido de sus raíces (primarias, seminales y laterales) y carencia de pelos radicales (a, b, f, g, i).

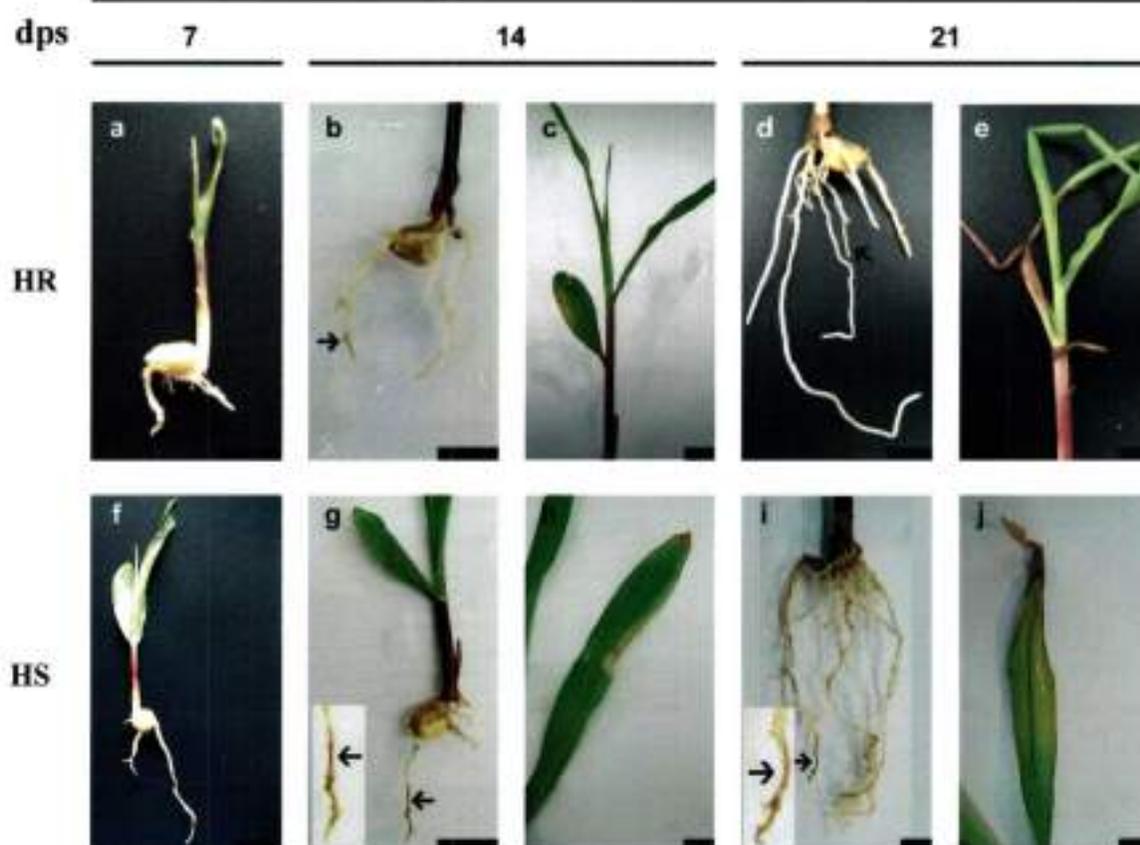


Figura 10: Signos de fitopatogenicidad causados por el riego de híbrido resistente y susceptible (HR y de HS) con FB1 20 ppm.

El espectro de síntomas de enfermedad observados a los 7, 14 y 21 dps, en las plántulas de maíz incluyeron: crecimiento reducido de raíces: primarias, seminales y laterales y escasos pelos radicales (a, b, f, g, i); lesiones tipo necróticas en raíces (14-21 dps) (flechas; b, d, g, i; inset; g, i); disminución en el crecimiento del tallo y marchitamiento (a, f) y lesiones foliares: hojas enrolladas (a, e, f, j), amarilleamiento (c, h, j) y lesiones tipo necróticas (e, j). Barras: (c, e, h, i, j) 5 mm; (d, f) 7.5 mm; (a, b, g) 10 mm.

4. CONTENIDO EN LA MATERIA SECA DE HOJA

Un aumento en el contenido en la materia seca de hojas (LDMC, *Leaf Dry Matter Content*); relación entre masa seca de hoja (mg) con respecto a la masa fresca (g) indica un menor desarrollo de la planta. Este parámetro fue severamente influenciado por el tratamiento con 20 ppm de FB1. En el HR; el LDMC fue incrementado por el riego con la toxina a los 7, 14 y 21 dps, aunque este efecto fue cuantitativamente mayor el día 7. En el HS se observan resultados similares, pero en este último caso los aumentos en el LDMC fueron proporcionalmente mayores (21, 17 y 31% a los 7, 14 y 21 dps, con respecto a los registrados en el HR (20, 10 y 11 %) a los 7, 14 y 21 dps; respectivamente.

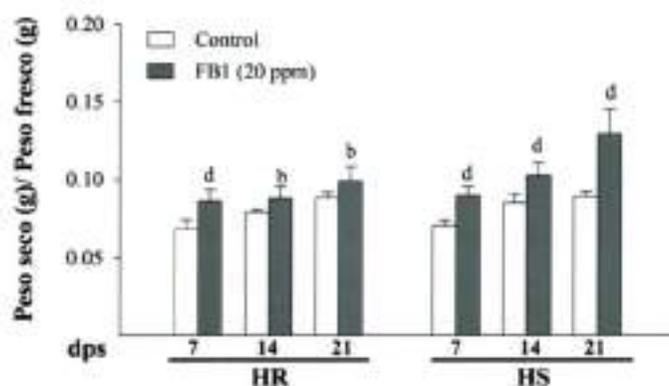
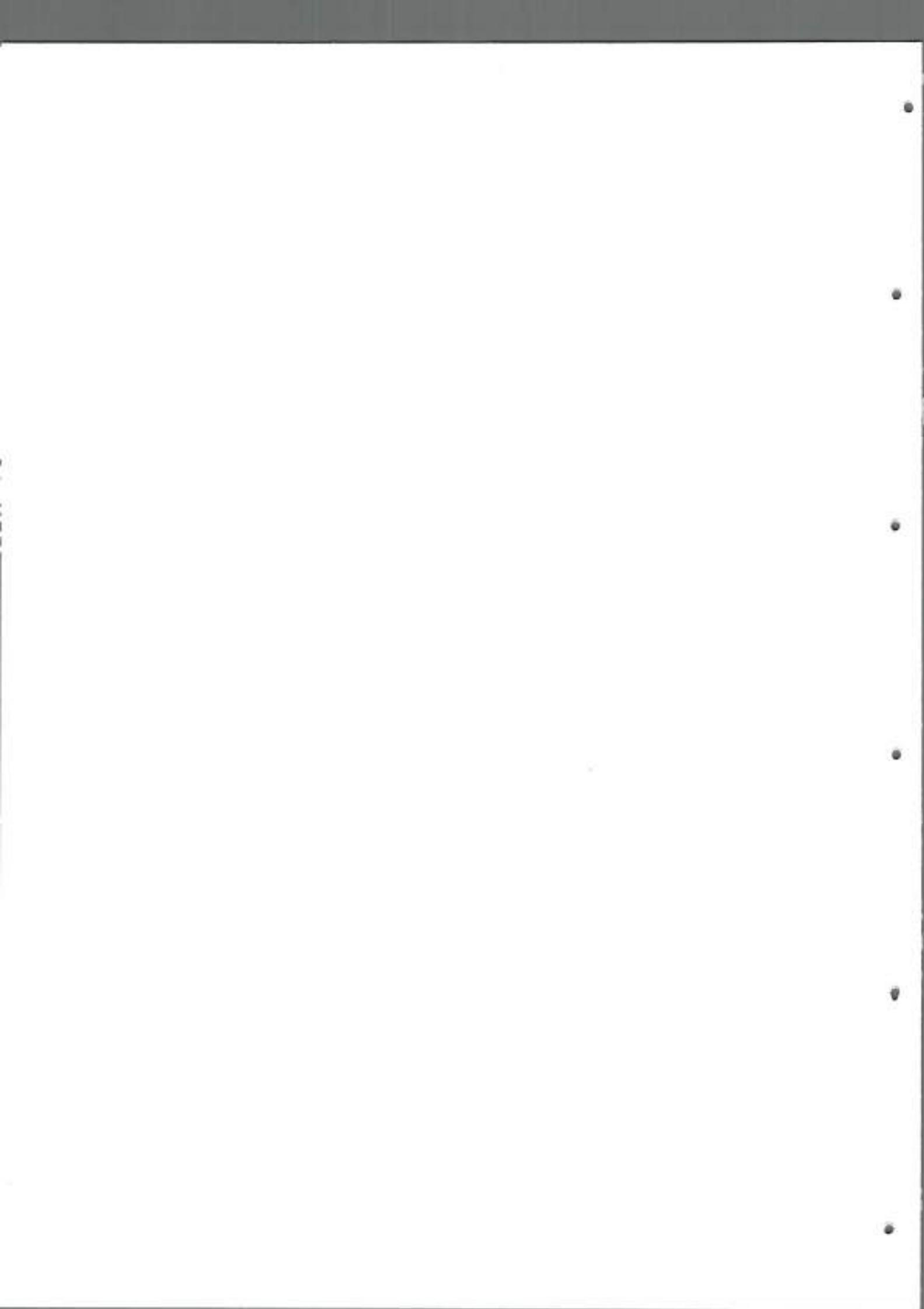


Figura 11: Efectos del riego con 20 ppm de FB1 en el contenido de materia en hoja (LDMC) de híbrido resistente y susceptible (HR y HS).

Las barras representan la media \pm SE ($n=10$). ^b $p<0.01$; ^d $p<0.0001$, en plántulas expuesta a la toxina con respecto a su correspondiente control, a los 7, 14 y 21 dps.

5. EFECTO DE LA FB1 SOBRE EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES

Uno de los efectos más sobresalientes de la exposición directa de FB1 es la gran diversidad de cambios morfológicos que sufre el sistema radicular (Figura 12). Estas modificaciones se encontraron directamente relacionadas con la concentración de la toxina. A niveles bajos de FB1 (1ppm), en el HR se observó un desarrollo radicular más lento que en los controles, particularmente en lo que respecta al crecimiento de las raíces laterales. Mientras que en el HS, la toxina inhibió el crecimiento de la raíz primaria y raíces seminales y laterales, en especial a los 7 dps. Sin embargo, ambos híbridos presentaron una arquitectura similar a sus controles a los 21 dps. Por otro lado, FB1 a 20 ppm, redujo fuertemente el crecimiento, del HR y del HS, acortando la longitud de la raíz primaria y raíces seminales, afectando el número de raíces seminales, e inhibiendo el desarrollo de las raíces laterales, a los 7, 14 y 21 dps. Estos cambios se manifestaron en forma más pronunciada en el HS.



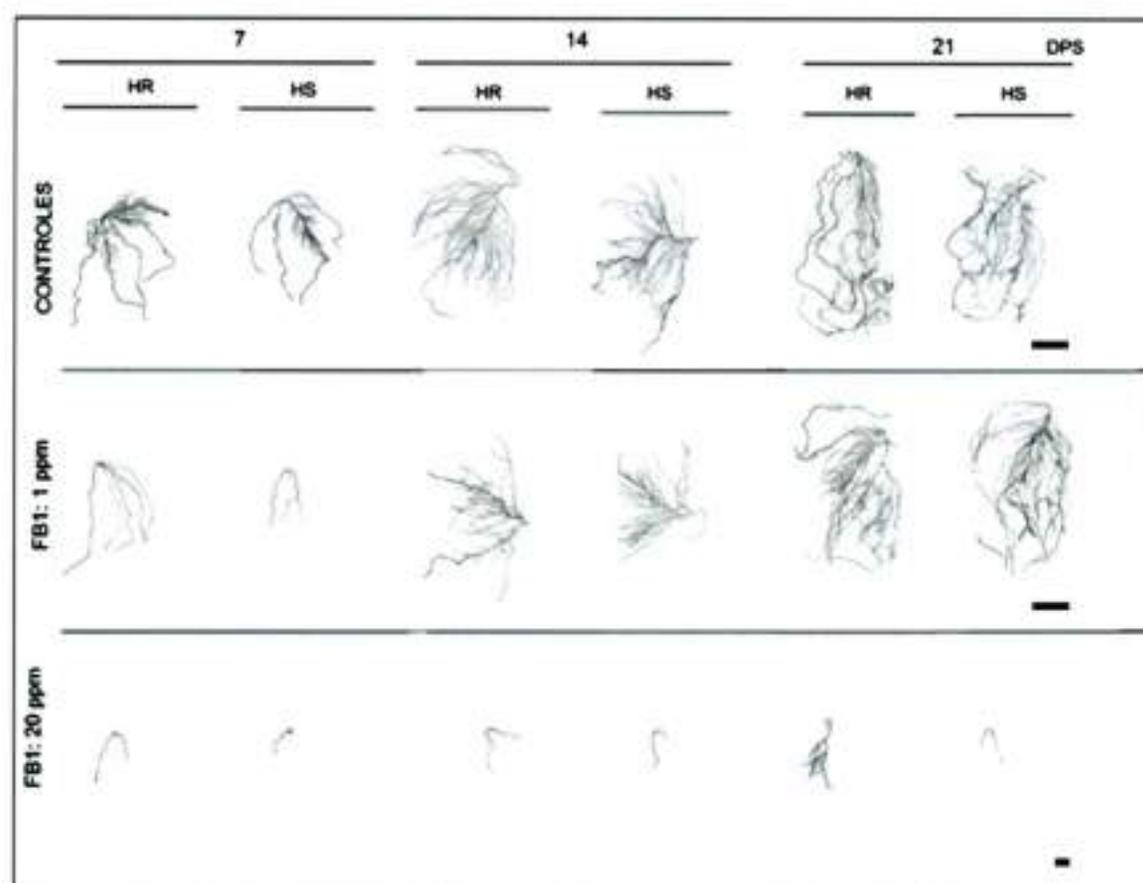


Figura 12: Efectos del riego con FB1 sobre el desarrollo del sistema radical de híbrido resistente y susceptible (HR e HS): Análisis morfológico.

Comparación de imágenes digitales de los sistemas radicales de raíces expuestas a niveles de toxina de 0, 1 y 20 ppm, a los 7, 14 y 21 dps. Barras (Controles- FB1: 1 ppm): 3.8 cm. Barra (FB1: 20 ppm): 1.3 cm.

5.1. Longitud específica de raíz

De manera similar a lo realizado en el modelo de infección se analizó el parámetro SRL, con el fin de caracterizar funcionalmente al tejido radical luego del tratamiento con FB1 a diferentes concentraciones (Figura 13). Cuando las plántulas fueron expuestas a la concentración más baja de la toxina (1ppm), solamente el cultivar susceptible presentó una disminución en el SRL (a los 7 y 21 dps; $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente), lo cual refleja deficiencia en el funcionamiento radical normal, relacionado principalmente con una menor captación de nutrientes y agua. Por otro lado, el riego con 20 ppm de la toxina generó mayor efecto inhibitorio en la funcionalidad de la raíz, que con el riego a bajos niveles de FB1. Estos resultados se repitieron en ambos híbridos, y en cada uno de los días de cosecha (7, 14 y 21 dps) ($p < 0.05$ a $p < 0.0001$).

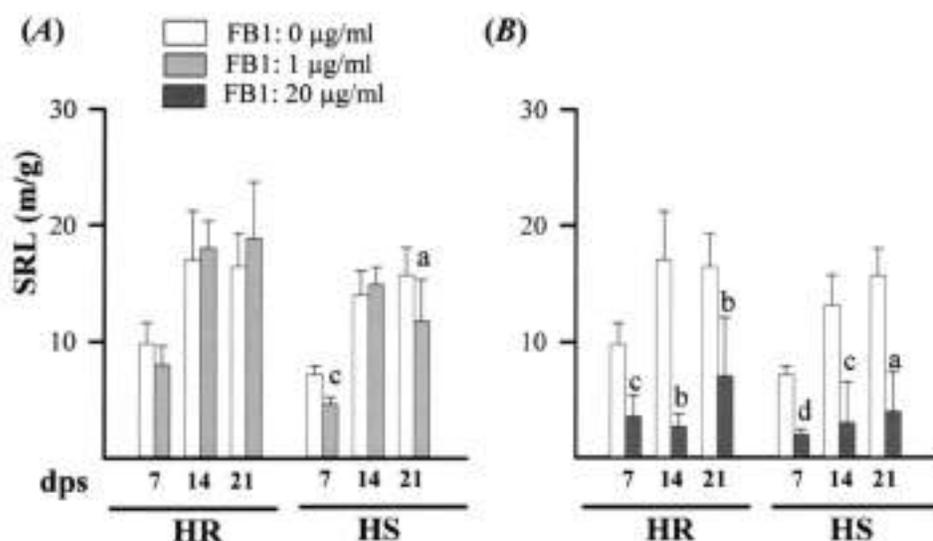


Figura 13. Efectos del riego con de FB1 sobre la longitud específica de raíz (SRL) de híbrido resistente y susceptible (HR y HS).

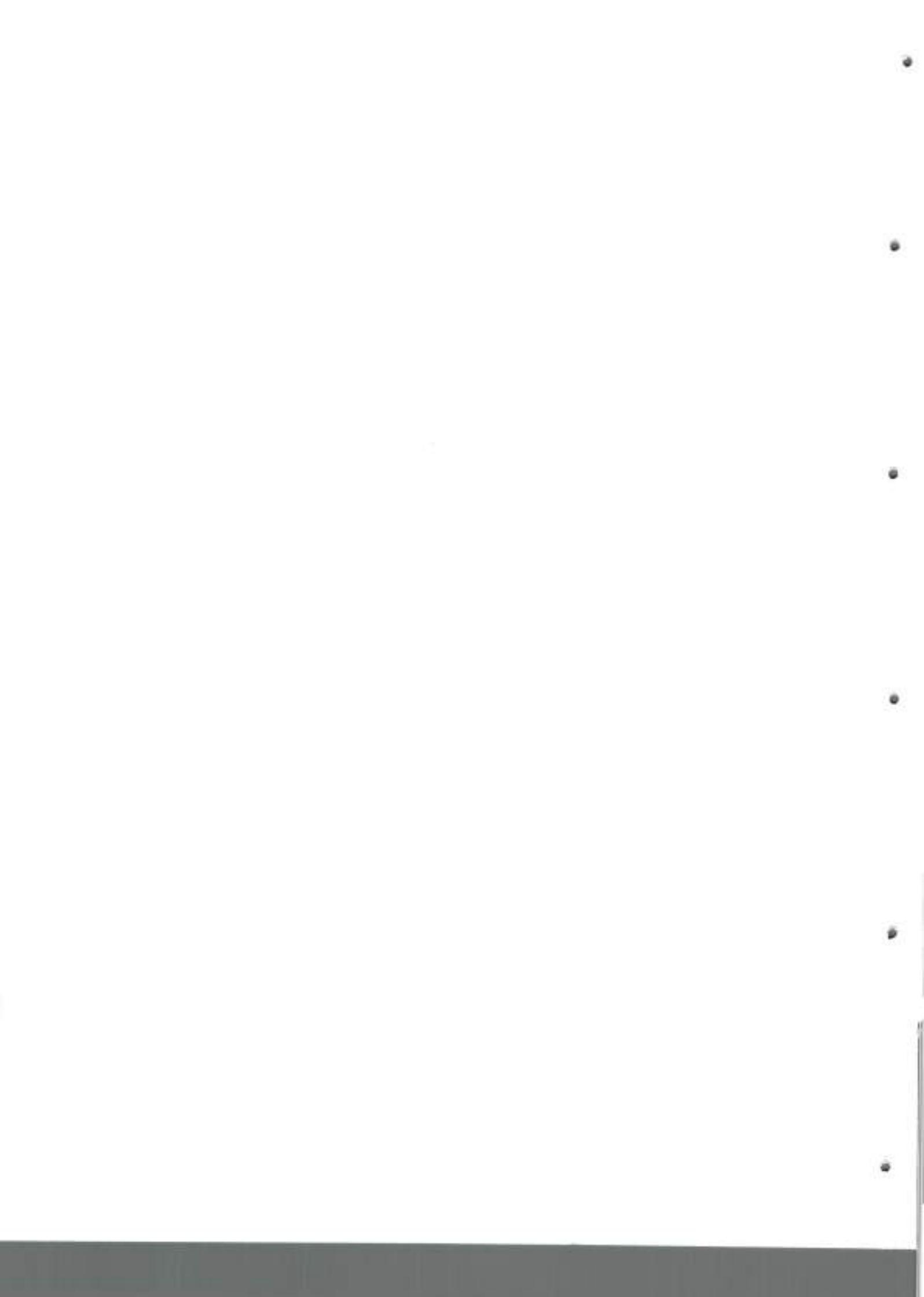
Alteraciones en el SRL en plántulas tratadas con FB1: 1 µg/ml (A) y 20 µg/ml (B).

Las barras representan la media \pm SE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$, en plántulas expuestas a la toxina (0, 1 y 20 ppm) con respecto a las plántulas control, a los 7, 14 y 21 dps.

6. CONCLUSIÓN CAPÍTULO II

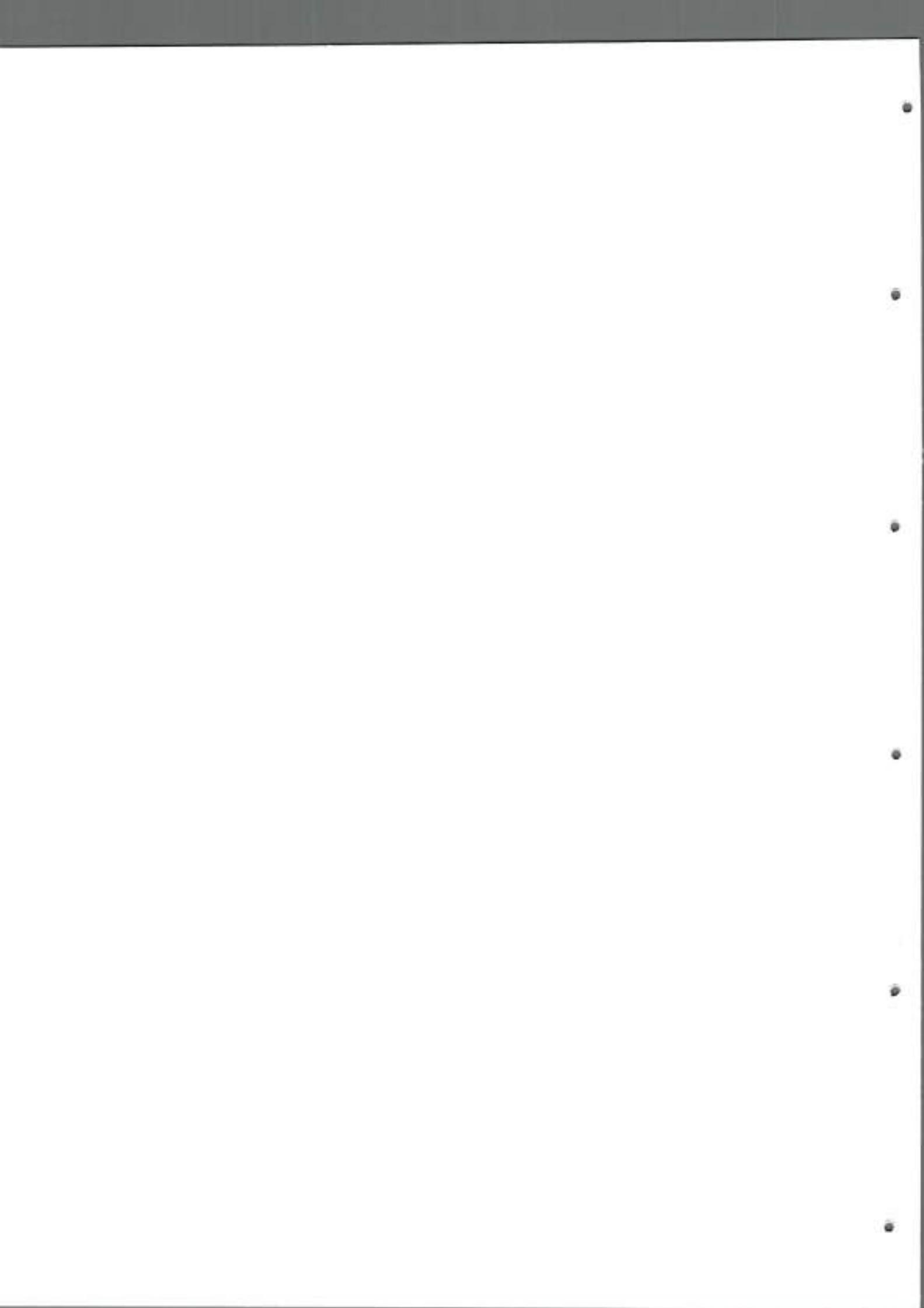
FB1 reprodujo, por sí sola, los síntomas de enfermedad causados por la infección de *F. verticillioides* en plántulas de maíz. Sin embargo, en comparación con la infección, la exposición a la toxina produjo síntomas de enfermedad más severos. Estos últimos incluyeron amarilleamiento de las hojas, marchitamiento y necrosis tanto en HR como en HS.

Materiales de cultivo autoclavado conteniendo niveles conocidos de fumonisinas es ampliamente utilizado para caracterizar la toxicidad de estos compuestos en animales y plantas. Sin embargo, además de fumonisinas, *F. verticillioides* puede producir otros compuestos biológicamente activos como ácido fusárico, fusarina C, beauvericina (la cual es producida por un bajo porcentaje de aislamientos fúngicos) y moniliformina. Aunque algunos efectos fitotóxicos involucrados en la patogénesis de plántulas de maíz han sido atribuidos al ácido fusárico, en medio de cultivo líquido, sólo producen esta toxina miembros de la población de apareamiento C (especies de *Fusarium* aislados de arroz), algunas cepas de *F. oxysporum* y *F. solani*.



Las observaciones en esta parte de la tesis sugieren que de la interacción de la FB1 con las plántulas de maíz, se producirían al menos dos resultados posibles, dependiendo fundamentalmente de la dosis de FB1. A niveles de 1 ppm, FB1 causó reducciones de la parte aérea y raíz a los 7 y 14 dps. Sin embargo, estos efectos fueron transitorios, ya que a los 21 dps, en ambos híbridos, los parámetros de crecimiento vegetativos se equipararon a los de sus respectivas muestras control. A niveles de 20 ppm, los procesos de detoxificación no serían efectivos, afectando severamente el ciclo de desarrollo (*developmental timing*) de las plántulas e induciendo posiblemente una senescencia temprana en maíz.

Es interesante destacar que la toxina afectó la funcionalidad de la raíz, pero a baja concentración sólo impactó en el HS. Por lo que la caracterización morfológica radical sería un buen parámetro, de utilidad práctica, para visualizar los efectos negativos de la toxina de manera diferencial entre híbridos.



CAPÍTULO III: BIODISTRIBUCIÓN DE FB1 EN MAÍZ Y SU EFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO

I. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE FB1

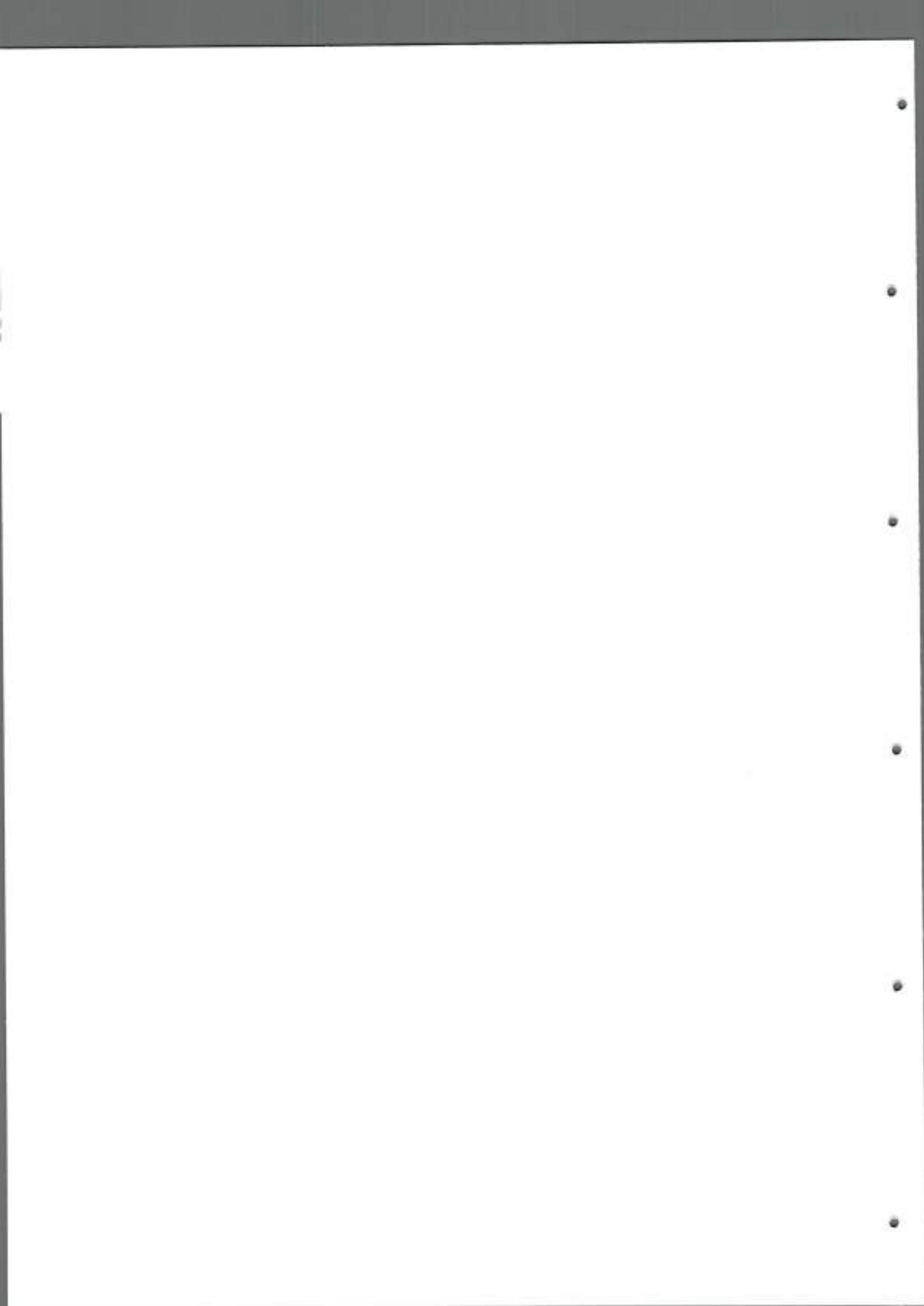
En este capítulo, se estudiaron comparativamente, en plántulas resistentes y susceptibles:

- a) La dinámica de distribución de FB1, sintetizada por *F. verticillioides* en el interior de plántulas infectadas, a la parte aérea y radical del maíz.
- b) La capacidad de las plántulas de maíz para captar FB1 del suelo y distribuirla en sus tejidos.

1.1. Identificación y cuantificación de FB1 en híbridos de maíz

Los niveles de FB1 se determinaron a partir de extractos orgánicos de tejido radical y de la porción aérea de plántulas resistentes y susceptibles, crecidas a partir de semillas inoculadas con solución conidial de *F. verticillioides*, o expuestas a la toxina, a los 7, 14 y 21 dps. La determinación de FB1 se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS), combinando la habilidad del HPLC para separar especies estructuralmente similares, con la capacidad del MS para dilucidar con gran exactitud la estructura de una molécula a partir de su patrón de fragmentación. Además, esta técnica nos permitió separar, identificar y cuantificar a FB1 de una matriz vegetal, sin necesidad de una derivatización previa del compuesto.

En la Figura 14 se pueden observar cromatogramas representativos de los resultados obtenidos en esta etapa. En términos generales, FB1 fue detectada tanto en HR como en HS, habiéndose encontrado mayores niveles de FB1 en raíces infectadas con *F. verticillioides* del HR que del HS.



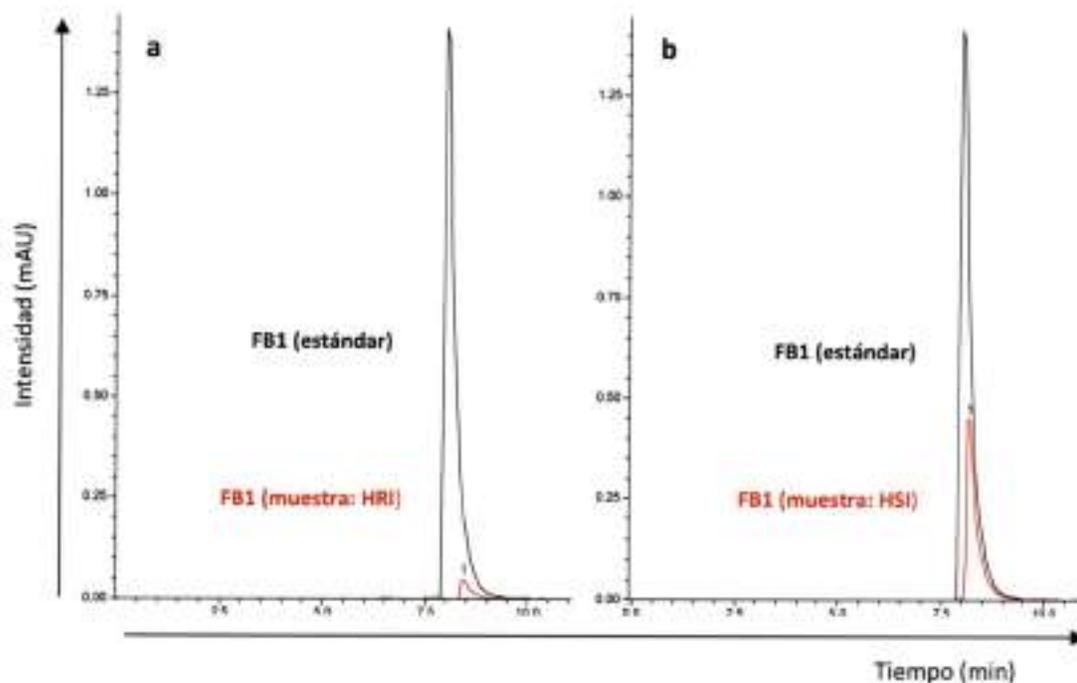


Figura 14: Identificación y cuantificación cromatográficas de FB1 en raíces de híbrido resistente y susceptible infectados con *F. verticillioides* en el sistema HPLC-ESI-QTOF.

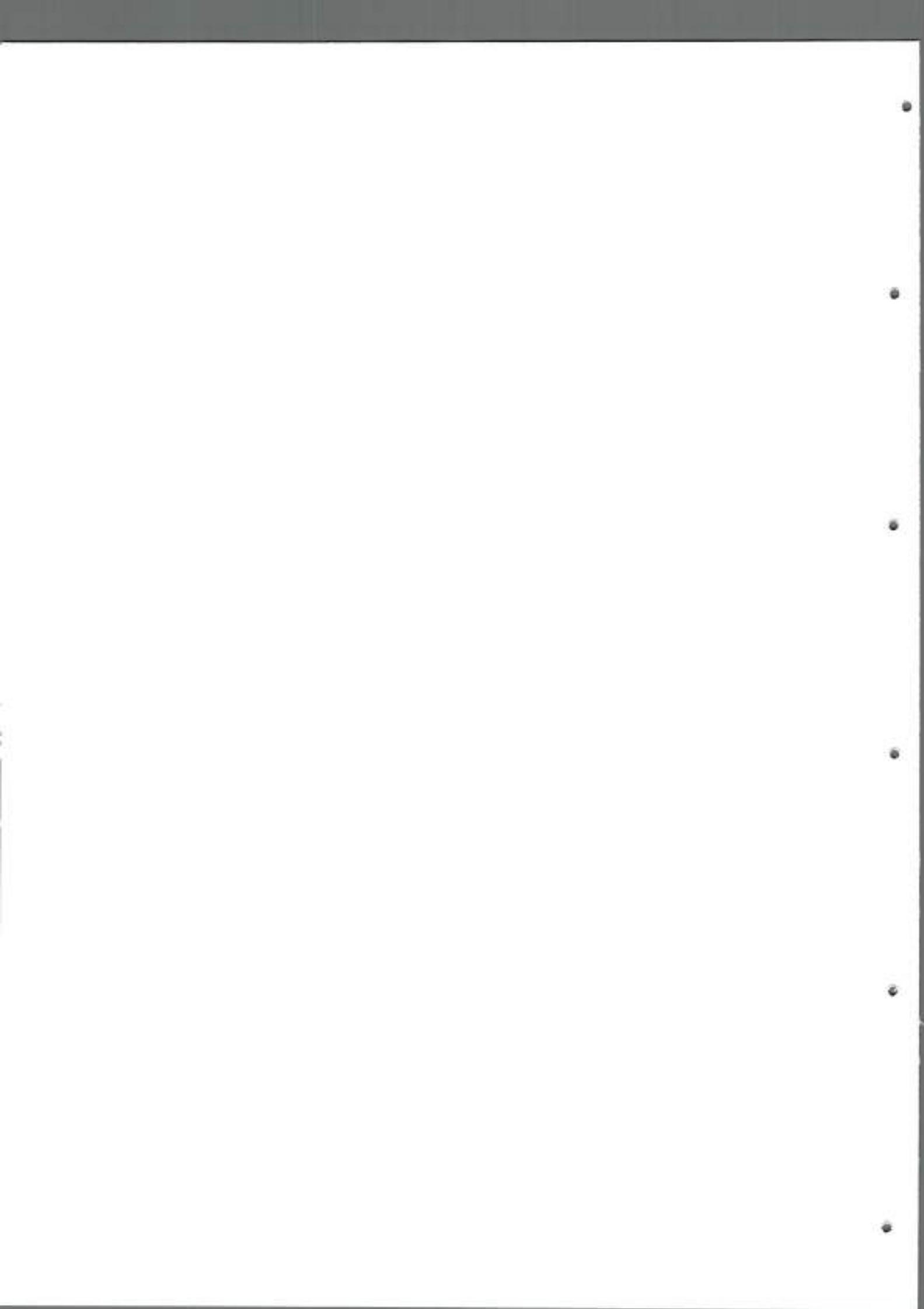
Cromatogramas superpuestos correspondiente al ión extraído (EIC) del estándar de FB1 (m/z : 722,3), con respecto al nivel de FB1 cuantificado en HRI (a) o en HSI (b), a los 14 dps.

1.2. Bioacumulación de FB1 en raíces

Con el objetivo de validar las muestras no infectadas incluidas en este estudio, previamente a la cuantificación de FB1 se confirmó la ausencia de infección fúngica en muestras control y en aquellas expuestas directamente a la toxina, mediante análisis microscópico de secciones de hojas y raíces teñidas con azul de tripan. La ausencia de FB1 en las muestras control (no infectadas y no regadas con soluciones de FB1) fue concordante con los exámenes microscópicos, en los que no se observaron elementos fúngicos infectantes.

La FB1 fue detectada a los 7, 14 y 21 dps en tejido radical de ambos híbridos, crecidos tanto a partir de semillas inoculadas con *F. verticillioides* como así también a partir de plántulas regadas con 20 ppm de la toxina (Figura 15).

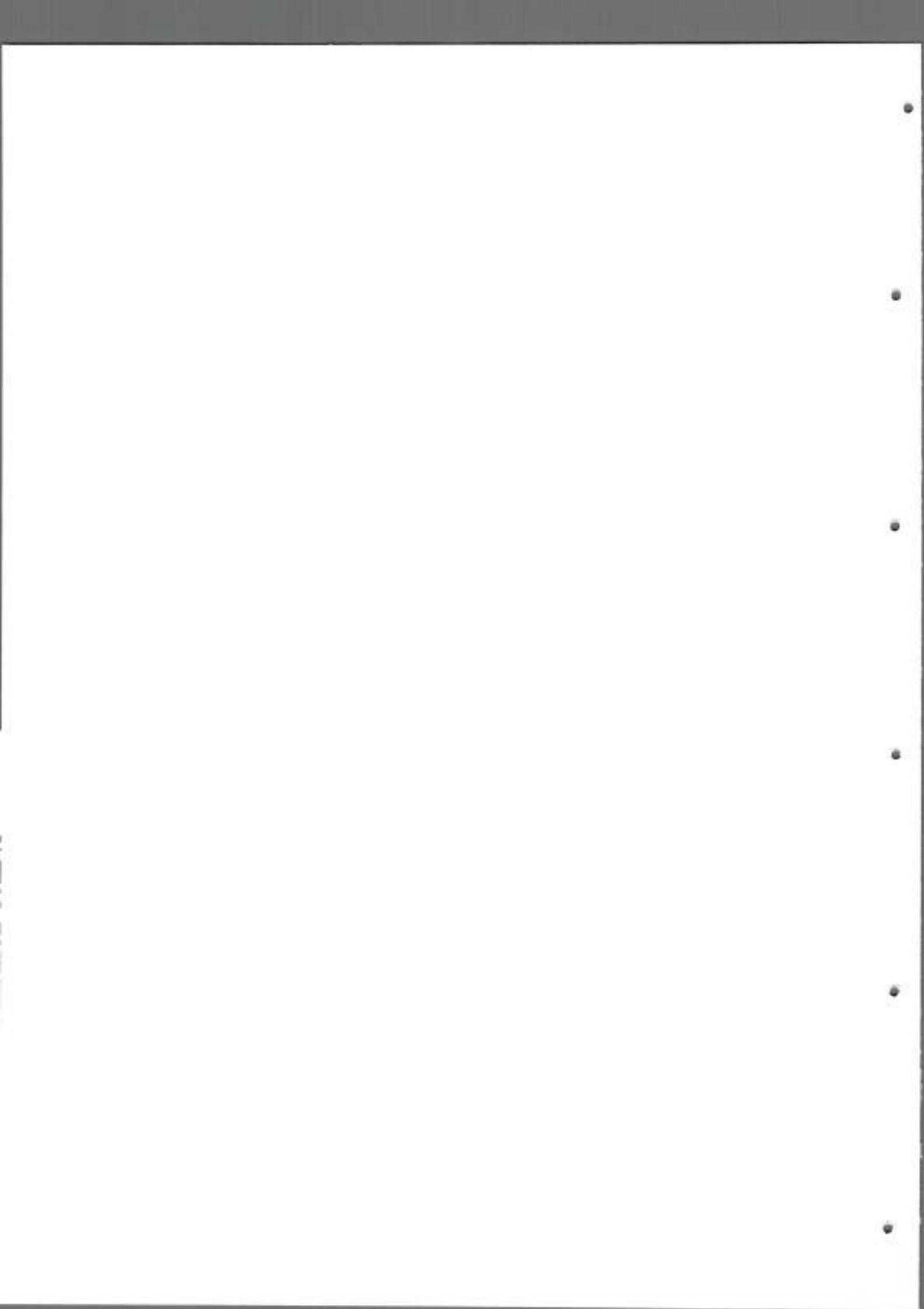
La FB1 se detectó en raíces de plántulas infectadas de ambos híbridos (Figura 15, barras en azul) a los 7, 14 y 21 dps, siendo mayores los niveles de la toxina en HS con respecto al HR. Las concentraciones máximas de FB1 se encontraron a los 14 dps, las cuales representaron un incremento de 17 y 19 veces con respecto al día 7 en HR e HS, respectivamente, disminuyendo ligeramente sus concentraciones a los 21 dps. Estos resultados indican que al infectar la semilla de maíz, de ambos híbridos, con la cepa de



estudio, a los 7 dps el hongo produce la toxina *in vivo* y la concentración de la misma aumenta considerablemente a los 14 dps. A los 21 días disminuye la concentración de la misma, pudiendo deberse a que la planta la excrete, compartamentalice o transforme químicamente ("enmascarar"). La concentración de FB1 obtenida a los 14 dps, este es un punto temporal importante a tener en cuenta para evaluar su efecto sobre otros componentes implicados en la defensa de la planta. Por otro lado, si bien la toxina se detectó en ambos híbridos en este modelo, en raíz, se registraron mayores niveles de la misma en el HS que en el HR, sugiriendo que esta diferencia entre híbridos podría traducirse en diferentes capacidades de la plántula para controlar la infección y con esto la producción de toxina, como así también la posibilidad de diferentes capacidades de detoxificación y/o distribución.

FB1 también fue detectada en raíces de plántulas regadas con la toxina a 20 ppm (Figura 15, barras en gris oscuro), en ambos híbridos y a los 7, 14 y 21 dps, siendo considerablemente mayor el nivel de la toxina registrada a los 21 dps en el HS con respecto al HR. En HR, los niveles encontrados en el día 7 se mantuvieron sin grandes modificaciones hasta el día 21. En HS, los niveles de FB1 se mantuvieron relativamente constantes hasta el día 14, y luego se incrementó su concentración notablemente a los 21 dps, donde alcanzó su nivel máximo (6 veces mayor con respecto al día 7). En este modelo, teniendo en cuenta la detección y cuantificación de FB1 en las raíces de las plántulas, en ausencia de infección fúngica, implicaría que la toxina puede ingresar a las plántulas desde la arena y acumularse en el tejido vegetal subterráneo. Aunque la toxina se registra en ambos híbridos, estos presentan una cinética de acumulación diferente, sobresaliendo la bioacumulación de FB1 en HS a los 21 dps.

En términos generales FB1 fue significativamente mayor en HS que en HR para los dos tratamientos, excepto para la toxicidad del día 14. Las diferencias más notables entre híbridos se registraron en los tejidos infectados, en los tres días evaluados. Mientras que en el ensayo de fitotoxicidad, la diferencia más importante en cuanto a bioacumulación de FB1 fue registrada a los 21 dps, donde el nivel medio de toxina fue 9 veces mayor en el HS que en el HR.



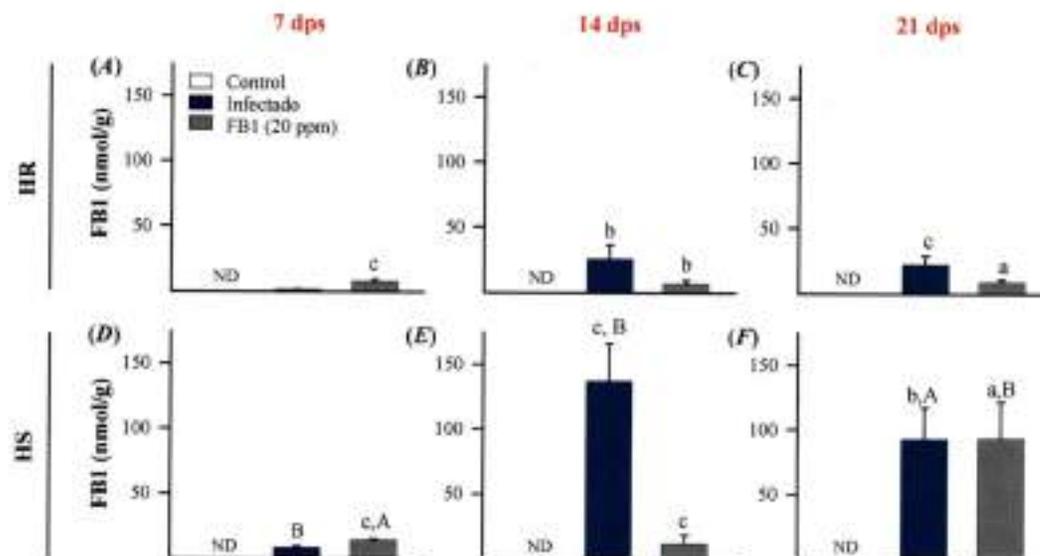


Figura 15: Niveles de FB1 en raíces de HR y HS infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FB1.

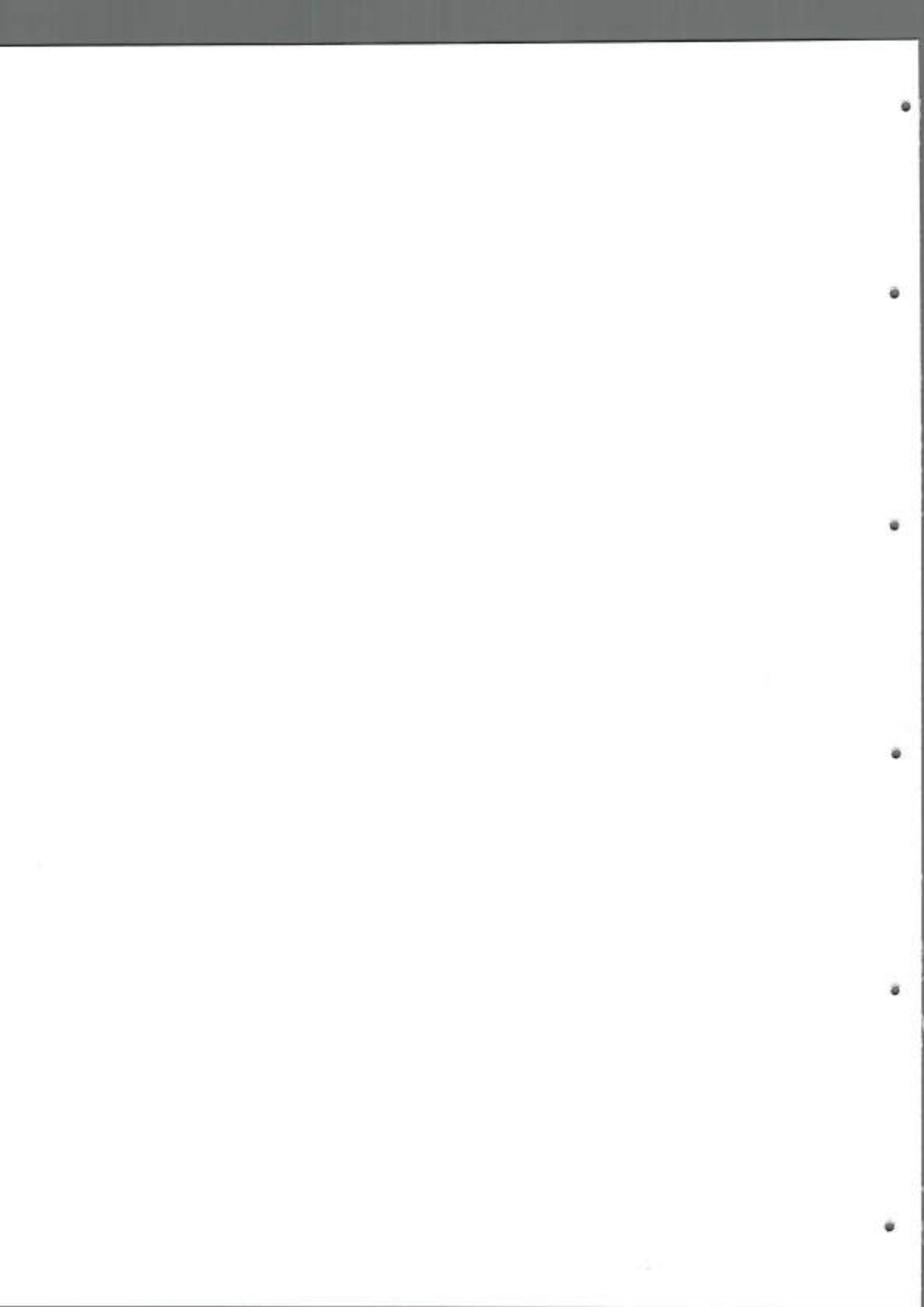
Los datos están representados como la media \pm SE de FB1 en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FB1 (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dps. ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control. Mayúsculas: Comparación de HR infectado o regado con FB1 con respecto al HS con el mismo tratamiento. ND: No detectable.

1.3. Bioacumulación de FB1 en parte aérea de las plántulas

De manera similar a lo realizado en raíz, se evaluó la presencia de FB1 en parte aérea de plántulas resistentes y susceptibles de maíz y se procedió a determinar la concentración de la toxina en extractos de estos tejidos obtenidos a los 7, 14 y 21 dps. Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 16.

Los niveles de FB1 en la parte aérea fueron marcadamente menores que en las raíces, sugiriendo una acumulación preferencial de la toxina en tejidos subterráneos. La FB1 fue detectada en todos los tejidos foliares provenientes de cultivares resistentes como susceptibles, ya sea crecidos a partir de semillas infectadas con el hongo como también a partir de las plántulas regadas con la toxina; con la única excepción de la porción aérea de HR infectado, a los 7 dps, donde no se detectó la toxina.

En el HR infectado (Figura 16, panel superior, barras centrales en azul), los niveles de FB1 a los 14 y 21 dps estuvieron próximos al límite de cuantificación de la metodología usada. Mientras que en HS infectado (Figura 16, panel inferior, barras centrales en azul), la toxina se detectó a los 7 dps, aumentando 7 veces a los 14 dps (máximo nivel observado en este tratamiento) y disminuyendo 4 veces a los 21 dps, con respecto a los 14 dps. Teniendo en cuenta los observado anteriormente, en plántulas



crecidas a partir de semillas infectadas, el movimiento fúngico fue tanto ascendente como descendente, sugiriendo que la presencia de toxina podría ser una consecuencia de la producción fúngica localizada. Sin embargo, la presencia de la toxina en la porción aérea, podría deberse también a una translocación de la misma de las raíces hacia la parte aérea. Por otro lado, se encontraron diferencias entre híbridos: en el HR se registraron niveles muy bajos de FB1, indicando que la planta podría estar restringiendo el crecimiento fúngico y la toxicogénesis. En el HS, se registran mayores niveles de la toxina y de manera similar a lo observado en raíz, la concentración máxima también se observó a los 14 dps, sugiriendo una mayor distribución/dispersión de FB1 y menor capacidad en el sistema de defensa de la planta para circunscribir la infección y producción de la toxina.

FB1 también fue detectada en la porción aérea de plántulas desarrolladas a partir de semillas regadas con la toxina de 20 ppm (Figura 16, barras en gris oscuro), en ambos híbridos, y a los tres tiempos evaluados. Estos resultados sugieren que la toxina, que fue tomada por las raíces, pudo distribuirse hacia la parte superior de las plántulas, registrándose niveles considerables de FB1 a los 7 dps y en ambos híbridos. En el HR, los niveles de toxina encontradas en el día 7 fueron similares a los del día 21, registrándose el valor máximo a los 14 dps. En HS, los niveles de FB1 a los 7 dps, aumentaron 10 veces hasta los 14 dps, y luego estos se mantuvieron relativamente constantes hasta la última cosecha. Estas diferencias encontradas en la cinética de distribución de la toxina de acuerdo al híbrido, sugieren diferencias en la capacidad de las plántulas de detoxificar a la FB1.

Los valores medios de concentración de la toxina encontrados en el ensayo de fitotoxicidad fueron significativamente mayores que los hallados en la infección y a los 14 y 21 dps fueron mayores en el HS que en el HR, en ambos tratamientos.

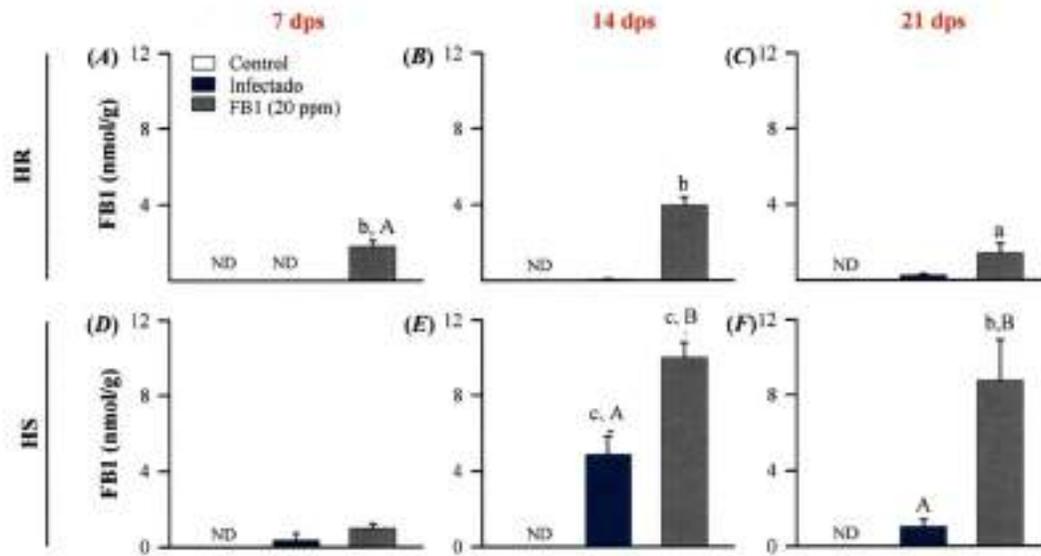


Figura 16: Niveles de FB1 en la porción aérea de HR y HS infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FB1.

Los datos están representados como la media \pm SE de FB1 en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FB1 (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dps. ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control. Mayúsculas: Comparación de HR infectado o regado con FB1 con respecto al HS con el mismo tratamiento. ND: No detectable.

1.4. Bioacumulación de FB1 en arena

Este estudio se realizó en las arenas de las macetas donde crecieron las plantas infectadas de ambos híbridos, y sus controles durante 21 días, se realizó bajo la hipótesis de la que la exudación radical es un mecanismo probable de detoxificación de la toxina por parte del maíz. En la Figura 17 se muestran cromatogramas representativos de los resultados de esta etapa.

La FB1 fue detectada y cuantificada en extracto de arenas donde crecieron ambos híbridos infectados. Las concentraciones encontradas fueron de 8,46 y de 6,15 ng FB1/g arena ($n=3$), en las arenas donde crecieron el HR y el HS, respectivamente; no detectándose niveles de toxina en las muestras control.

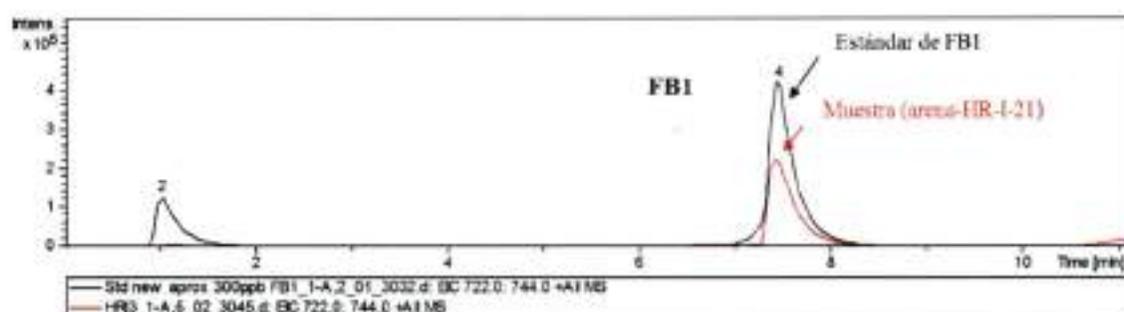


Figura 17: Identificación y cuantificación cromatográficas de FB1 en arena donde crecieron plántulas de HR e HS infectadas con *F. verticillioides* por 21 días.

Cromatograma correspondiente al ión extraído (EIC) a m/z 722 en el sistema HPLC/ESI-MS, correspondiente al extracto de la muestra de arena en donde se desarrolló el HR infectado hasta los 21 dps, y al estándar de FB1.

2. EVALUACIÓN DE LA DISRUPCIÓN DEL METABOLISMO DE ESFINGOLÍPIDOS EN MAÍZ

La actividad biológica de la FB1 podría incidir en el metabolismo de los esfingolípidos, por inhibición competitiva de la toxina sobre la actividad de la ceramida sintetasa, lo cual se correlacionaría con aumentos en los niveles intracelulares de los sustratos naturales enzima, las bases esfingoides simples, Sa y Pso, y depleción en los niveles de esfingolípidos complejos.

A continuación evaluamos comparativamente en plántulas resistentes y susceptibles:

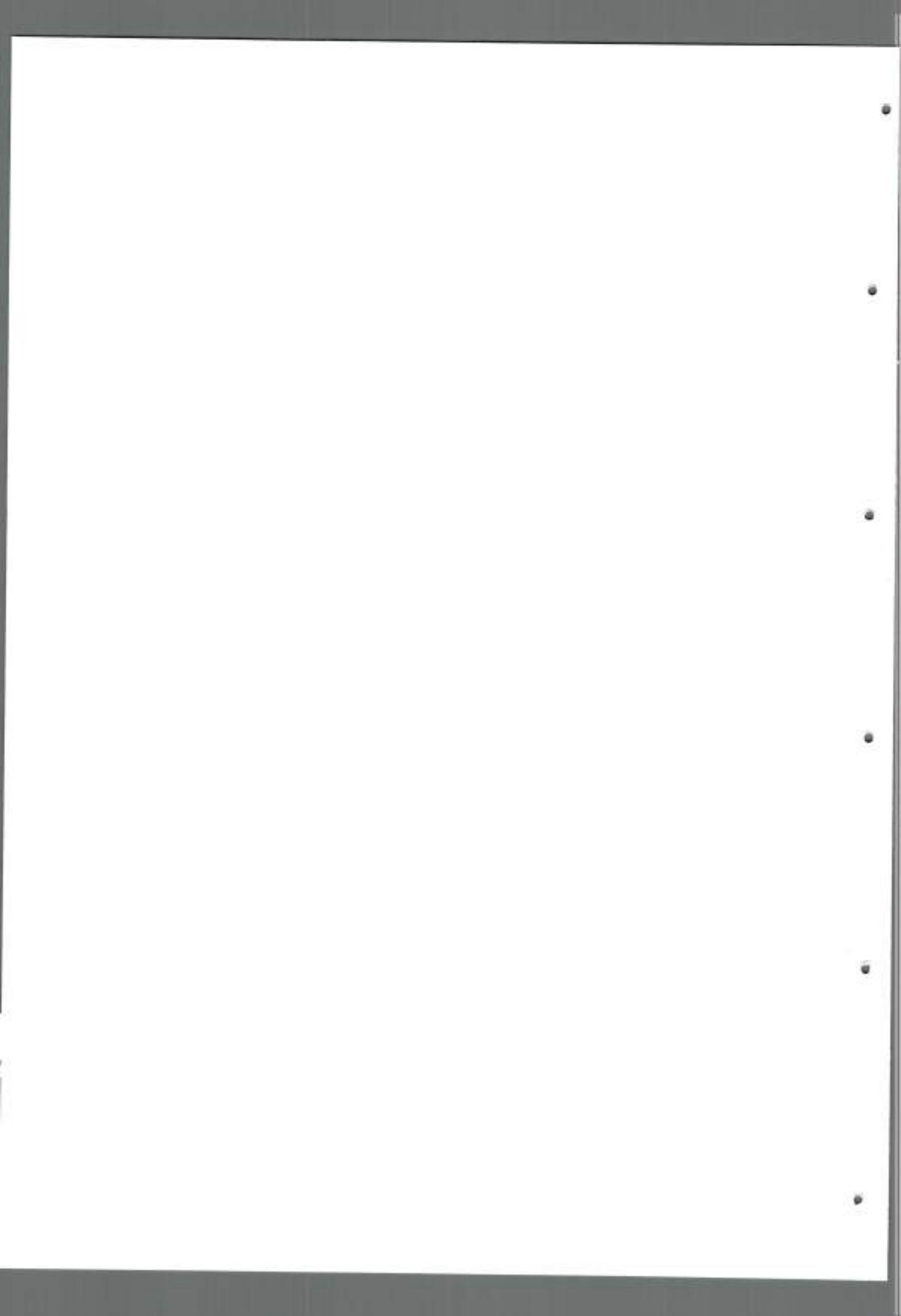
- Los niveles de Sa y Pso en raíz y parte aérea de plántulas infectadas con *F. verticillioides* RC2024.
- La capacidad de la FB1 (modelo de fitotoxicidad) de alterar el metabolismo lipídico tanto en tejido radical como en la porción aérea.

2.1. Identificación y cuantificación de bases esfingoides en plántulas de maíz

Los niveles de Sa y Pso se determinaron a los 7, 14 y 21 dps, en extractos orgánicos de tejido radical y de la porción aérea de plántulas resistentes y susceptibles, crecidas a partir de semillas inoculadas con solución conidial de *F. verticillioides*, o expuestas a la toxina.

En la Figura 18 se muestran los cromatogramas de estándares comerciales de Sa y Pso (Panel A), y los espectros de masa de las moléculas protonadas de ambas bases esfingoides (Panel B).

La Figura 19 muestra cromatogramas representativos de los niveles de Sa (superposición de infectado y control) encontrados en raíces de plántulas del HR (Panel superior) y del HS (Panel inferior), a los 14 dps.



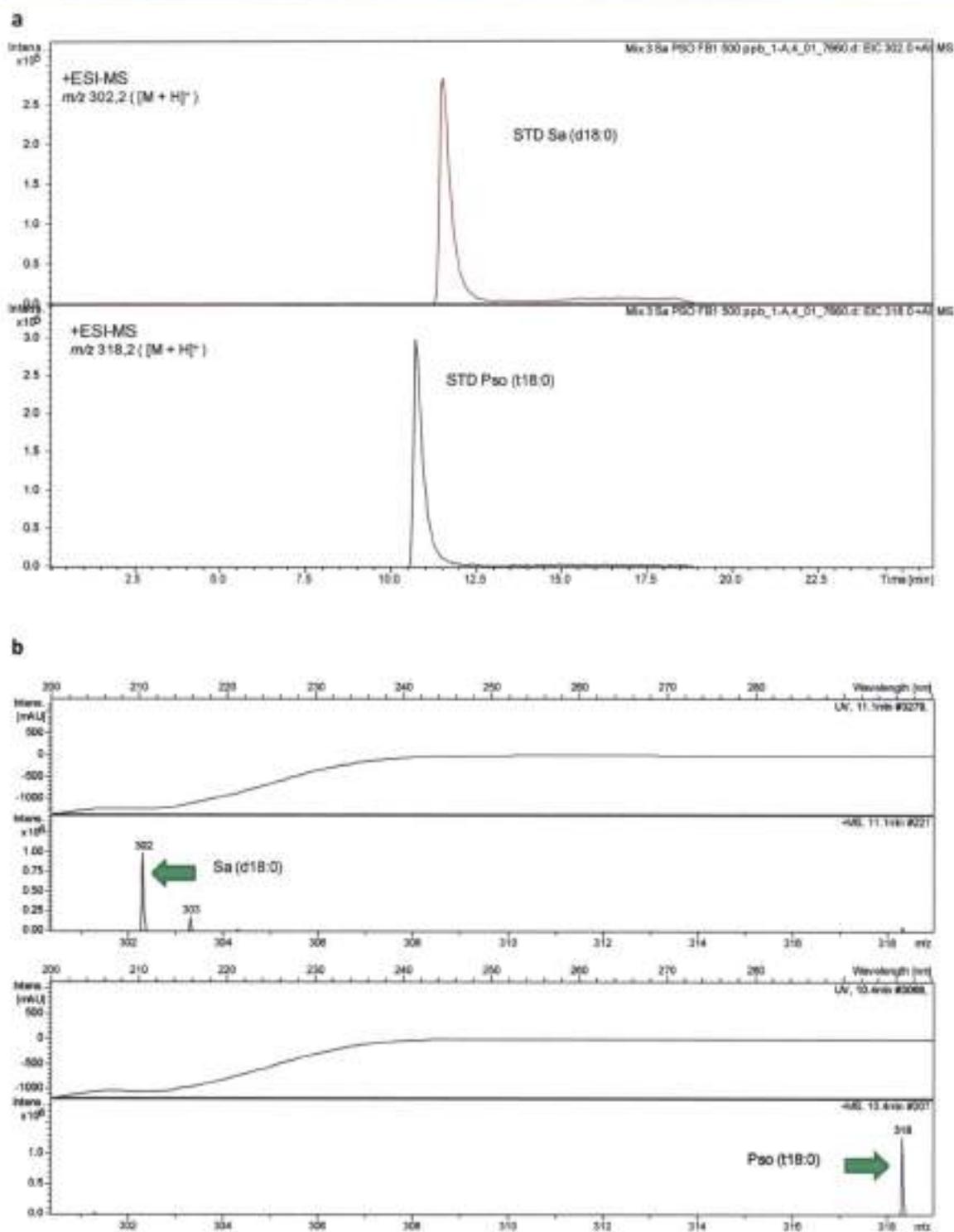
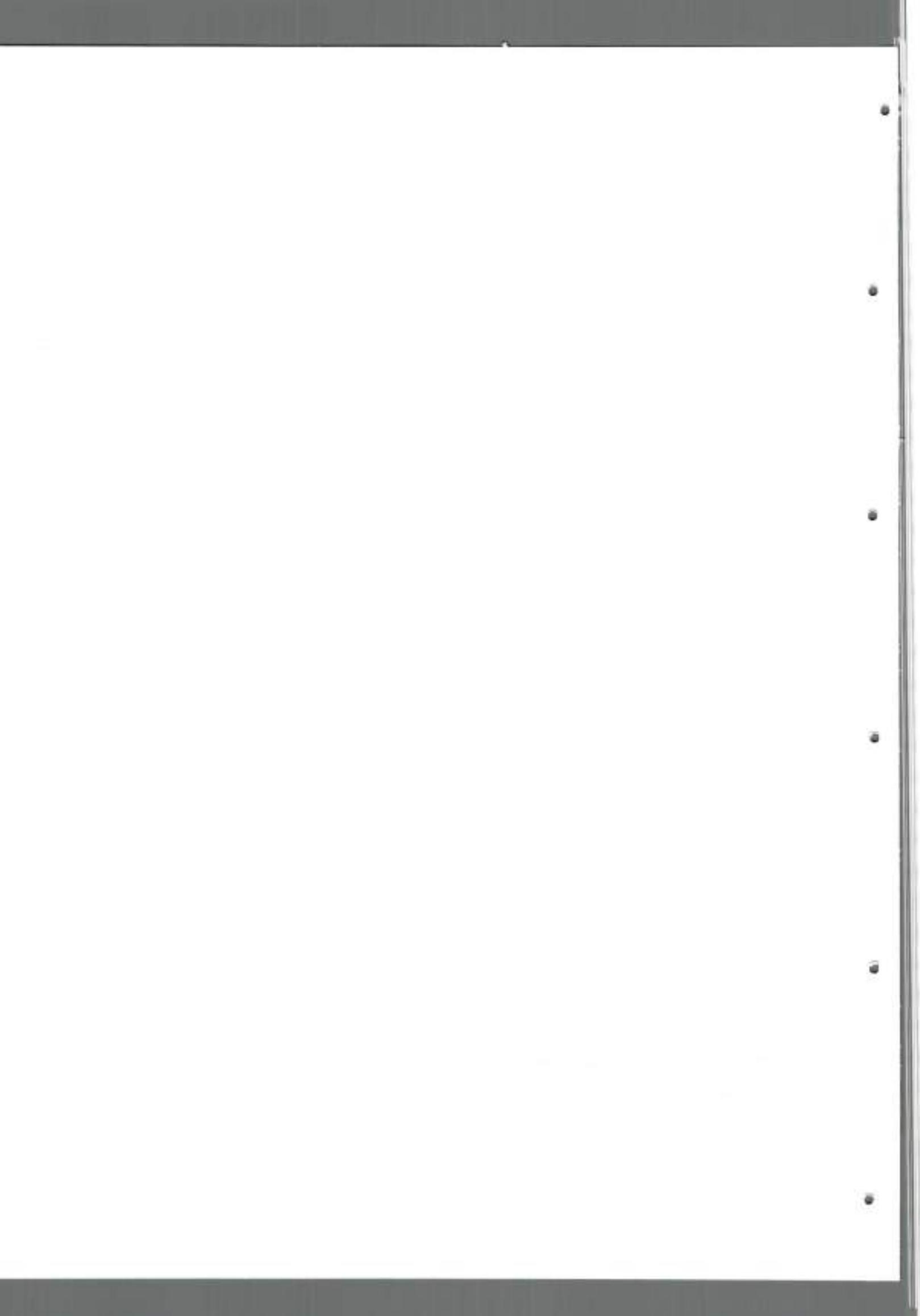


Figura 18. Caracterización cromatográfica de Sa y Pso en el sistema HPLC-ESI-QTOF.

(a) Cromatograma correspondiente al ión extraído (EIC) de estándares de Sa a m/z 302,2 y Pso a m/z 318,2.
(b) Espectros de masa de las moléculas protonadas ($[M+H]^+$) de estándares Sa (d18:0) y Pso (t18:0).



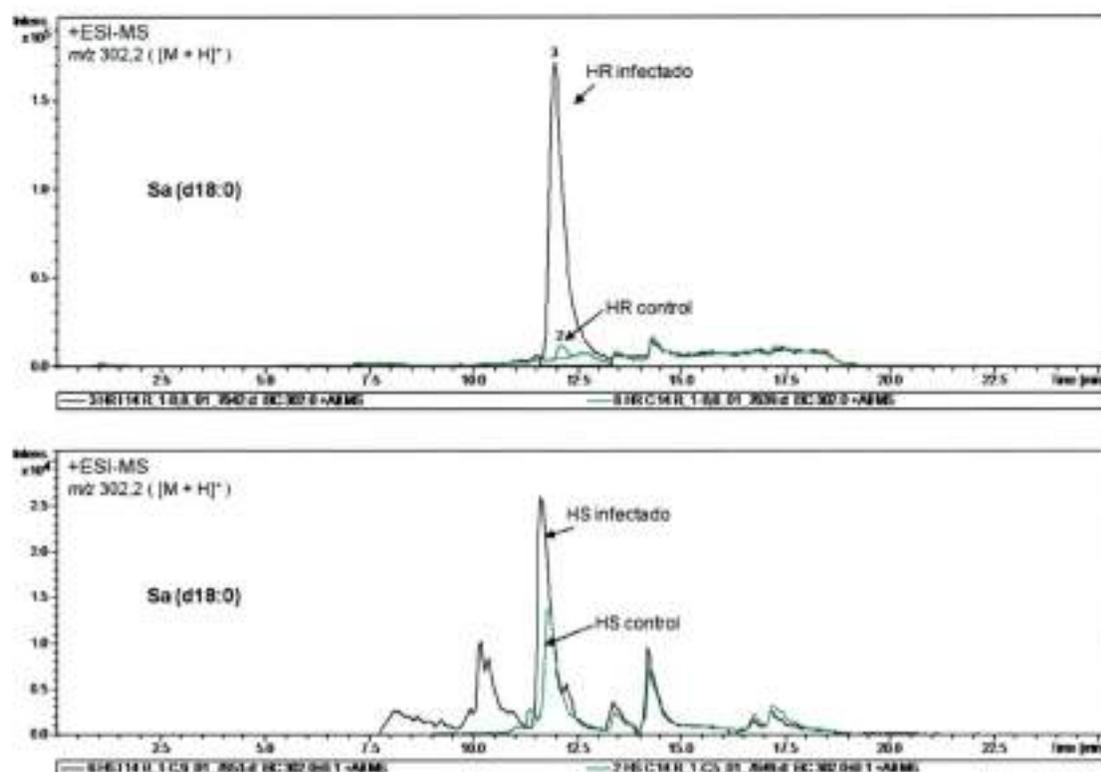


Figura 19. Efectos de la infección de HR y HS con *F. verticillioides*, sobre los niveles de Sa en raíz a los 14 dps.

Intensidad del ión extraído (EIC) a m/z 302,2 en el sistema HPLC-ESI-QTOF en extracto de raíces de plántulas infectadas y sus respectivos controles, de HR (superior) y HS (inferior).

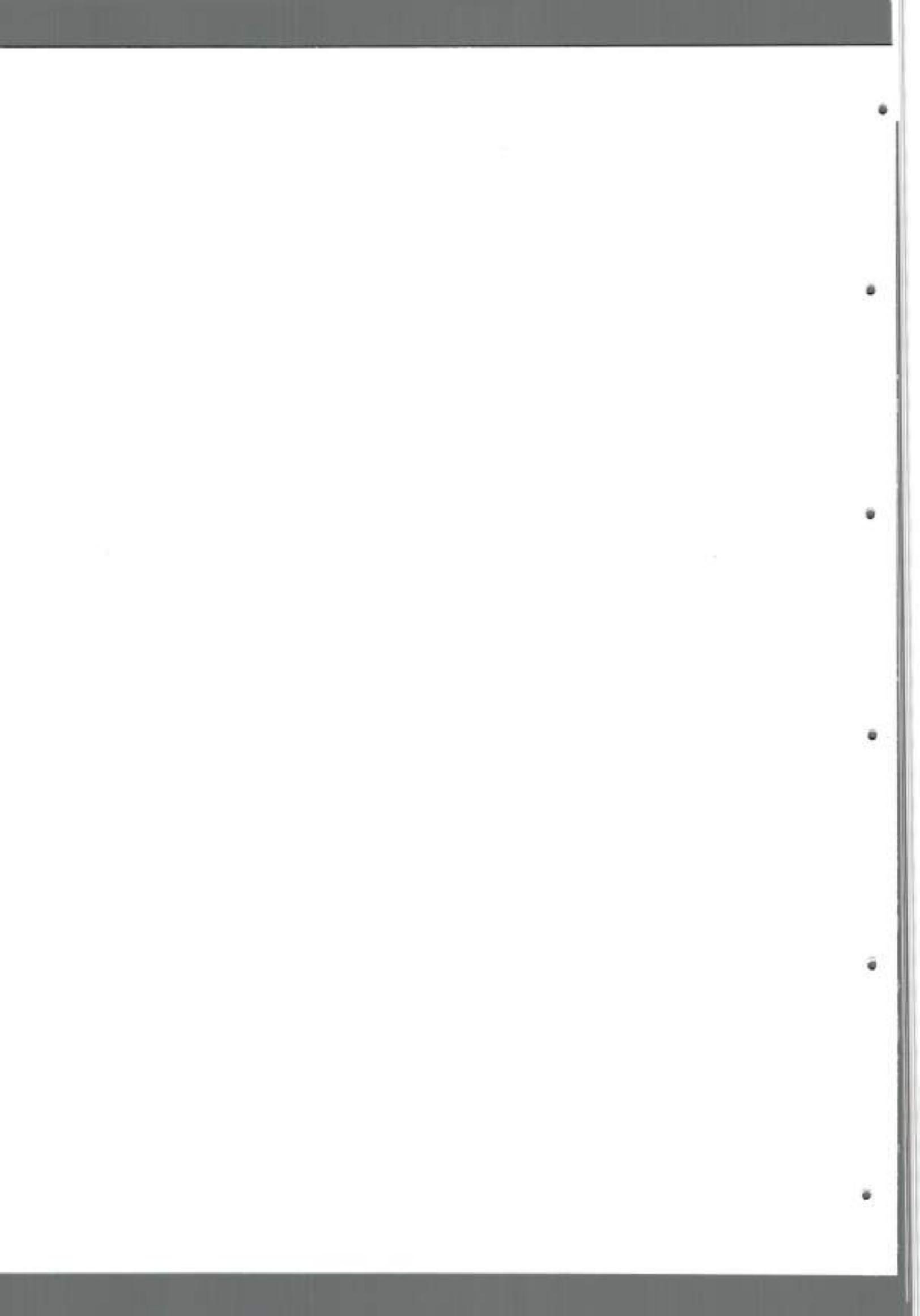
2.2. Cambios en los niveles endógenos de esfinganina en tejidos vegetales

a) Raíz

En la Figura 20, se observan los niveles de esfinganina (Sa), en tejido radical de HR e HS, en ambos modelos experimentales (infección y toxicidad).

En raíces resistentes, crecidas a partir de semillas inoculadas con *F. verticillioides* (Figura 20, barras en azul), se registraron cambios significativos en los niveles de Sa a los 14 y 21 dps con respecto a las muestras control, donde se observó un aumento marcado de esta base esfingoide a los 14 dps. Mientras que en las raíces de HS infectados también se observó un incremento significativo de Sa a los 14 y 21 dps, aunque este aumento a los 14 dps fue menor que en HR.

Por otro lado, tanto en raíces resistentes como susceptibles expuestas a la toxina (Figura 20, barras en gris oscuro), se observó una respuesta similar, registrándose un aumento significativo en los niveles de Sa a los 7, 14 y 21 dps en ambos híbridos. No obstante, la acumulación de Sa fue ligeramente mayor en HR en relación con el HS, a los 14 dps.



Dado que el mecanismo propuesto para explicar la fitotoxicidad de la FB1, es que la toxina produce inhibición de la enzima ceramida sintetasa, era esperable la acumulación de Sa, tanto en el ensayo de infección como de toxicidad. Como se observó en la Figura 15, incrementos significativos de la toxina en raíz se relacionaron con aumentos significativos de Sa (Figura 20). Sin embargo, en HR, donde los niveles de FB1 fueron menores que en HS, la acumulación de Sa fue mayor.

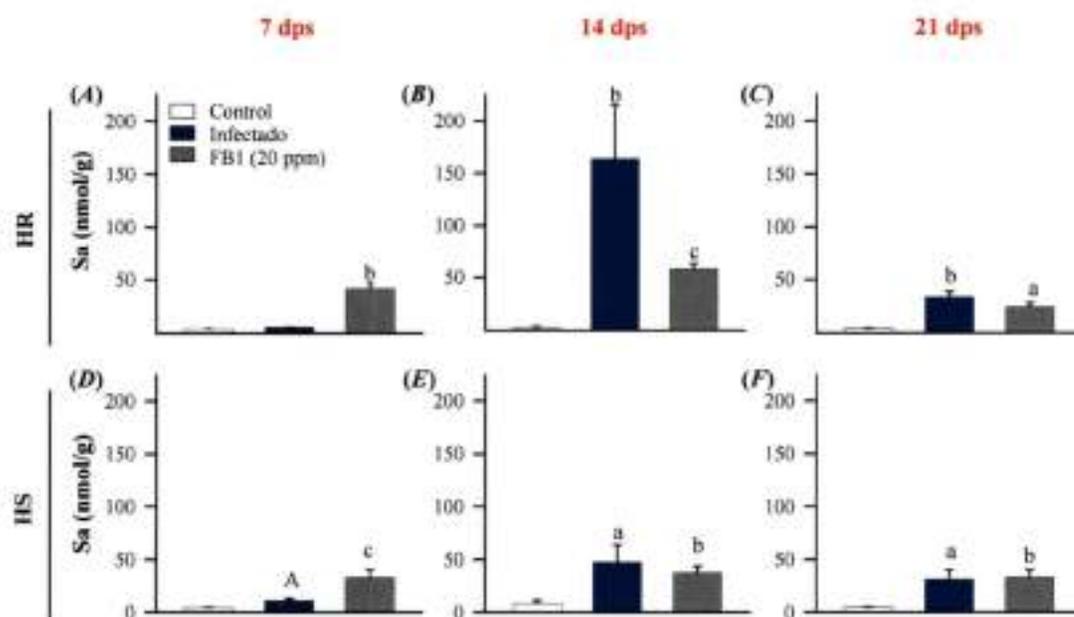


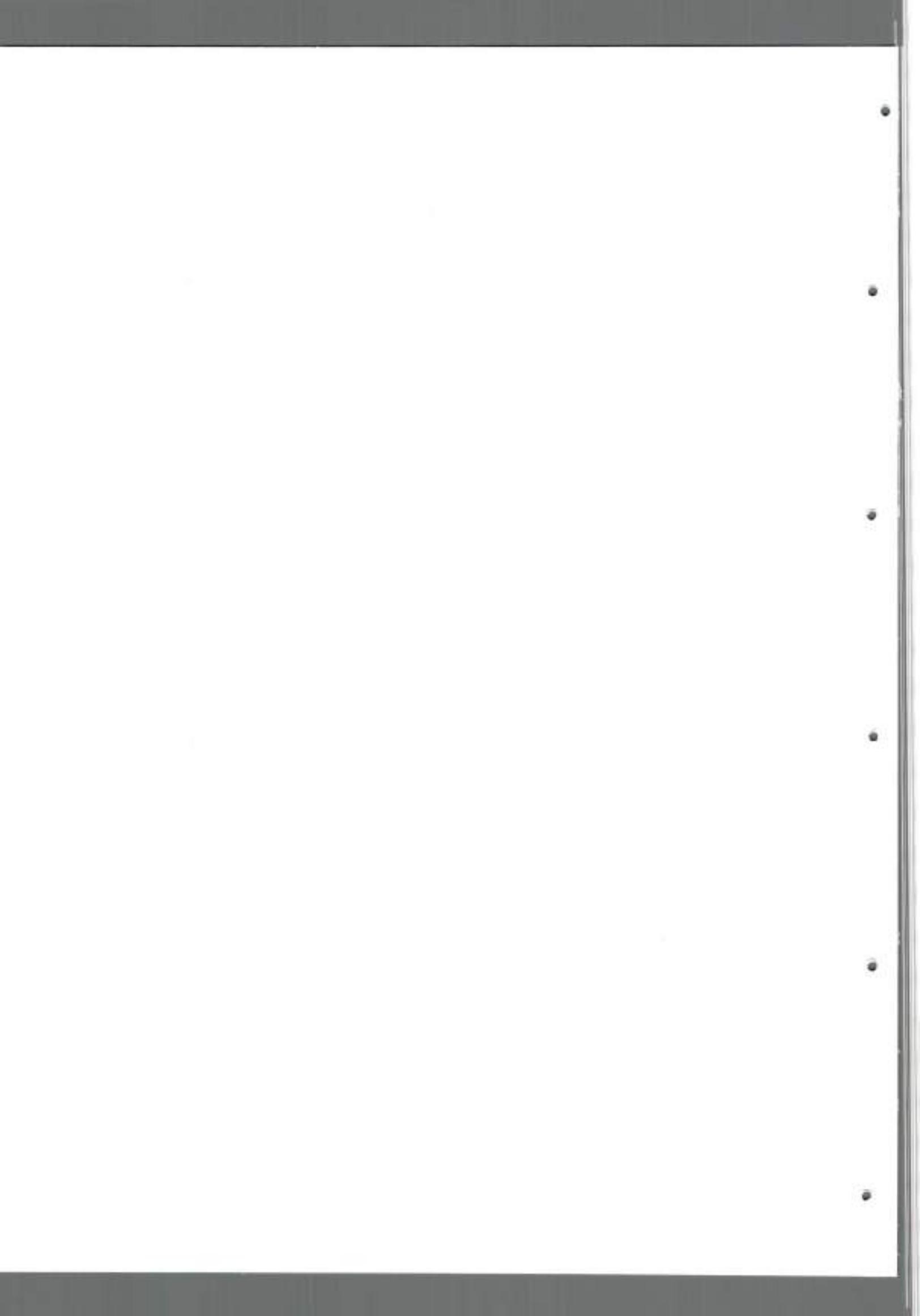
Figura 20. Bioacumulación de Sa en raíces de HR y HS de maíz infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FB1.

Los datos están representados como la media \pm SE de Sa en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FB1 (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dpi. ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control. Mayúsculas: Comparación de HR infectado o regado con FB1 con respecto al HS con el mismo tratamiento.

b) Parte aérea

De manera similar a lo realizado en raíz, se evaluó la bioacumulación de Sa en parte aérea de plántulas resistentes y susceptibles de maíz y se procedió a cuantificar la concentración de la base esfingoide en extractos de estos tejidos obtenidos a los 7, 14 y 21 dpi (Figura 21).

En la porción aérea de HR infectados, no se identificaron cambios significativos en Sa con respecto al control en ninguno de los días evaluados. Mientras que en HS infectados los niveles de Sa a los 14 y 21 dpi fueron significativamente mayores en relación a los controles. Estos resultados se condicen con los niveles de FB1 evaluados en la parte aérea de las plántulas (Figura 16), dado que en el HR sólo se



registraron bajas concentraciones de la toxina (cercasas al límite de cuantificación) a los 14 y 21 dps. Mientras que en el HS, incrementos en los niveles de FBI se relacionan con los aumentos de Sa.

Por otro lado, en ambos híbridos, se observaron un incremento en los niveles de Sa en la porción aérea de plántulas desarrolladas a partir de semillas regadas con la toxina (20 ppm), y a los tres tiempos evaluados, con la excepción del HS a los 7 dps. Los aumentos registrados fueron mayores en HR que en HS, a los 7 y 14 dps. En este caso, al igual que lo observado en raíz, en la parte aérea del HR, los niveles de FBI fueron menores a los registrados en HS (Figura 16), sin embargo la acumulación de Sa fue mayor (Figura 21).

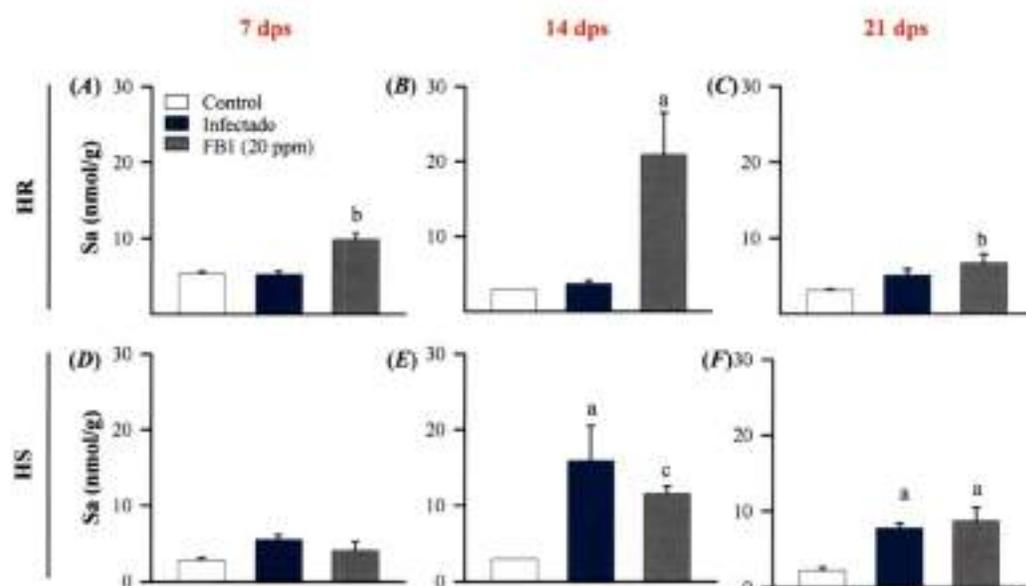


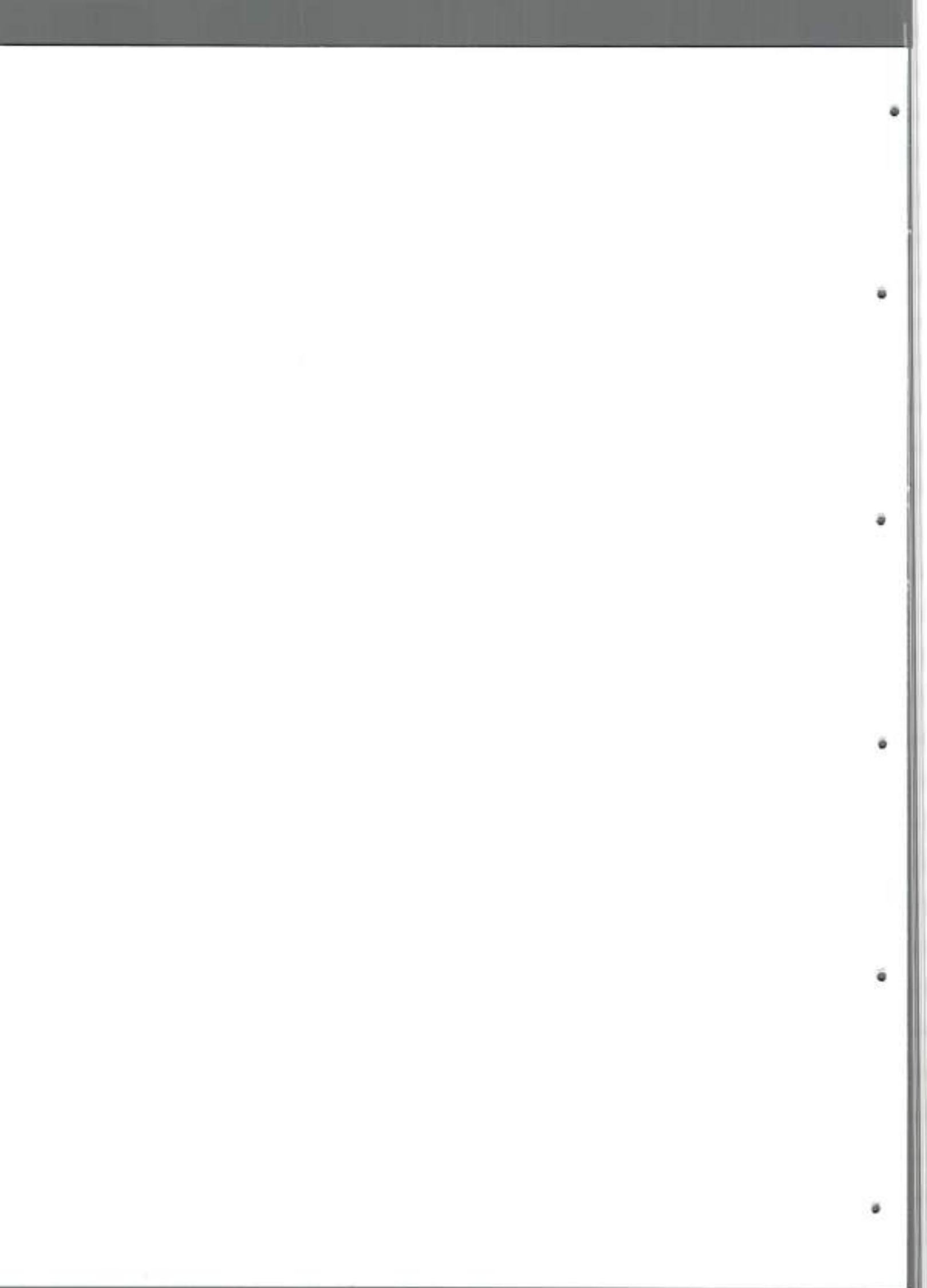
Figura 21. Bioacumulación de Sa en la parte aérea de HR y HS de maíz infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FBI.

Los datos están representados como la media \pm SE de Sa en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FBI (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dps. * $p < 0.05$; $^b p < 0.01$; $^c p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control.

2.3. Cambios en los niveles endógenos de fitoesfingosina en tejidos vegetales

a) Raíz

Las raíces de las plántulas susceptibles y resistentes cosechadas a los 7, 14 y 21 dps fueron analizadas para determinar cambios en los niveles de fitoesfingosina (Pso), como se puede observar en la Figura 22.



En muestras provenientes de plántulas resistentes infectadas (Figura 22, barras en azul), los niveles registrados de Pso, con respecto a las muestras control, fueron significativamente mayores a los 14 y 21 dps (2,1 y 2,3 veces con respecto a las muestras control, respectivamente). En raíces provenientes de plántulas susceptibles infectadas, también se observaron aumentos significativos en los niveles de Pso, y estos se registraron a los 7 y 14 dps (4,8 y 2,9 veces con respecto al control, respectivamente). Estos incrementos en Pso se correlacionan con los aumentos en los niveles de FB1 registrados en raíz para cada híbrido (Figura 15), por lo que este resultado era esperable. Sin embargo, resultó llamativo que en el HS este cambio fuera más marcado que en el HR a los 7 y 14 dps.

Por otra parte, también se detectaron modificaciones en las concentraciones de Pso en raíces de plántulas de ambos híbridos, desarrolladas a partir de semillas regadas con la toxina (20 ppm), y a los tres tiempos evaluados (7, 14 y 21 dps). En HR el incremento fue de 5,1; 1,6 y 1,9 veces con respecto a los controles, mientras que en HS el aumento fue de 11,8; 2,8 y 2,6 veces en también respecto a los controles. Estos resultados indican que la FB1 por sí sola indujo cambios en la concentración de Pso en ambos híbridos, registrándose mayor aumento en HS que en HR.

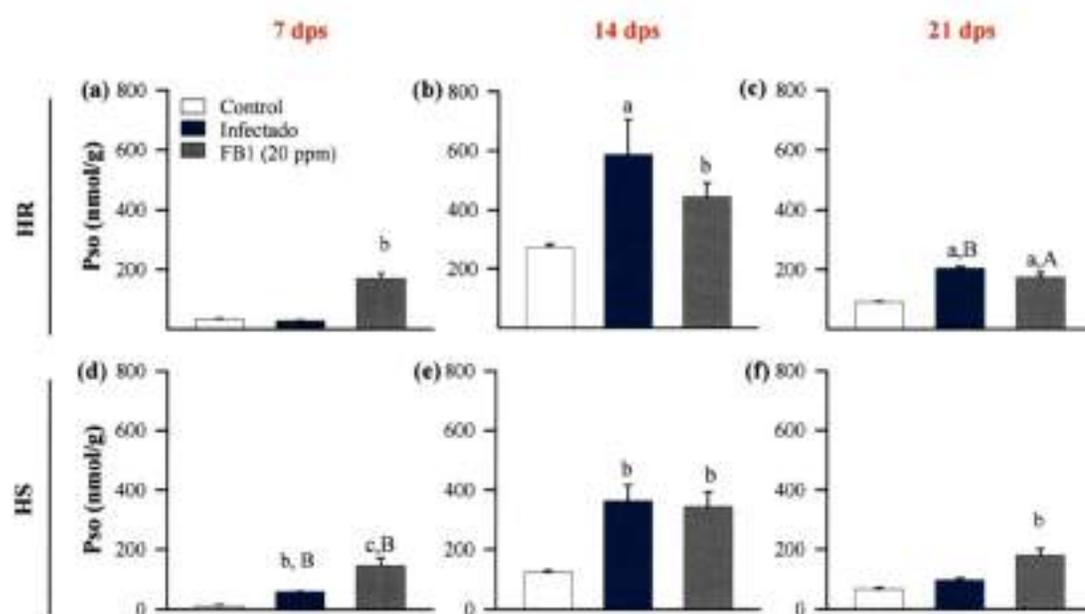
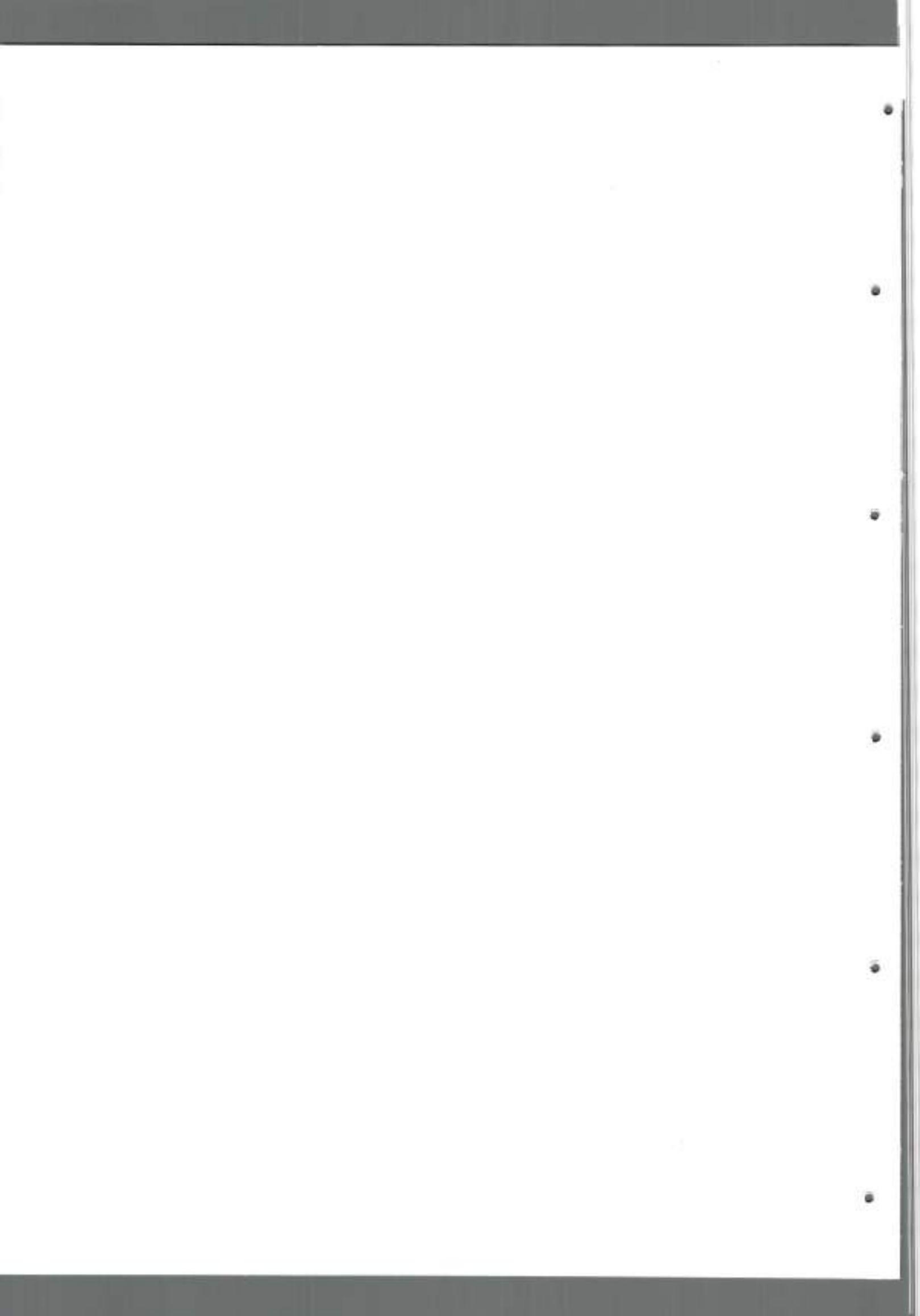


Figura 22. Bioacumulación de Pso en raíces de HR y HS de maíz infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FB1.

Los datos están representados como la media \pm SE de Pso en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FB1 (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dps. ^{a,b} $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control. Mayúsculas: Comparación de HR infectado o regado con FB1 con respecto al HS con el mismo tratamiento.



b) Porción aérea

Con respecto a los niveles de Pso en parte aérea, de plántulas resistentes y susceptibles infectadas (Figura 23), se registraron aumentos significativos en los niveles de esta base esfingoide a los 14 y 21 dps, siendo mayor el incremento con respecto a su respectiva muestra control en HS que en HR. Estos resultados se correlacionan con los niveles de FB1 evaluados en la parte aérea de los híbridos infectados (Figura 16).

Por otro lado, el riego de ambos híbridos con 20 ppm de FB1 aumentó los niveles de Pso en los tres días de cosecha en el HR (2,5; 3 y 4 veces con respecto a los controles, a los 7, 14 y 21 dps). En el HS, la concentración media de Pso fue 10 veces mayor, tanto a los 14 como a los 21 dps, en relación a los controles. En este modelo también se encuentra una correlación directa entre los niveles de toxina evaluados (Figura 16) y los niveles de Pso registrados.

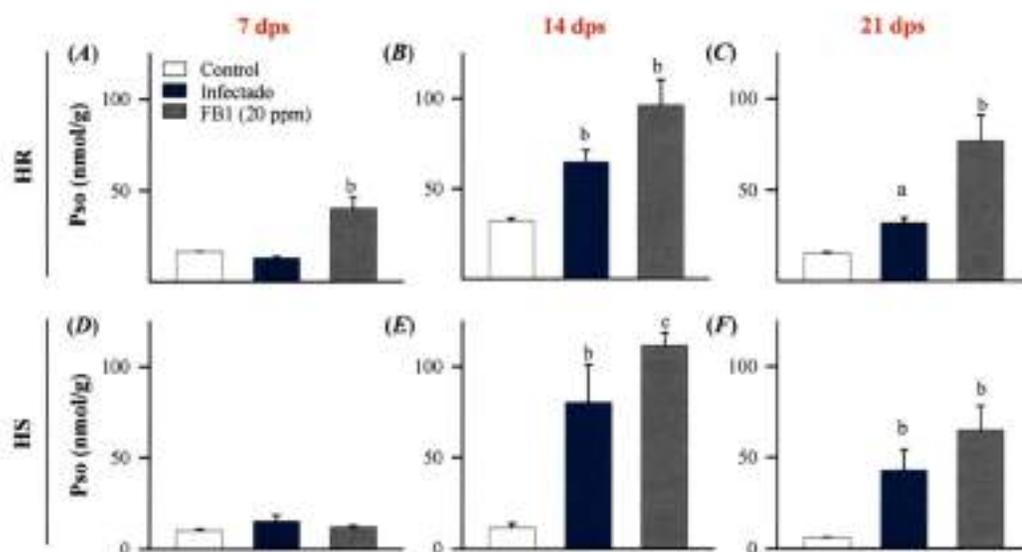
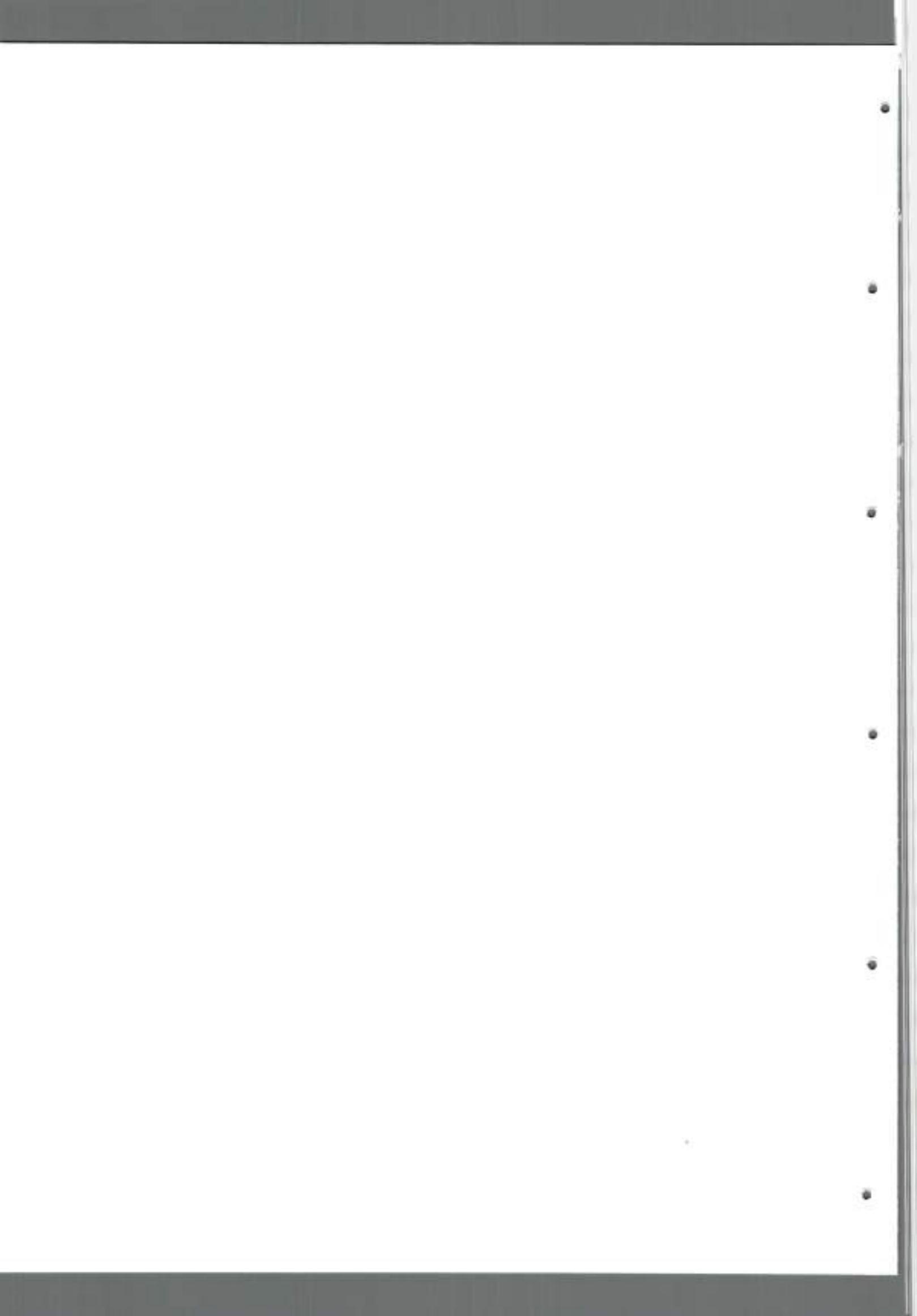


Figura 23. Bioacumulación de fitoesfingosina (Pso) en la porción aérea de HR y HS de maíz infectados con *F. verticillioides*, y regados con 20 ppm de FB1.

Los datos están representados como la media \pm SE de Pso en plántulas infectadas (barra azul, central) o tratadas con 20 ppm de FB1 (barra gris oscura, derecha) con respecto a las plántulas control (barra blanca, izquierda), a los 7 (A, D), 14 (B, E) y 21 (C, F) dps. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Minúsculas: Comparación de plántulas tratadas con respecto a la muestra control.



2.4. Bioacumulación de bases esfingoides durante la respuesta de defensa del maíz al patógeno *F. verticillioides* y a FB1 (RESÚMEN)

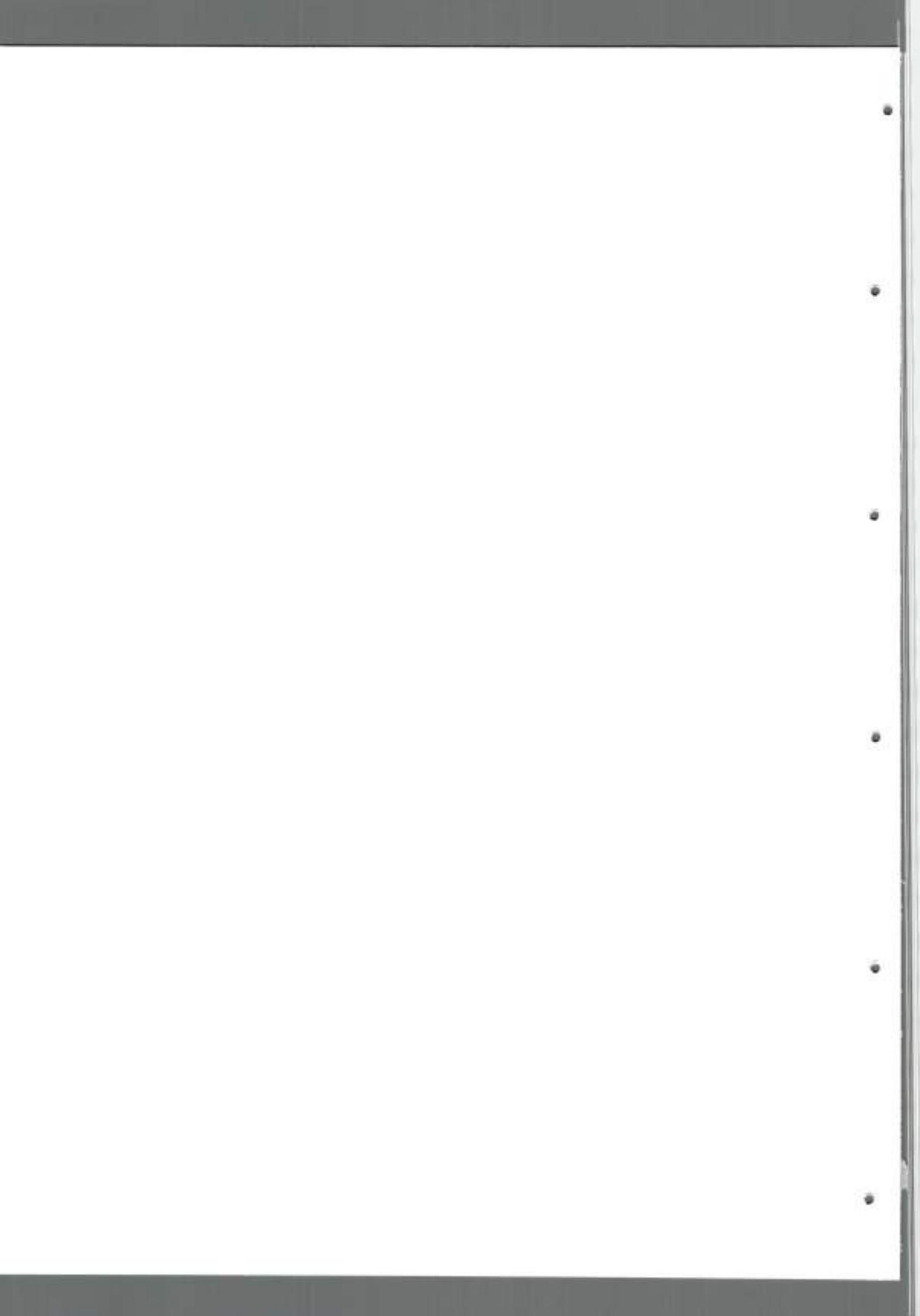
Las Figuras 24 (raíz) y 25 (parte aérea), se muestran en forma comparativa los niveles de FB1 (círculos rojos) y su correlación con los niveles de bases esfingoides (Sa, barras en gris oscuro; y Pso, barras en gris claro), en ambos modelos experimentales (infección y fitotoxicidad).

En la Figura 24, en el modelo de infección, en el HR, el marcado aumento en los niveles de FB1 registrado a los 14 dps, se correlacionó con un marcado incremento en Sa y un ligero aumento en Pso, en tejidos infectados en relación a las muestras control. A los 21 dps, si bien la concentración de FB1 no sufre grandes modificaciones, Sa y Pso se encuentran aumentadas con respecto a sus respectivas muestras control, pero el incremento observado en Sa fue en menor proporción que el registrado a los 14 dps. En HS, a los 7 dps, los niveles de FB1 son suficientes para provocar aumentos de las bases esfingoides, en especial de Pso. A los 14 dps, el notable aumento de FB1 indujo incrementos en los niveles de Sa y Pso. Con respecto a esto último, aunque las concentraciones de FB1 en HS son mayores que en el HR, no se observó un incremento tan marcado en Sa como el observado en HR.

En raíces provenientes de plántulas regadas con 20 ppm de FB1 (modelo de fitotoxicidad), niveles de la toxina registrados se correlacionan con la acumulación de Sa y Pso, en ambos híbridos y a los tres días evaluados. Siendo Sa, la base esfingoidea que más aumentó en HR a los 14 dps. Mientras que, en el HS, es la Pso, la base que más se incrementó, a los 7 dps.

Por otro lado, pudimos observar en la Figura 25, en el HR infectado, los niveles de FB1 detectados a los 14 y 21 dps, se encontraron cercanos al límite de cuantificación, no registrándose cambios en Sa, aunque sí en Pso. En el HS infectado, las concentraciones de FB1 fueron mayores que las observadas en el HR, particularmente a los 14 dps y se registraron incrementos tanto en Sa (14 y 21 dps) y Pso (7, 14 y 21 dps), siendo Pso la base esfingoidea que más se incrementó, a los 14 dps.

En la porción aérea del HR tratado con FB1, la máxima concentración observada se registró a los 14 dps y Sa fue la base esfingoide que aumentó en mayor N° de veces con respecto al control. En HS tratados los mayores niveles de la toxina detectados (14 y 21 dps) se correlacionaron con marcados aumentos de Pso (14 y 21 dps) y ligeros aumentos de Sa.



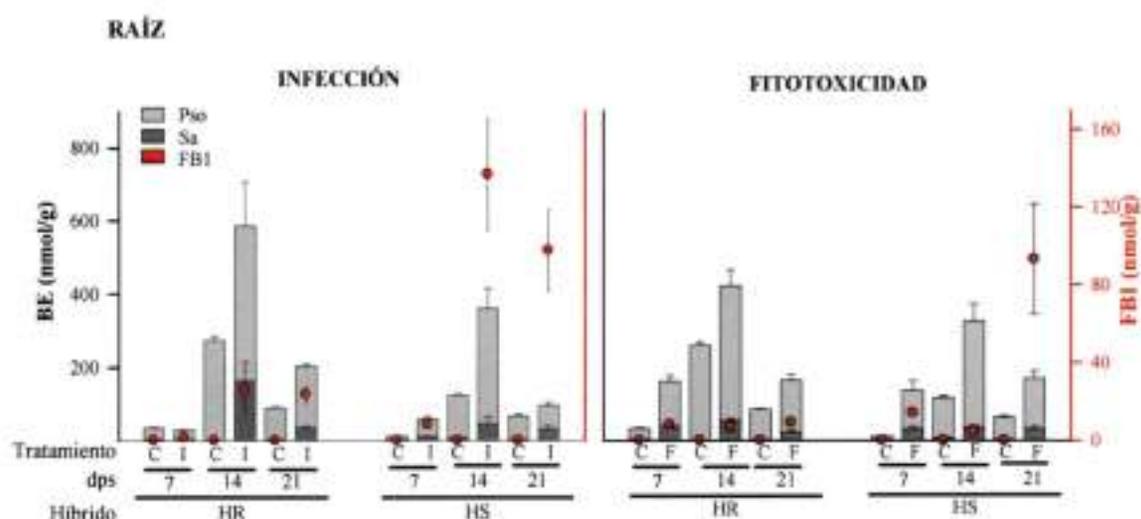


Figura 24: Relación entre la bioacumulación de FB1 y los niveles de Sa y Pso en raíces de HR e HS infectados por *F. verticillioides* y regados con 20 ppm de FB1. En los modelos experimentales de Infección (izquierda) y Fitotoxicidad (derecha), se muestran los niveles de FB1 (círculos rojos) y su correlación con los niveles de bases esfingoides (Sa, barras en gris oscuro; y Pso, barras en gris claro), en HR e HS, a los 7, 14 y 21 dps, para muestras infectadas (I), control (C) y expuestas a la toxina (Fitotoxicidad, F).

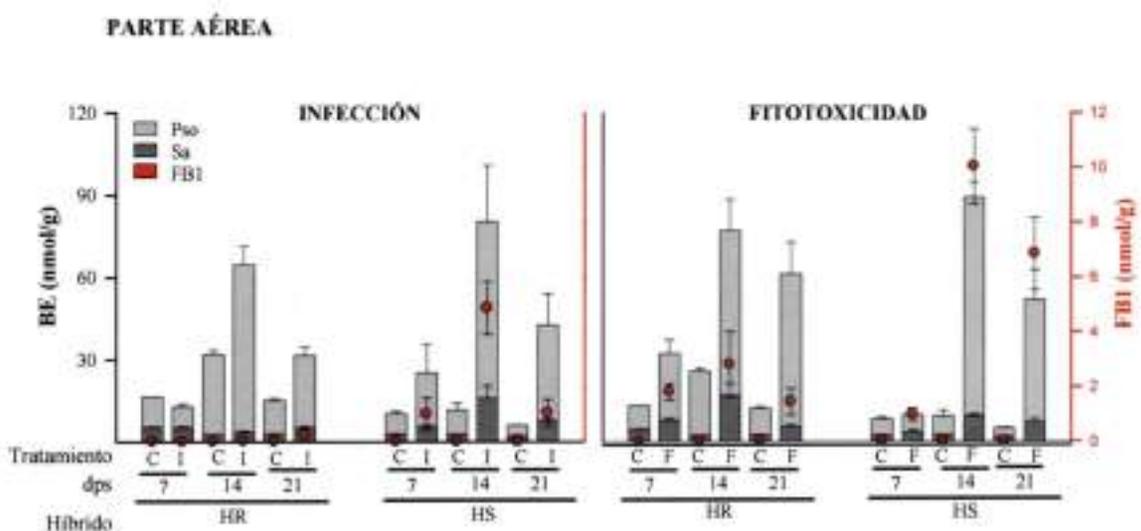
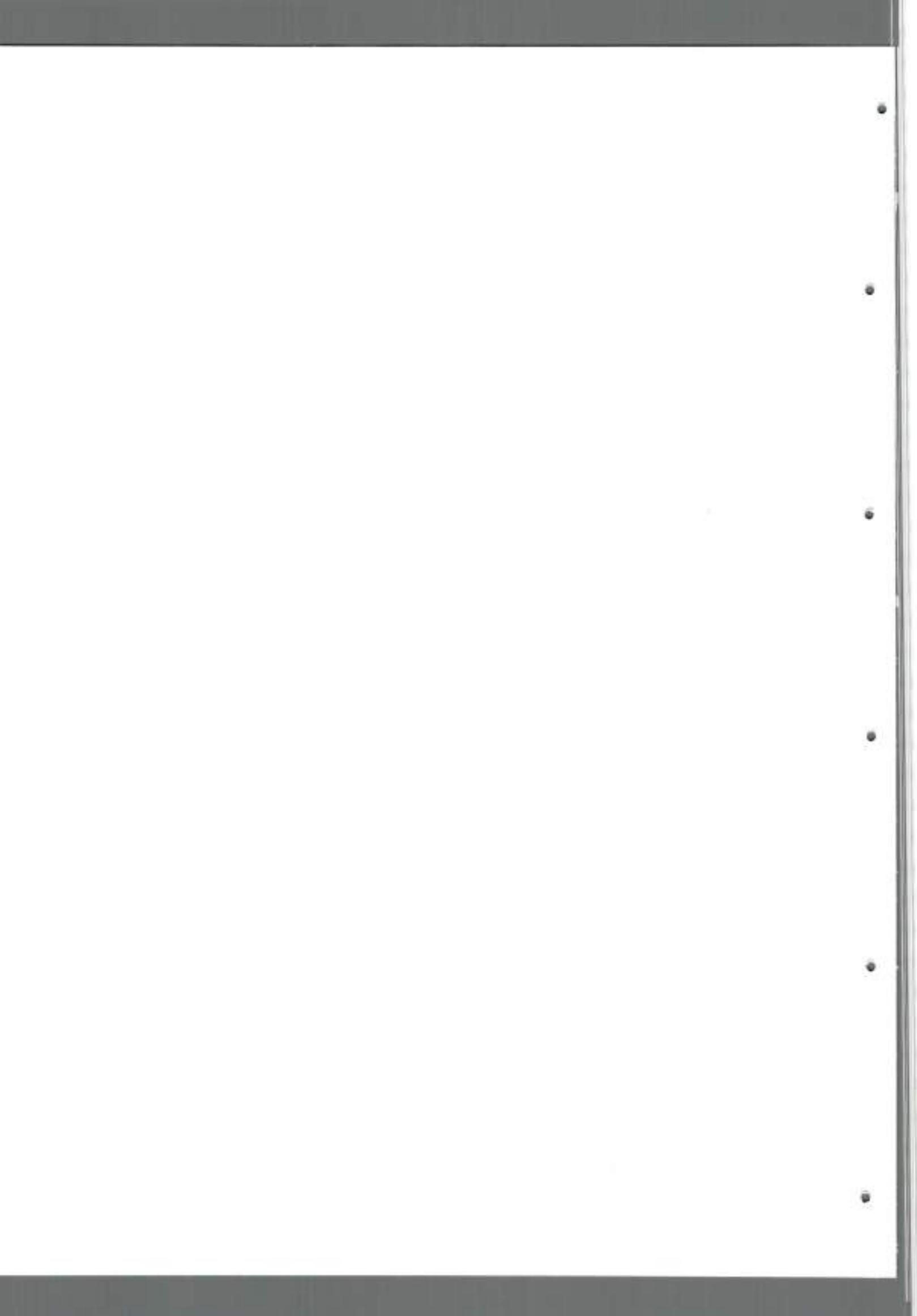


Figura 25: Relación entre la bioacumulación de FB1 y los niveles de Sa y Pso en parte aérea de HR e HS infectados por *F. verticillioides* y regados con 20 ppm de FB1. En los modelos experimentales de Infección (izquierda) y Fitotoxicidad (derecha), se muestran los niveles de FB1 (círculos rojos) y su correlación con los niveles de bases esfingoides (Sa, barras en gris oscuro; y Pso, barras en gris claro), en HR e HS, a los 7, 14 y 21 dps, para muestras infectadas (I), control (C) y expuestas a la toxina (Fitotoxicidad, F).



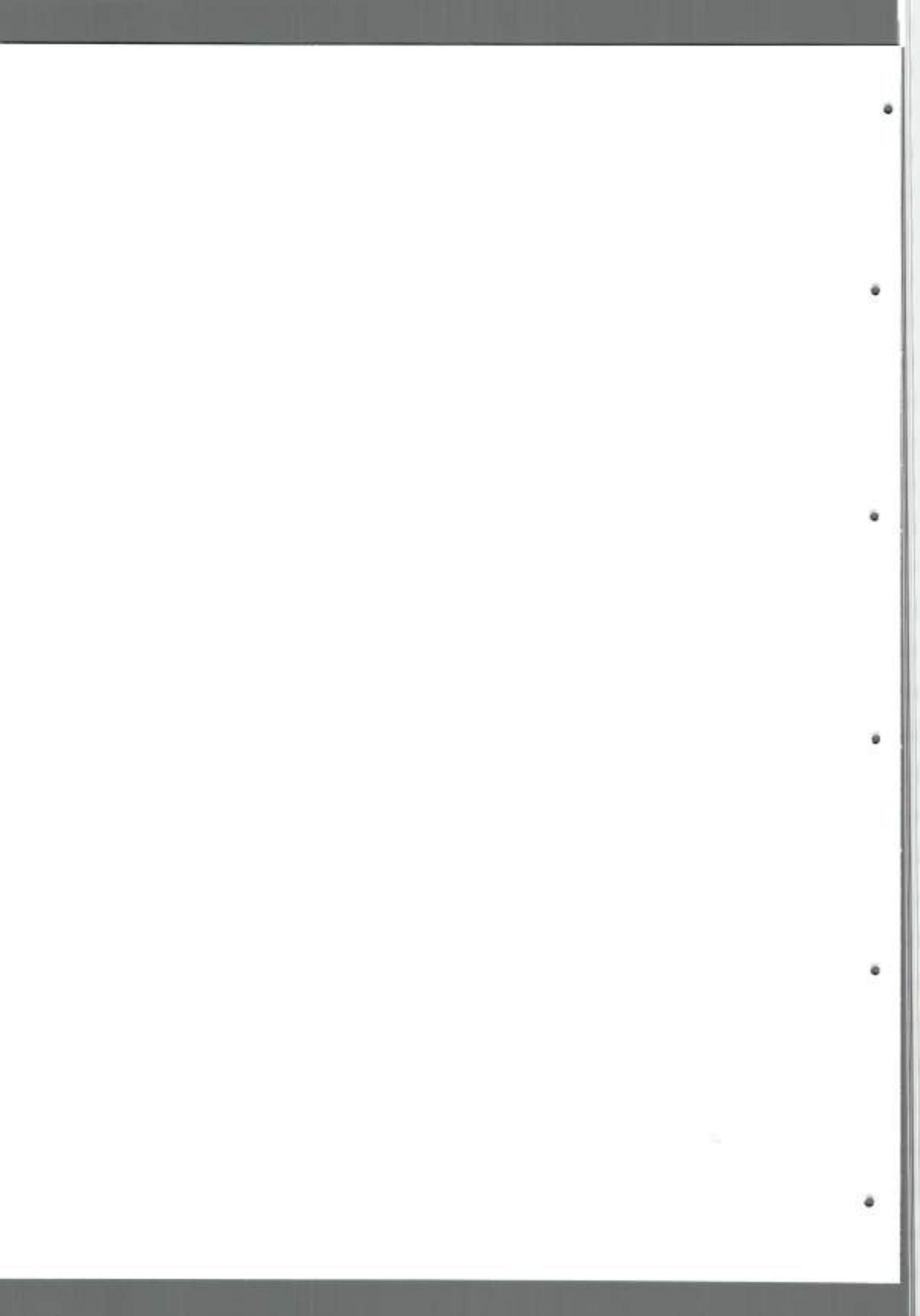
3- CONCLUSIÓN CAPÍTULO III

Fusarium verticillioides produce FB1 en plántulas de maíces resistentes y susceptibles, tanto en tejido radical como foliar. Sin embargo, la toxina se acumuló preferentemente en raíces y en menor proporción en parte aérea; siendo mayores sus niveles en el HS que en el HR, en ambos tejidos evaluados, y en los tres días de cosecha estudiados. Asimismo, FB1 se detectó en niveles cuantificables en suelo, sugiriendo que la exudación radical podría ser un mecanismo probable de detoxificación de FB1 por la planta.

Por otro lado, la FB1 fue tomada por las raíces de ambos híbridos a partir del suelo, pudiéndose distribuir hacia otras partes de la plántula, según los resultados del ensayo de fitotoxicidad. De manera similar a lo observado en HR e HS, la toxina se localiza preferencialmente en raíces que en la parte aérea, siendo la concentración de FB1 mayor en HS que en HR, en ambos tejidos evaluados, y en los tres días de cosecha estudiados.

La distribución hacia la parte aérea de las plántulas fue mayor, más rápida y se cuantificó una mayor concentración de la toxina en plántulas de ambos híbridos regadas con FB1 que en las infectadas.

La acumulación de FB1 se asoció con alteraciones del metabolismo de los esfingolípidos, en ambos modelos (infección y fitotoxicidad). Sin embargo, en las raíces del HR se observó un incremento marcado de Sa sobre Pso, mientras que en HS, el aumento en Sa es menor que en HR, siendo Pso la especie lipídica que se acumula preferencialmente en forma temprana (7dps). En la porción aérea, en HR infectados, no se registraron cambios significativos en la concentración de Sa, lo que se relaciona con los niveles de FB1 cercanos al límite de cuantificación. Sin embargo, en el ensayo de fitotoxicidad, los máximos niveles de toxina alcanzados se correlacionaron el mayor aumento de Sa observados. Mientras que en HS, los máximos niveles de FB1 (infección y toxicidad) fueron concordantes con los aumentos de Pso.



CAPÍTULO IV: MUERTE CELULAR Y PERFIL DE FITOHORMONAS

1. MUERTE CELULAR CAUSADA POR *Fusarium verticillioides*

Para evaluar si *F. verticillioides* RC2024 puede causar muerte celular en hojas de plántulas de maíz resistentes y susceptibles, y a su vez si se puede determinar alguna diferencia entre híbridos, hojas de HR e HS fueron infiltradas con azul de Evans y posteriormente analizadas mediante microscopía de campo claro. Como se muestra en la Figura 26, el HR inoculado mostró diferencias macroscópicas (Figura 26a) y microscópicas (Figura 26b) con respecto al control y al HS tratado. En una etapa posterior, el análisis cuantitativo del colorante captado por las hojas (proporcional a la muerte celular) del HR inoculado mostraron mayor magnitud de muerte celular comparadas con aquellas no infectadas (Figura 26c, $p < 0.05$). Sin embargo, no hubo diferencias en la captación de colorante por plántulas del HS infectado con respecto al control, indicando que la infección no incrementó la muerte celular en el HS.

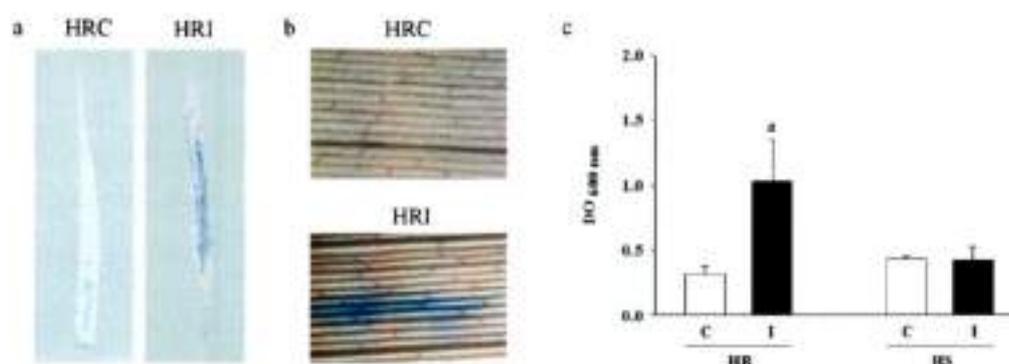
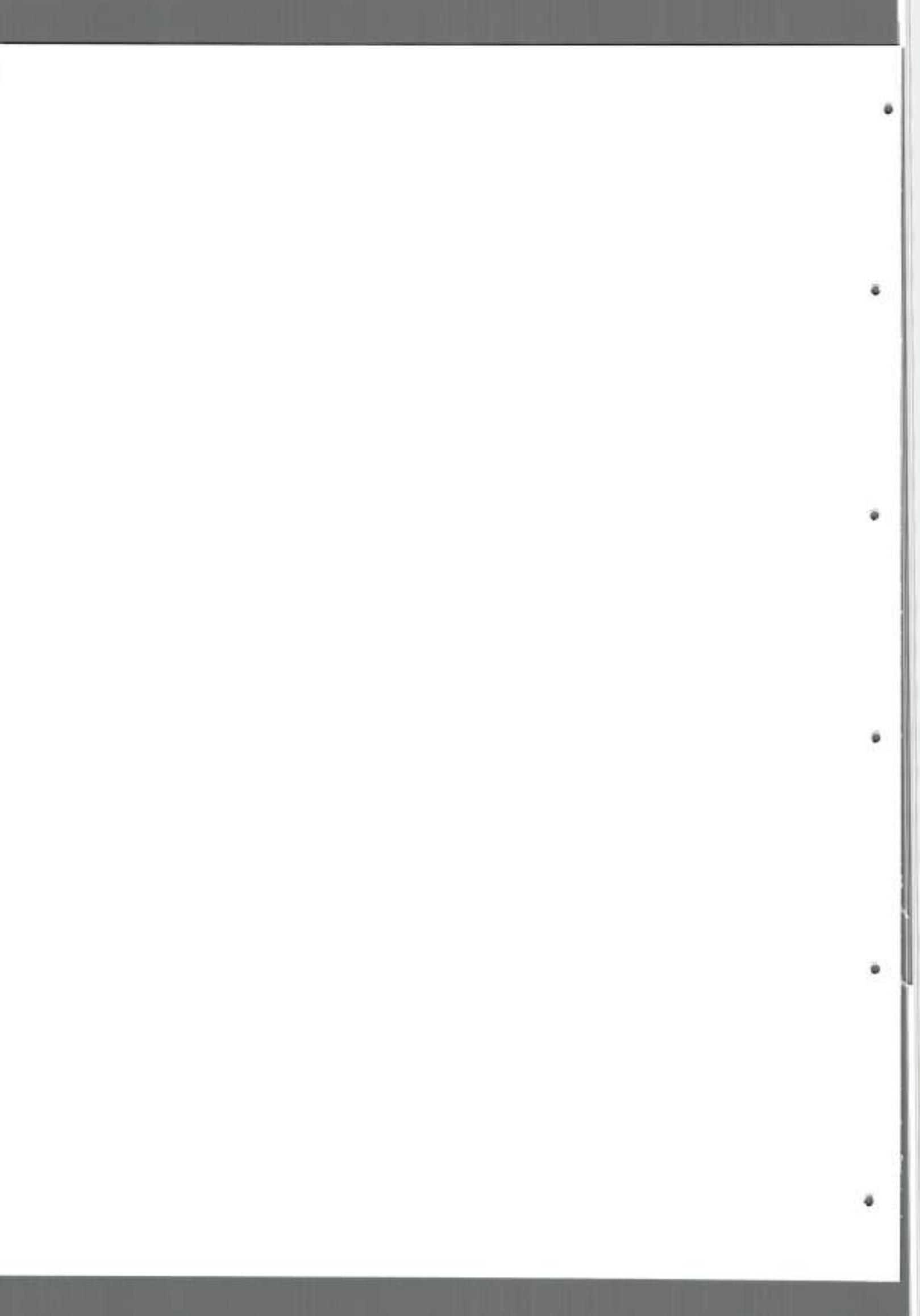


Figura 26: Identificación y cuantificación de los niveles de muerte celular en hojas de HR e HS infectadas con *F. verticillioides*, a los 21 dps.

(a) Fenotipo de hojas de plántula resistente de maíz crecidas a partir de semillas inoculadas con el hongo (derecha) o no inoculada (izquierda) e infiltradas con azul de Evans (0.2%). (b) Fotografía del tejido foliar de la plántula resistente sin inocular (arriba) e inoculada (abajo), visto bajo microscopio Nikon a 5x (c) Análisis cuantitativo de los precipitados con Azul de Evans mostrados en a y b, solubilizados con SDS 1% en 50% metanol (v/v) a 50°C y medidos a una densidad óptica de 600 nm.



2. PERFIL DE FITOHORMONAS INDUCIDO POR LA INFECCIÓN CON *Fusarium verticillioides* Y POR LA EXPOSICIÓN A FB1

Para determinar si *F. verticillioides* o la FB1 pueden modificar el perfil de fitohormonas involucrados en el proceso de estrés, lo cual constituiría una estrategia efectiva para alterar la inmunidad del maíz, se cuantificaron los niveles de ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA) y ácido abscísico (ABA), en extractos de porciones aéreas, a los 7 y 21 dps.

A los 7 dps (Figura 27), en las plántulas infectadas de ambos híbridos, se produjo un incremento de SA, aunque este aumento fue estadísticamente significativo sólo en plántulas resistentes. Por otro lado, en plántulas regadas con FB1, se registró una disminución de SA en HR y un incremento de ABA que sólo fue significativo en el HS.

Por otra parte, la infección del HR causó disminución de JA y aumento de ABA a los 21 dps (Figura 28).

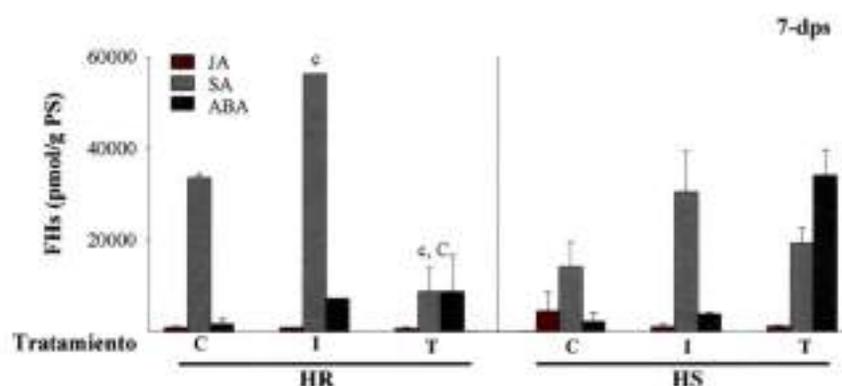
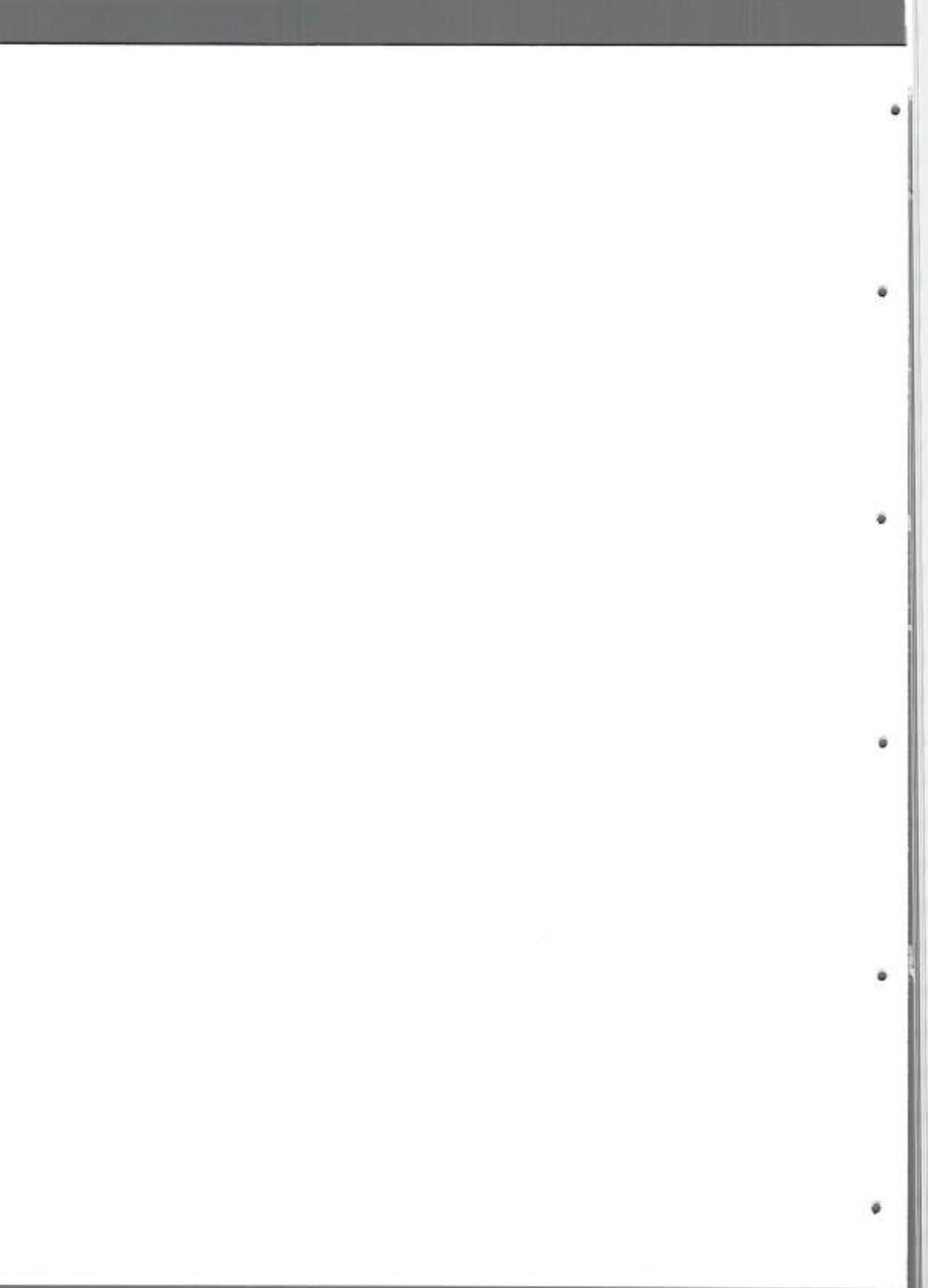


Figura 27: Efectos de la infección por *F. verticillioides* y del riego con 20 ppm de FB1, sobre los niveles de JA, SA y ABA en la parte aérea de plántulas de HR y HS, a los 7 dps.

Los datos están representados como la media \pm SE. ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; ^c $p < 0.001$; ; en plántulas infectadas (I) o tratadas con 20 ppm de FB1 (T) con respecto a las plántulas controles (C). ^A $p < 0.05$; ^B $p < 0.01$; ^C $p < 0.001$ en plántulas I o T en HR con respecto al HS con el mismo tratamiento.



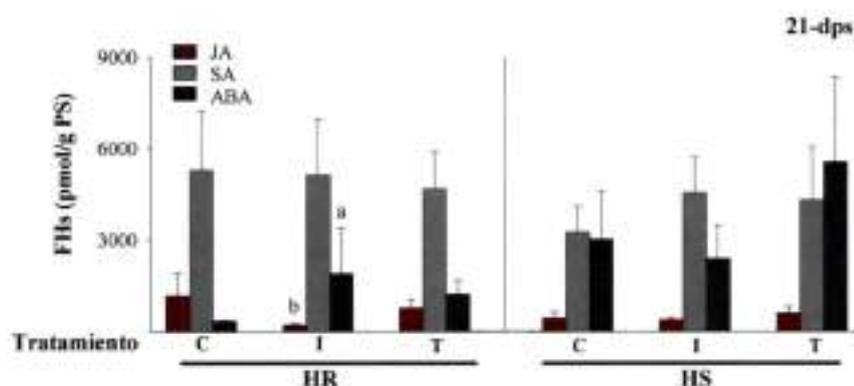


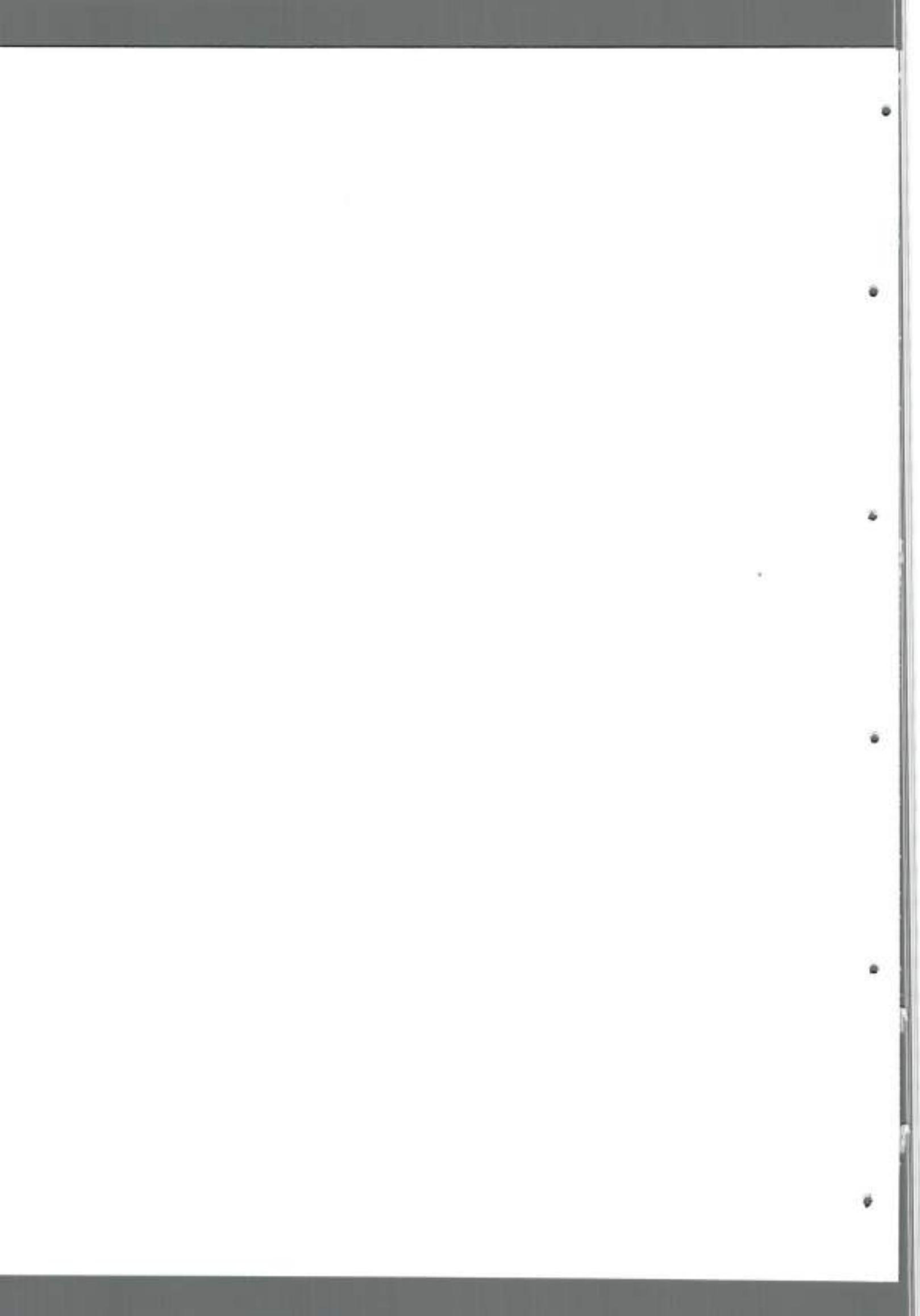
Figura 28: Efectos de la infección por *F. verticillioides* y del riego con 20 ppm de FB1, sobre los niveles de JA, SA y ABA en la parte aérea de plántulas de HR y HS, a los 21 dps.

Los datos están representados como la media \pm SE. ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$; en plántulas infectadas (I) o tratadas con 20 ppm de FB1 (T) con respecto a las plántulas controles (C).

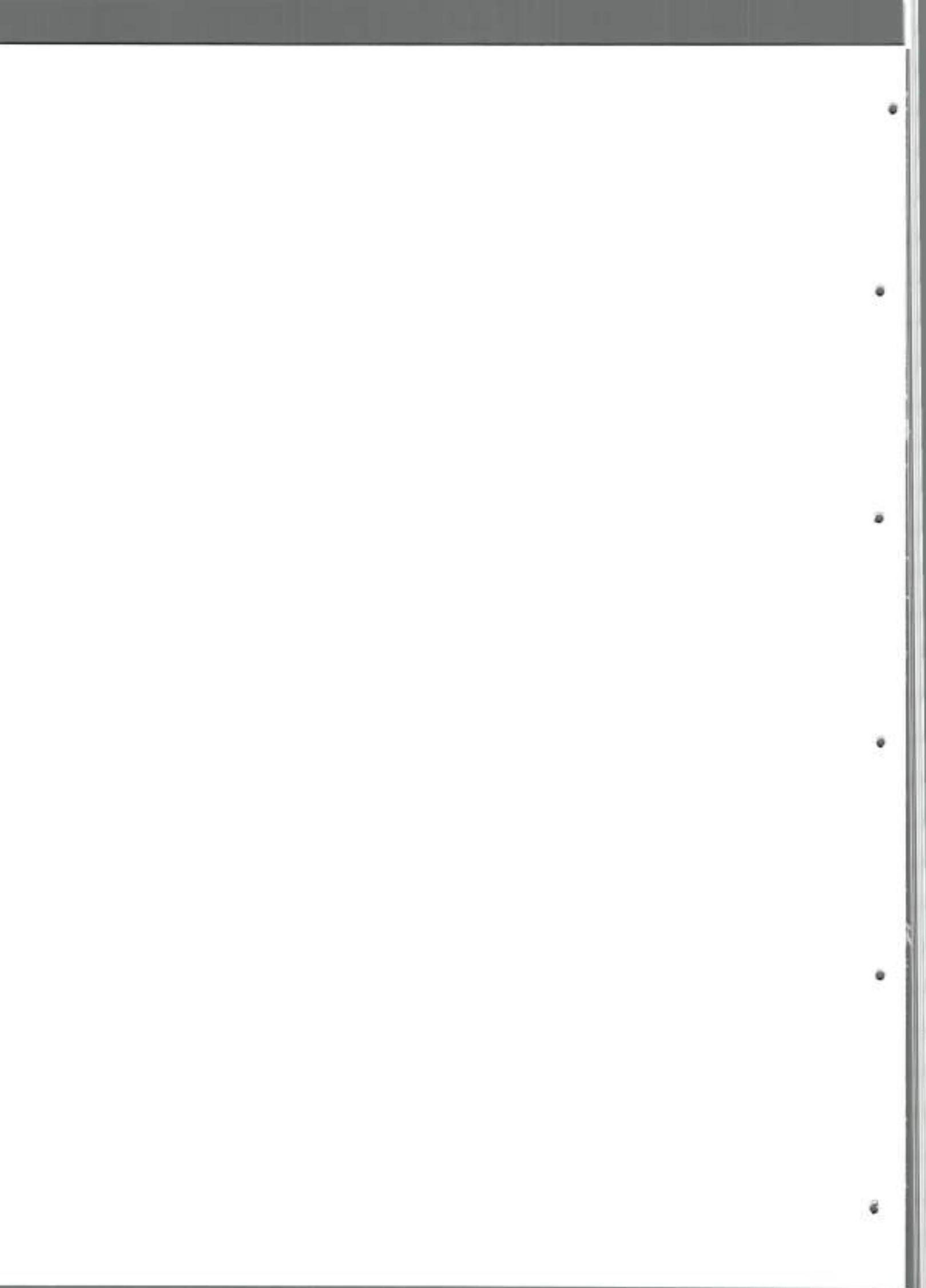
3. CONCLUSIÓN CAPÍTULO IV:

Sólo en HR infectados se observó muerte celular e incrementos significativos de ácido salicílico (SA), en forma temprana (7 dps). Sin embargo, a los 21 dps, los niveles de SA disminuyen y se registran incrementos significativos de ABA, sugiriendo que la participación de esta última podría estar modulando los niveles de SA (cross-talk negativo) o induciendo una nueva fase de respuesta.

En HS la aplicación directa de FB1 indujo cambios principalmente a nivel de las concentraciones de ABA. El incremento de los niveles de ABA o el aumento de la sensibilidad a la acción de esta fitohormona se asocia con una disminución de la resistencia vegetal, sugiriendo que *Fusarium verticillioides*, por medio de la acción de FB1, podría alterar el sistema de defensa del hospedador, incrementando su susceptibilidad.



DISCUSIÓN

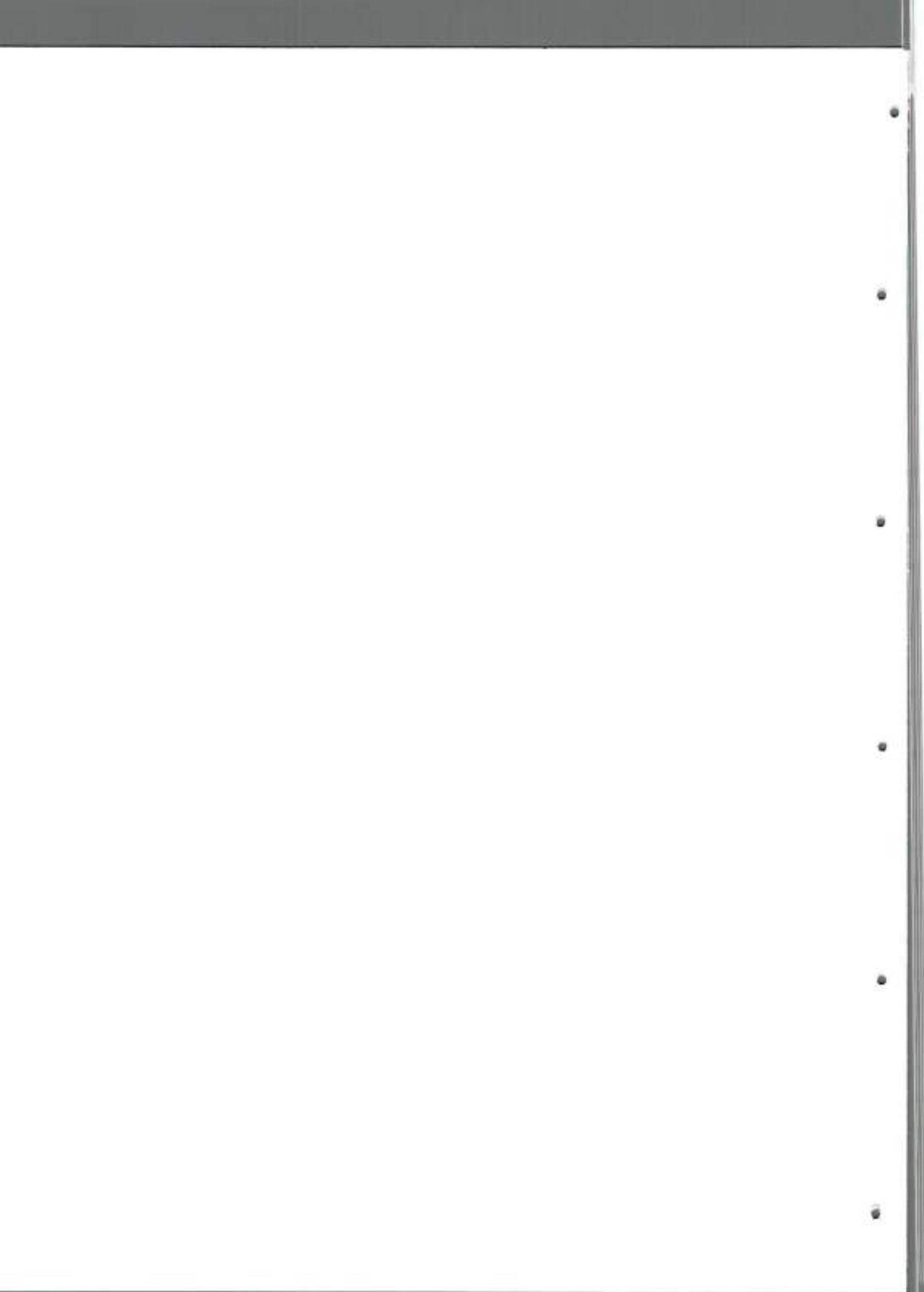


1. CRONOLOGÍA DE LA COLONIZACIÓN FÚNGICA SISTÉMICA EN HR E HS

La cepa RC2024 de *F. verticillioides* colonizó tanto a plántulas resistentes como susceptibles en forma sistémica, con una frecuencia de infección diferente entre los cultivares, ya que se registró una mayor propagación del hongo en HS con respecto al HR. Estos resultados son concordantes con publicaciones de Wu y cols. [118], quienes reportaron comportamientos diferenciales de líneas puras de maíces resistentes y susceptibles en cuanto a la extensión y patrón de colonización del *F. verticillioides* marcado con una proteína roja fluorescente (DsRed). En este estudio, se pudo comprobar que la localización fúngica preferencial en segmentos específicos de las plántulas presentó variaciones entre híbridos. En HR, *F. verticillioides*, se aisló preferentemente de mesocótilo, en cada uno de los días de muestreo, mientras que en HS además de situarse en mesocótilo, fue importante su localización en raíz y nudo coleoptilar.

Las vías de entrada del *F. verticillioides* al maíz, en estadios tempranos, pueden ser principalmente, a través de la semilla infectada o por el ingreso del patógeno que sobrevive en el rastrojo en contacto con el suelo. En este último caso, se asume que el hongo ingresa a través de las raíces laterales de la planta [119]. En este estudio, el ingreso de *F. verticillioides* a la plántula fue por medio de la semilla infectada. Dado que en maíz, a diferencia de la mayoría de las angiospermas, la raíz primaria y raíces seminales se forman de manera endógena, lo que implica que la misma tiene que penetrar y romper otros tejidos antes de hacerse visible [120], pudiendo el hongo puede tomar ventaja de ello para propagarse. Esto es importante particularmente durante las dos primeras semanas de desarrollo embrionario, ya que estos tejidos conforman la principal porción del sistema radical. Luego se desarrollan las raíces laterales y las raíces de la corona, esta última a partir del nudo coleoptilar en la porción aérea. Más tarde, estas pasarán a ser dominante y constituir el principal sistema radical del maíz, siendo el soporte principal de la plántula y responsable, en gran medida, de la captación de agua [120]. En este trabajo de tesis, los resultados sugieren que en maíz la infección sistémica se diferencia entre híbridos por la infección de tejidos específicos. A partir de la semilla infectada en HS, el hongo invadió principalmente el sistema radical tanto subterráneo como nodos de la porción aérea, asegurándose su supervivencia en los subsiguientes estadios de la plántula. Por el contrario en el HR, el crecimiento del patógeno, pudo ser restringido principalmente al mesocótilo.

La colonización masiva del hongo en mesocótilo es de singular importancia ya que no sólo se trata de una zona de elongación, sino que además este tejido transporta agua y nutrientes hacia la plántula en desarrollo, es decir, estaría actuando funcionalmente como una prolongación de la raíz en esta etapa de crecimiento, hasta que en el estadio V6, las raíces nodales pasan a ser fisiológicamente activas [121]. En este sentido, *F. verticillioides* podría comprometer la funcionalidad de los órganos vegetativos



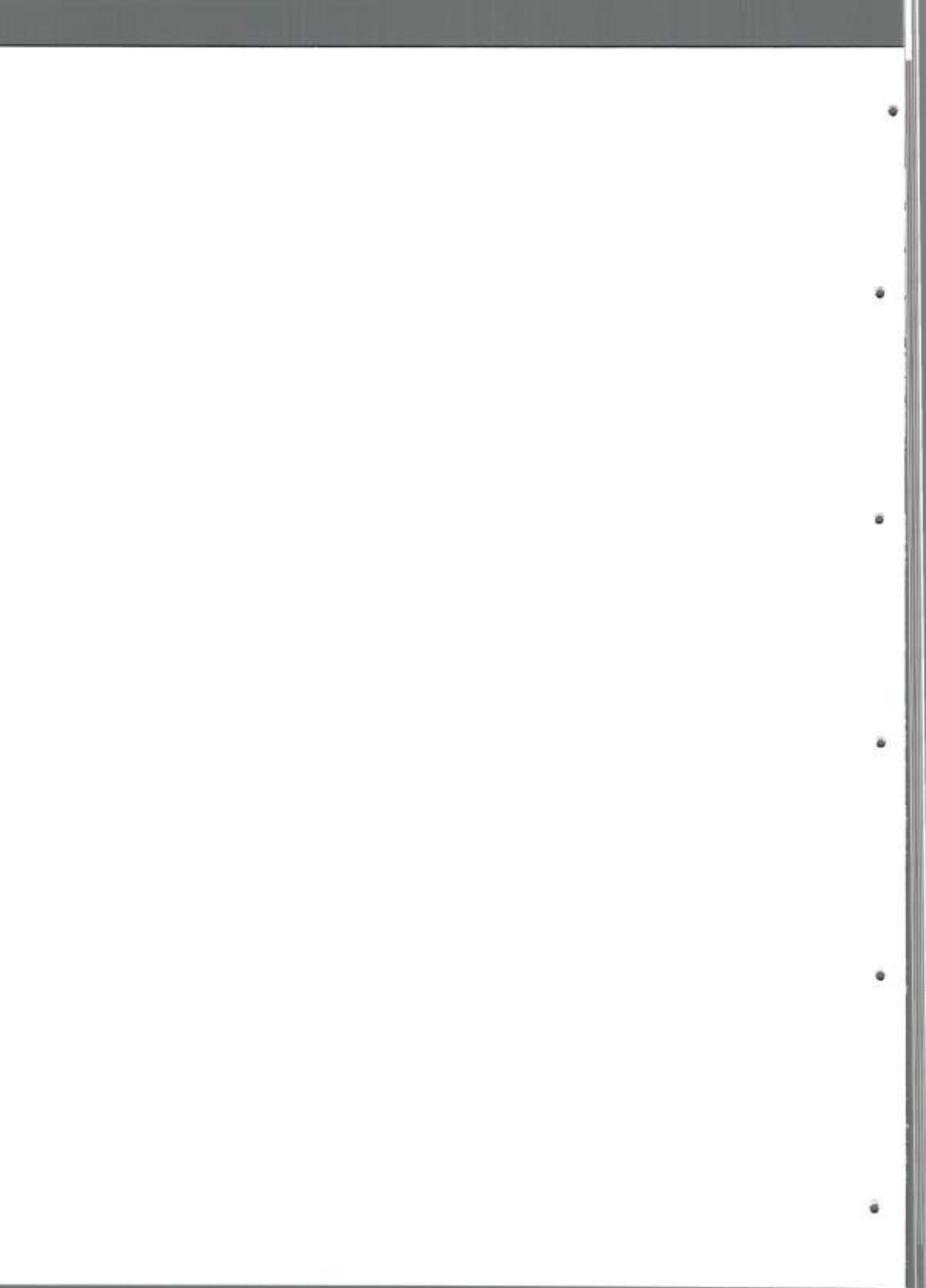
subterráneos de la plántula, incluso en estadios posteriores. Rodríguez-Brñevich y cols. [121] han demostrado que la severidad de podredumbre de mesocótilo en V4 resulta ser un buen indicador de desarrollo de la podredumbre de la corona en V6.

En el HR, el movimiento fúngico a partir de las semillas infectadas, fue más limitado que en HS. Es posible, como sugieren Wu y cols. [118], que en plántulas resistentes, mecanismos de muerte celular estén operando con el fin de circunscribir la infección. En este trabajo de tesis, el hongo fue recuperado de la parte aérea de ambos cultivares pero en baja proporción, donde no fueron evidentes síntomas de enfermedad en hojas, aunque el HS presentó marchitamiento en el tallo. Hallazgos similares fueron descritos por Oren y cols. [119], quienes afirmaron que el hongo puede distribuirse a la parte aérea de la planta en la interacción temprana, siendo relativamente poca la biomasa fúngica que pudieron recuperar, no llegando a observar podredumbre u otros síntomas de enfermedad. Sin embargo, otros autores [68; 122] correlacionaron la infección fúngica con la aparición de síntomas de enfermedad foliar (síntomas necróticos, atrofia y clorosis en hojas) en estadios tempranos de desarrollo.

Los resultados descritos en este trabajo sugieren que, *F. verticillioides* se desarrolla y distribuye de manera más lenta en el HR, dado que la planta podría responder más rápido, controlando o demorando la invasión fúngica, o bien podría deberse a que la difusión lenta del patógeno le proporciona al hospedador mayor tiempo para responder y restringir el crecimiento del hongo. Mientras que el HS, todo el proceso fue más agresivo y rápido, indicando que pueden generarse condiciones que favorezcan el cambio del hongo a una fase más virulenta, asociada por ejemplo con la secreción de toxinas y enzimas hidrolíticas, debilitando al hospedador o retardando o inhibiendo las respuestas de defensa. Esto último podría explicar, al menos parcialmente, las variaciones en la magnitud y el tiempo de aparición de los síntomas de enfermedad en diferentes híbridos, entre otras posibilidades.

2. DIFERENCIAS EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN CON *Fusarium verticillioides*

En las plantas existe un balance entre costos y beneficios, donde la combinación de caracteres vegetativos tiende hacia dos tipos básicos de estrategia: adquisición de recursos y persistencia [123]. En especies vegetales de crecimiento rápido y plantas anuales, como el maíz y otras gramíneas, se espera que las mismas maximicen los recursos ya que resulta imperativo que completen su ciclo de vida en un período corto de tiempo. Mientras que las perennes o de crecimiento lento, en general, tienden a la conservación de los recursos [124]. Las gramíneas poseen un conjunto de caracteres foliares que le permiten una alta asimilación de carbono y caracteres radicales tales como altos valores de longitud radical específica, la cual está asociada a una rápida frecuencia de elongación de las raíces, una tasa de

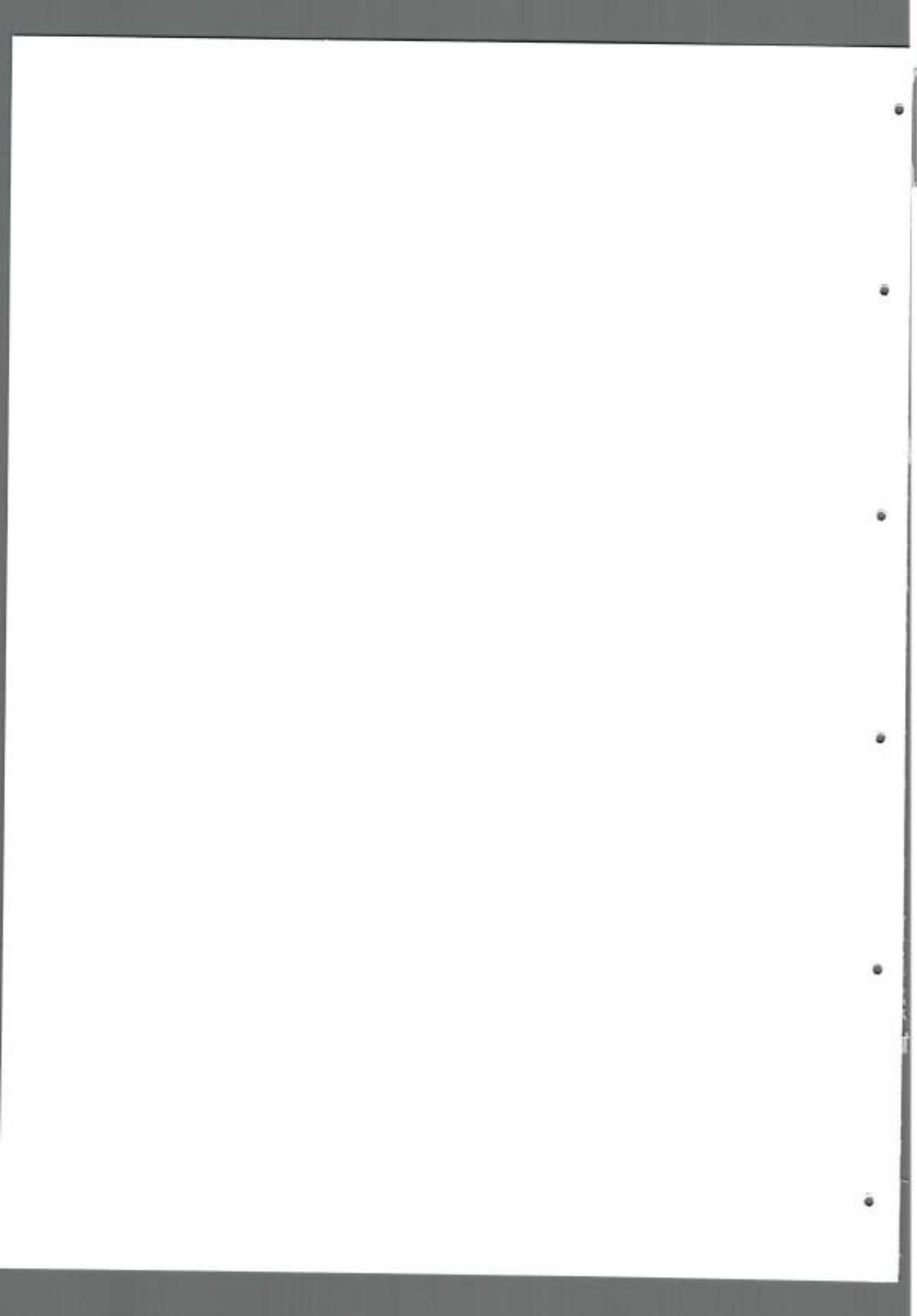


crecimiento mayor y gran capacidad de asimilación de nutrientes y agua, como así también gran actividad metabólica [125].

En este trabajo, la infección con la cepa micotoxicogénica RC2024 produjo cambios fenotípicos de los cultivares utilizados. En el HR, *F. verticillioides* promovió el crecimiento vegetativo de las plántulas incrementando la altura de las mismas y la biomasa de la porción aérea. Además, se observó un mejoramiento en el desarrollo radicular, tanto en la longitud, como en la superficie y el volumen, y en la captación de agua y minerales. Dado que en el modelo experimental la siembra se realizó en arena lavada y autoclavada, se descarta el aporte de la comunidad microbiana de la rizósfera, en la promoción de crecimiento vegetal. Yates y cols. [126] y Leslie y cols. [127] obtuvieron resultados similares y le atribuyeron este patrón de crecimiento a la naturaleza endofítica del hongo y al nivel de colonización del mismo. Con respecto a este último punto, Oren y cols. [119] observaron que la inoculación de semillas de maíz con *F. verticillioides* no suprimió el crecimiento de las plántulas y hasta podría mejorar el desarrollo de las mismas. El crecimiento vegetativo tiene su importancia en el establecimiento del cultivo y en la instalación del sistema foliar, donde es posible que mecanismos de acción de tipo hormonal estén involucrados en esta respuesta, mediante los cuales podría haber un mayor metabolismo y crecimiento vegetal [126]. Otra explicación de que *F. verticillioides* promueve el desarrollo de plántulas, como consecuencia del incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales, lo que origina una mayor capacidad de absorción de agua y minerales.

Por otro lado, la cepa RC2024 de *F. verticillioides* produce FB1. Theumer y cols. [128], describieron que esta toxina podría alterar la función biológica de la membrana celular, modificando su eficiencia como barrera física que separa el medio externo del contenido intracelular, y modulando la eficiencia de los mecanismos mediados por la membrana, incluyendo la permeación de algunos iones.

En este estudio, la inoculación de HS con el hongo micotoxicogénico *F. verticillioides* tuvo un efecto negativo en los parámetros de crecimiento, que afectó el desarrollo tanto de la parte aérea como así también del sistema radical, lo que conduce a un pobre desarrollo vegetal y a contar con un menor anclaje, limitando la capacidad productiva potencial de la planta. A su vez, estos efectos se reflejaron en diversos parámetros morfológicos de la raíz, inhibiendo su longitud, el peso seco, el volumen total y el área de superficie radicular. Estos resultados se conciben con los reportados por Williams y cols. [122], quienes hallaron que sólo aquellas cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisinas fueron capaces de causar síntomas de enfermedad en plántulas de maíces dulces susceptibles, donde observaron lesiones foliares e inhibición de crecimiento de raíces y tallos. Estos autores observaron que las plántulas crecidas a partir de semillas inoculadas con cepas no productoras de FB1 también presentaron menor desarrollo radical y de la porción aérea con respecto a los controles. Sin embargo, la severidad de



los síntomas fueron considerablemente menores que los evaluados en las plántulas tratadas con cepas productoras de la toxina, sugiriendo la participación de la FB1 en la manifestación de enfermedad en maíz inducida por *F. verticillioides*.

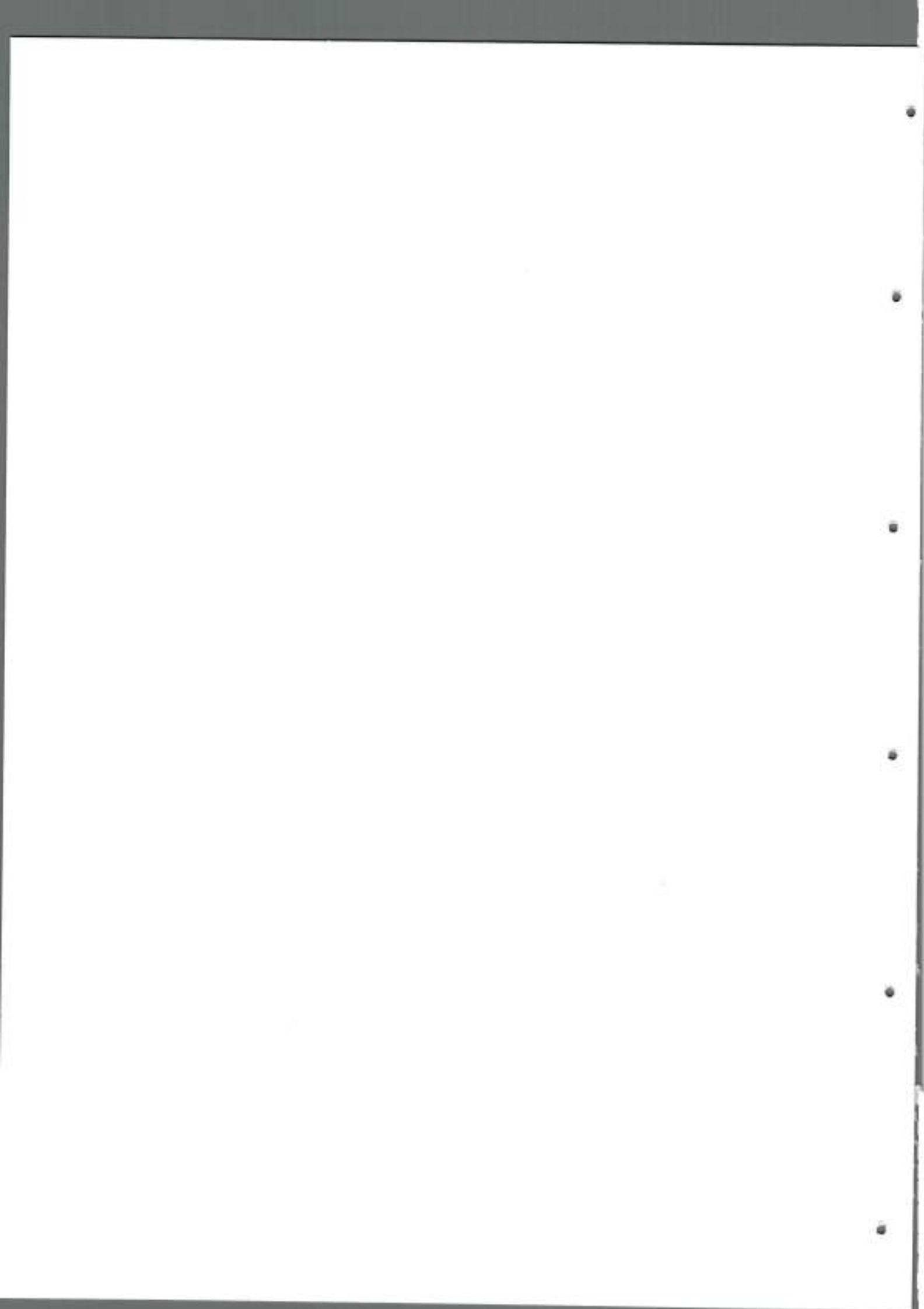
En nuestro modelo experimental, *F. verticillioides* afecta en forma diferente al HR y al HS en términos de parámetros de crecimiento, induciendo promoción o retardo del desarrollo respectivamente. En el HR, el incremento en la altura y biomasa de la parte aérea de las plántulas, no es la característica más deseable, dado que resulta preferible obtener variedades de maíz más bajas en altura, con el fin de lograr un mayor rendimiento en la producción de granos, en detrimento de la biomasa destinada al desarrollo de las partes vegetativas [129]. Además, con una planta más corta y fuerte es menor la posibilidad de vuelco, evitando pérdidas de producción. Una de las principales tecnologías que desembocaron en la "Revolución verde", fue la creación de variedades de trigo semienanas de alto rendimiento, donde los genes responsables de esa reducción de altura son insensibles a la giberelina. Estos genes se utilizan para transformar otras especies agrícolas como maíz y arroz [130-131]. Teniendo en cuenta que giberelina, una de las principales hormonas de crecimiento, fue aislada por primera vez del teleomorfo de *F. verticillioides* (*Gibberella fujikurui*) [132], y los efectos de promoción de crecimiento observados en las plántulas de maíz infectadas, existe la posibilidad de la producción de esta fitohormona por parte del hongo. Por otro lado, también podría ser que la FB1 promoviera el crecimiento de las plántulas, a bajas concentraciones.

Teniendo en consideración las variaciones en las respuestas registradas como resultado de la interacción *F. verticillioides*-maíz por diferentes autores citados anteriormente [66-68; 122; 126; 133-134] y en este estudio, se sugiere que las mismas podrían estar mediadas por la actividad de efectores. Los efectores pueden ser elicitores y/o toxinas, por lo tanto el término es neutral y no implica un impacto positivo o negativo en el resultado de la interacción patógeno-planta.

3. EFECTOS DEL RIEGO CON FB1 EN EL CRECIMIENTO Y EN LA MANIFESTACIÓN DE SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD EN PLÁNTULAS DE MAÍZ

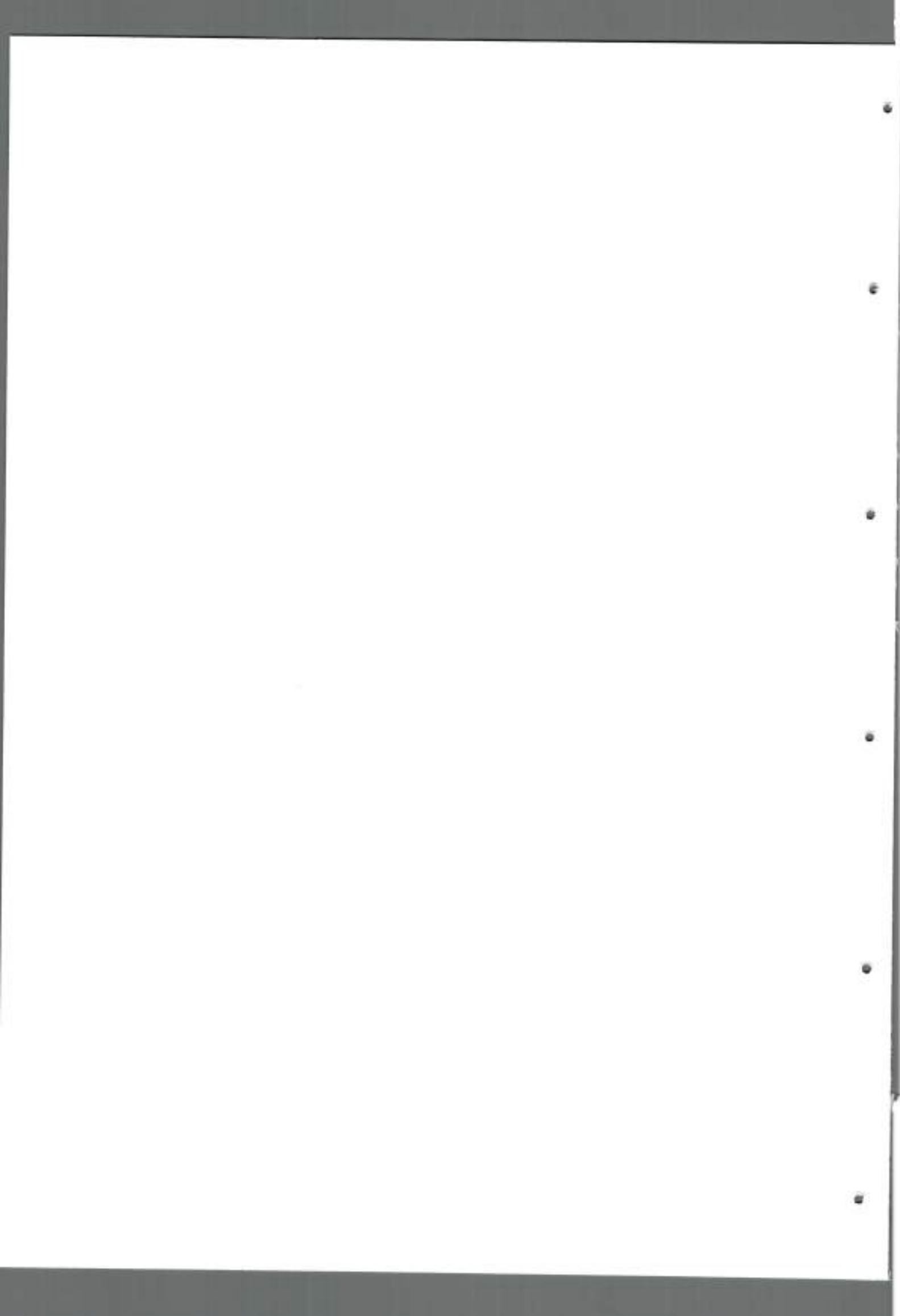
Para evaluar si FB1, por sí misma, es un factor de patogenicidad importante de *F. verticillioides* en plántulas de maíz, semillas de maíz de híbridos resistentes y susceptibles fueron sembradas y regadas con soluciones acuosas de FB1 de 1 y 20 ppm (1.4 y 27.7 μ M; respectivamente).

Lamprecht y cols. [135], realizaron estudios de fitotoxicidad con FB1 en dos cultivares de maíz de Sudáfrica y encontraron que ocurre una disminución en el peso seco tanto de la raíz como del tallo, luego de 12 días de crecimiento de las plántulas, en medio agar-agua conteniendo 10 μ M de FB1. En



otro estudio, se evaluaron los efectos de la toxina (0 a 100 ppm) en el proceso de germinación de semillas de dos variedades de maíz (Early Lancaster y B73), donde la presencia de fumonisina no afectó el porcentaje de germinación. Sin embargo, esta toxina inhibió la elongación de la radícula de la variedad Early Lancaster en un porcentaje mayor al 75%, a las 48 horas de imbibición, y aproximadamente del 50% de la variedad B73 a las 72 horas, pudiendo estar comprometida la emergencia de la plántula [136]. Una década después, Desjardins y cols. [137], analizaron una colección amplia de germoplasmas de maíz y encontraron diferentes respuestas en cuanto a la longitud de la raíz y del tallo de las plántulas, tras 5 días de crecimiento en agar-agua con FB1. Estos autores publicaron que sólo 2 de 42 muestras de *Zea mays* no presentaron signos de enfermedad luego de la exposición a FB1 ($DE_{50} > 100 \mu\text{M}$ de FB1) donde la línea B73 junto a muchas otras líneas mostraron altas sensibilidades a la toxina ($DE_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ de FB1). Otro estudio sobre la toxicidad fue llevado a cabo en maíz dulce Silver Queen, en donde FB1 afectó negativamente el desarrollo de raíces y tallos e indujo lesiones foliares [122]. Los signos de enfermedad fueron registrados después de los 13 dps en presencia de FB1 a 2,1; 4,2 y 8,3 μmoles por maceta, conteniendo 10 plántulas. Al comparar estos estudios basados en la exposición de FB1 a plántulas de maíz, se observaron variaciones en la severidad de la enfermedad y síntomas dependiendo del genotipo de las plántulas y de las condiciones de ensayo. Además, la toxicidad de fumonisinas en *Arabidopsis thaliana* ha sido descrita y también sería afectada por el genotipo y condiciones de ensayo, en donde condiciones de luminosidad serían requeridas para la aparición de lesiones foliares [138-139].

En el presente estudio FB1 reproduce en gran parte, por sí sola, los síntomas de enfermedad causados por la infección de *F. verticillioides* en plántulas de maíz. Asimismo, se pudo observar una respuesta diferencial de acuerdo a la dosis de FB1 utilizada. A niveles bajos de FB1 (1 ppm), la toxina causó reducción de los parámetros de crecimiento, tanto de la parte aérea como de la raíz en los días 7 y 14 post-siembra, en HR y en HS. Sin embargo, a los 21 dps se observó, en ambos híbridos, el reestablecimiento de los parámetros de crecimiento vegetativos. De acuerdo con estos resultados, algunos procesos de detoxificación podrían ser una estrategia del hospedador con el fin de alcanzar una respuesta compensatoria. Con respecto a fumonisinas, es escasa la información que describe su metabolismo dentro de la planta y aún no están claros cuáles son los mecanismos de degradación/detoxificación que pueden estar ocurriendo. Dado que las reacciones metabólicas de Fase I y II, tienen como finalidad la biotransformación de tóxicos en compuestos solubles en agua y como FB1 es un compuesto hidrofílico, no sería necesario que la misma atravesara por este proceso de modificación química. Sin embargo, la fase III de detoxificación en plantas involucra el secuestro de compuestos en la vacuola o bien los une de manera irreversible a la pared celular, siendo este un posible mecanismo de detoxificación de FB1 que podría estar operando en maíz. La planta podría

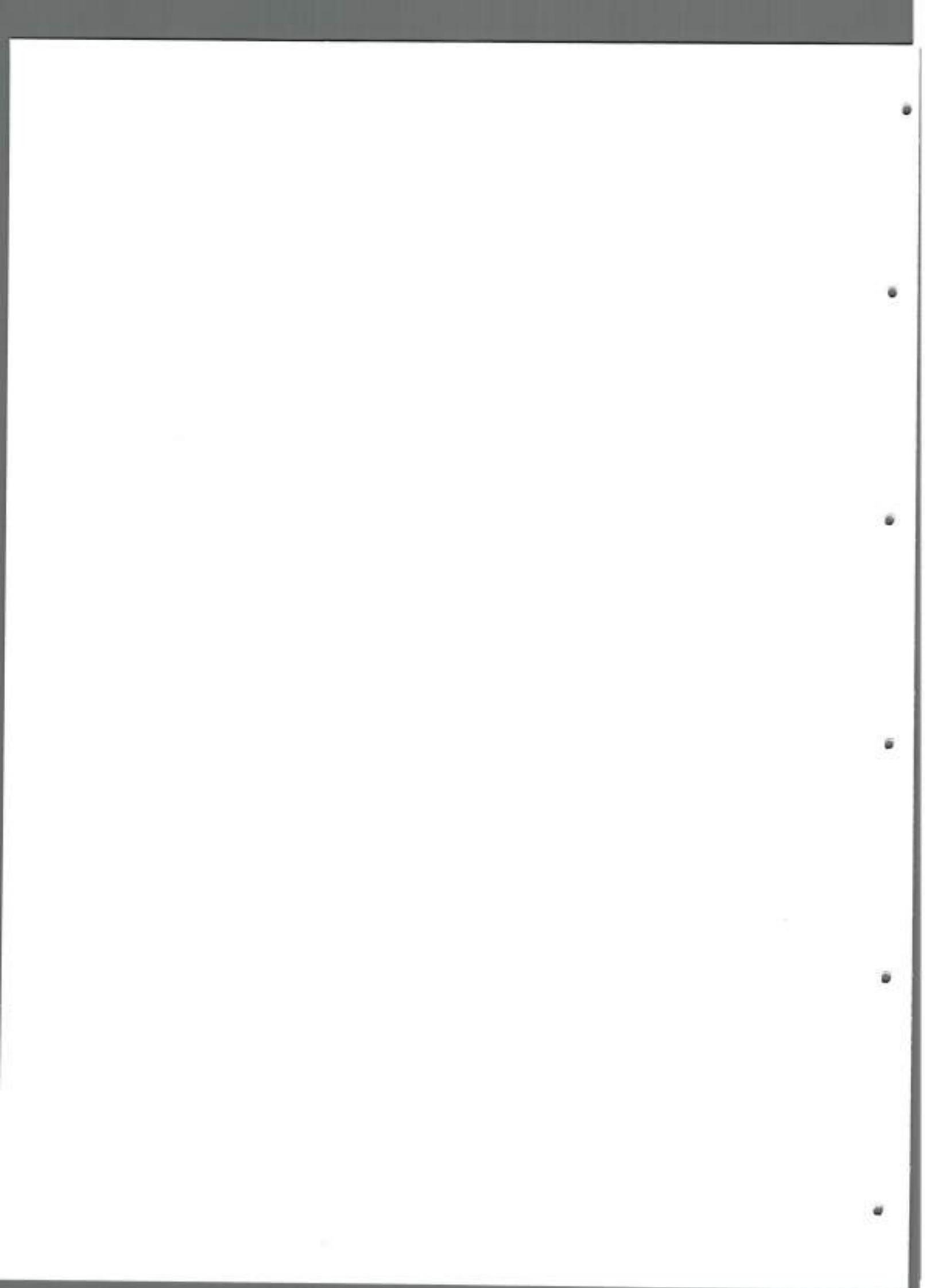


compartimentalizar a la toxina ligándola a la membrana de vacuolas o restringiéndola en el espacio apoplástico.

Por otro lado, en este trabajo de tesis, el análisis de imágenes del sistema radical fue efectivo para llevar a cabo una evaluación más detallada y precisa, y menos subjetiva de la arquitectura y funcionalidad de la raíz, en comparación a los métodos convencionales, permitiendo la cuantificación de los efectos mencionados luego de los tratamientos con FB1 y con *F. verticillioides*, de manera diferencial de acuerdo al genotipo de maíz utilizado. Es interesante destacar que la toxina a baja concentración afectó la funcionalidad de la raíz sólo en plántulas susceptibles, implicando un compromiso en la captación de agua y nutrientes en el HS y no en el HR. Siendo la longitud específica de la raíz un buen parámetro para visualizar los efectos detrimentales que causa la toxina de manera diferencial entre híbridos. En un trabajo reciente, Díaz-Arias y cols. [140] evaluaron la agresividad de especies de *Fusarium* spp. en raíces de soja, en el cual el análisis de imágenes les permitió identificar especies patógenas que interferían con la captación de agua y nutrientes, a pesar de presentar bajo nivel de severidad visual de podredumbre de raíz.

A nivel de 20 ppm, FB1 indujo efectos fitotóxicos más severos que los observados tras exponer a las plántulas a la concentración de 1 ppm de toxina, e incluso que los encontrados en el modelo de infección. Los síntomas de enfermedad (Figura 10) incluyeron apariencia clorótica, necrosis y marchitamiento de las plántulas, los que podrían ser asociados con el proceso de senescencia. Este es considerado la última etapa del desarrollo vegetal el cual denota procesos que conducen a la muerte de células individuales con el fin de recuperar nutrientes y distribuirlos hacia aquellos órganos que requieren más energía. A su vez, la senescencia puede ser gatillada por factores externos como por ejemplo el ataque de un patógeno, la aplicación de fitohormonas, oscuridad permanente, entre otros [141]. Si consideramos que la toxina puede afectar el ciclo de desarrollo (*developmental timing*) de las plántulas, es posible inferir que FB1 podría inducir una senescencia temprana en maíz. Esta asociación es concordante con estudios realizados por Brandwagt y cols. [142], quienes determinaron que la sobreexpresión de genes que incrementan la resistencia a la inducción de la senescencia, disminuyen además la sensibilidad a FB1 y AAL. Reforzando esta idea, una fracción de genes inducidos por FB1 en protoplastos codifica para proteínas asociadas a la senescencia, sugiriendo que la senescencia y la muerte celular gatillada por este patógeno podría tener una base molecular común [139].

En general, si bien es posible establecer si la planta es resistente o susceptible a la infección fúngica, el objetivo de este estudio fue conocer si la sensibilidad o insensibilidad a la toxina se condice con la respuesta a la infección de estos híbridos. Para las toxinas que producen dos patógenos fúngicos de maíz (*Cochliobolus carbonum*/toxina-HC y *Cochliobolus heterostrophus*/toxina-T), se ha demostrado que la insensibilidad a estas toxinas es una característica dominante ancestral en maíz [143]. Por el contrario, la



sensibilidad a la toxina FB1 parece ser un rasgo característico ancestral en *Zea mays*, mientras que la insensibilidad a la toxina es poco frecuente. Sin embargo, esta última es una característica que se puede heredar en maíz [137]. En este trabajo de tesis, plántulas resistentes y susceptibles fueron afectadas luego del tratamiento con la toxina. Sin embargo, la duración y la intensidad de los síntomas de enfermedad causados por FB1 fueron mayores en HS que en HR.

4. BIODISTRIBUCIÓN DE FB1

En lo que respecta a plántulas de maíz, la información sobre los niveles y distribución de fumonisinas en tejidos es limitada. No obstante, son muchos los trabajos existentes que describen contaminación de los granos con las toxinas, a medida que estos se acercan a la madurez fisiológica hasta el momento de la cosecha [31; 144-145].

En este trabajo se encontró que *F. verticillioides* produce FB1 en plántulas de maíces resistentes y susceptibles, tanto en tejido radical como foliar. Sin embargo, la toxina se acumula preferentemente en raíces y en menor proporción en parte aérea; la distribución selectiva de la toxina podría ser una estrategia importante de tolerancia y detoxificación de la planta. En un estudio realizado en maíz dulce, la incidencia de lesiones foliares y la severidad de los efectos sobre el crecimiento de raíz y tallo se correlacionaron de manera directa con los niveles de fumonisinas cuantificados en las raíces de plántulas infectadas con *F. verticillioides* (<20 nmol g⁻¹) [122]. En el mismo trabajo encontraron que aunque la toxina se acumula en raíz, fueron detectados niveles de la toxina relativamente bajos en hojas. Incluso una cepa micotoxicogénica de *F. verticillioides* utilizada no colonizó la parte aérea pero indujo lesiones foliares. Los autores propusieron que el desarrollo de las lesiones foliares puede deberse a cambios a nivel metabólico inducidos por la toxina en raíz. Por otro lado, en el presente estudio, si bien en el HR se detectaron niveles de FB1, en HS fueron mayores en ambos tejidos. Estos resultados son concordantes con los informados por Wu y cols. [118], quienes hallaron mayores concentraciones de FB1 en raíces susceptibles de maíz que en las resistentes y donde la producción de micotoxinas se correlacionó con los niveles de colonización de *F. verticillioides*.

En el modelo de fitotoxicidad propuesto en este trabajo, luego de riego de las plántulas de maíz con FB1, fue posible cuantificar la toxina en ambos híbridos, pudiéndose distribuir hacia otras partes de la plántula. Esto es importante, dado que *F. verticillioides* puede ser aislado tanto del rastrojo como así también del suelo, con la posibilidad de producir FB1 y que esta acceda a la planta [146]. De manera similar a lo observado en plántulas infectadas resistentes y susceptibles, en híbridos expuestos a FB1, la toxina se localizó preferencialmente en raíces y en menor proporción en la parte aérea, siendo la concentración de FB1 mayor en HS que en HR. La distribución hacia la parte aérea de las plántulas fue

más rápida y se determinó una mayor concentración de la toxina, en plántulas regadas con FB1 que en aquellas infectadas, en ambos híbridos. Estos resultados coinciden en parte con estudios realizados con Zitomer y cols. [147], quienes describieron que FB1 se acumula preferencialmente en raíces. Sin embargo, estos autores indican que la toxina no puede translocarse a la parte aérea de plántulas de maíz dulce susceptible, regadas con la toxina. No obstante, cuando plántulas de maíz que crecieron a partir de semillas inoculadas con *F. verticillioides*, registraron acumulación de FB1 en el tejido foliar, sugiriendo que la interacción hongo-planta es necesaria para la translocación de FB1 en maíces infectados con *F. verticillioides*.

En el modelo utilizado en este trabajo de tesis, *F. verticillioides* produce FB1 en las plántulas de maíz, a partir de una infección en semilla, en estadios tempranos, siendo la localización preferencial en raíz y donde los niveles de FB1 se correlacionaron con el grado de infección fúngica.

En el modelo de fitotoxicidad, FB1 se encontró en las plántulas de maíz, sugiriendo que la toxina puede ser tomada por la planta a partir del suelo. Esto último indicaría que *F. verticillioides* al ser un hongo de suelo, que además sobrevive en el rastrojo, al producir la FB1, esta puede contaminar la planta, sin infección, siendo la localización preferencial en la raíz y pudiéndose distribuir a la parte aérea.

La cuantificación de la toxina, se realizó mediante el uso de cromatografía líquida acoplado a un espectro de masa (LC-MS), en donde la asignación de la identidad del compuesto de interés está basada en la masa exacta, patrón de fragmentación y el número de carbonos existente en la fórmula, además de comparar el perfil cromatográfico del metabolito con soluciones estándares. Recientemente, se ha encontrado que las plantas, como mecanismo de defensa, pueden alterar la estructura química de micotoxinas. El problema radica en que estas micotoxinas ligadas o enmascaradas pueden eludir los análisis convencionales, conduciendo a una subestimación del contenido total de toxina en la muestra [72]. Sin embargo, aunque varias micotoxinas enmascaradas han sido identificadas hasta hoy, sólo se ha comprobado la ocurrencia en cereales infectados naturalmente, como maíz, trigo y cebada, con zearalenona-14- β -D-glucopiranosido (Z14G) y deoxynivalenol-3- β -D-glucopiranosido (D3G). Con respecto a fumonisinas modificadas, varios estudios indican su presencia en granos contaminados o por efecto del procesamiento de alimentos en base a maíz [148-150], aunque recientemente se describió que ciertos ácidos grasos podrían intervenir en la formación de fumonisinas enmascaradas en plantas, dado que se asoció la cantidad de fumonisina ligada y la relación ácido oleico/linoleico en maíz [151]. De acuerdo con los datos expuestos, son necesarias futuras investigaciones para identificar la presencia, estabilidad y posibles transformaciones de fumonisinas ligadas en cereales además de estudios de impacto toxicológico.

5. DISRUPCIÓN EN EL METABOLISMO DE ESFINGOLÍPIDOS EN MAÍZ Y SU EFECTO SOBRE LA RESISTENCIA A *Fusarium verticillioides* Y A FB1

Los datos disponibles en la actualidad sobre la participación de los esfingolípidos en la inmunología vegetal, sugieren que los mismos son moléculas bioactivas que podrían modular la respuesta de defensa contra patógenos. Koga y cols. [152] encontraron que algunos esfingolípidos producidos por el hongo patógeno *Magnaporthe grisea* indujeron acumulación de fitoalexina, muerte celular e incrementaron la resistencia a infección en células de arroz. Además, otros autores [153] describieron que en *Nicotiana benthamiana*, la biosíntesis de esfingolípidos es crucial en la respuesta de defensa temprana. Estos investigadores observaron que tras la infección con un patógeno no específico de hospedador, *Pseudomonas cichorii*, era inducido marcadamente el gen que codifica para la primera enzima involucrada en la síntesis de estos lípidos (serina palmitoiltransferasa). Sin embargo, en respuesta ante el patógeno hospedador específico *P. syringae* pv. *tobaco* sólo registraron una inducción transitoria. Por otro lado, en hojas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *P. syringae*, se observó un elevado y sostenido incremento de fitoesfingosina luego de una interacción incompatible planta-patógeno que conduce a la resistencia, caracterizadas por muerte celular del hospedador, en comparación con una interacción compatible [154].

F. verticillioides y *A. alternata* producen FB1 y AAL respectivamente, micotoxinas análogas a la esfingarina. En este trabajo, se registraron desbalances en los niveles de esfingolípidos tanto en las plántulas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* o por exposición directa a la toxina, por lo que la alteración del metabolismo lipídico podría estar directamente relacionada con la producción de efectos tóxicos de FB1.

Asimismo, es cada vez más evidente que las modificaciones estructurales en esfingolípidos, tales como hidroxilación e insaturación de las bases de cadena larga no polares, pueden alterar el flujo metabólico y sus funciones en las vías de señalización [111]. Con respecto a esto, una de esas variables se presenta entre Sa y Pso, ya que las mismas difieren sólo en un grupo hidroxilo. Recientemente, Chen y cols. [113] sugirieron, en *Arabidopsis* spp. (Figura 29), dos clases de ceramidas sintetasas con especificidad por sustratos diferentes, CSI utilizando Sa y ácidos grasos de cadena corta (C16) y CSII utilizando como sustrato Pso y ácidos grasos de cadena larga. Por lo tanto, la estructura de la base esfingoidea influenciaría en un cambio en la ruta de biosíntesis de los esfingolípidos, particionando la vía metabólica y en última instancia determinando la composición y el contenido de esfingolípidos complejos específicos.

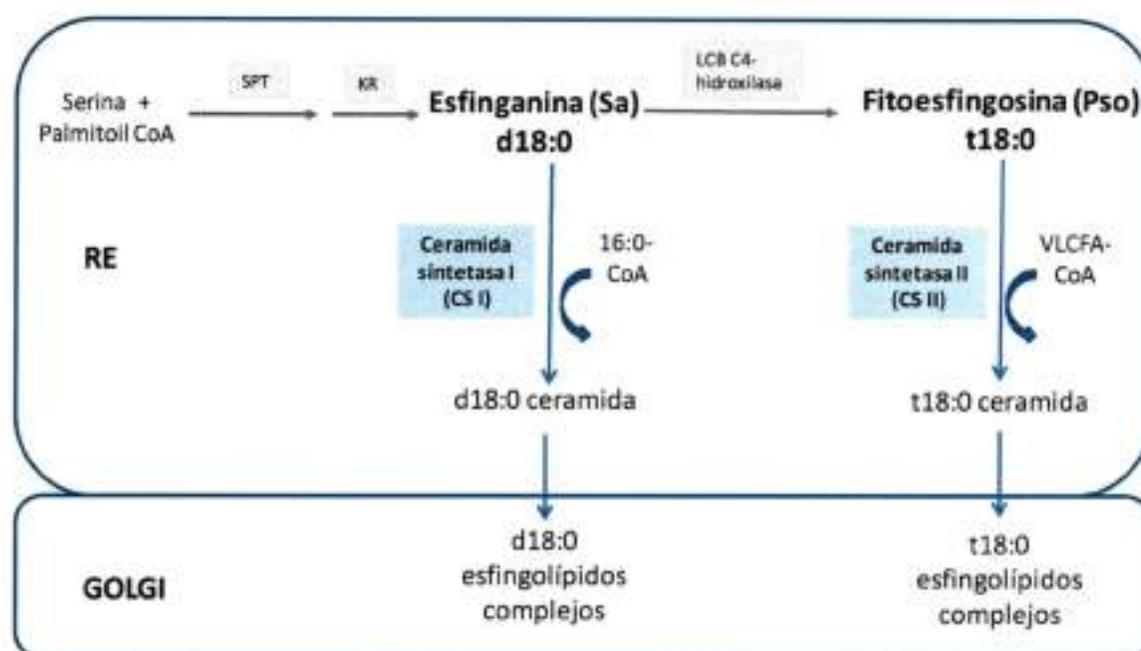


Figura 29: Ruta biosintética de los esfingolípidos simplificada descrita en *Arabidopsis* spp. donde se sugiere dos clases de ceramidas sintetetasas (CS).

Sa es preferencialmente acilada con ácidos grasos de 16 C por la CS I, mientras que Pso se combina con ácidos grasos de cadena larga (VLCFA, *very long chain fatty acyl*) por CS II. RE: Reticulo endoplásmico. SPT: Serina palmitoil transferasa. KR: ketoesfinganina reductasa. (Adaptado de Markham y cols. 2013 [111]).

En nuestro modelo experimental, se cuantificó un aumento de bases esfingoides totales en ambos híbridos, pero además se observaron diferencias en relación a la especie específica acumulada en cada caso. En raíces de HR infectados, el marcado aumento en los niveles de FB1, se correlacionaron con una gran acumulación de Sa (d18:0) y un aumento discreto de Pso (t18:0). Sin embargo, en raíces de HS infectados, de manera temprana, la concentración de FB1 se asoció con un incremento de Pso (t18:0). Mientras que, 7 días después, pese al incremento marcado en los niveles de FB1, la acumulación de Sa no alcanzó las altas concentraciones observadas en HR. Se podría inferir, que en maíz, de manera similar a lo descrito en *Arabidopsis*, podrían intervenir dos ceramidas sintetetasas y FB1 tendría un efecto diferencial de inhibición sobre la actividad de estas enzimas. La toxina tendría mayor avidez por CS-I, siendo Sa (d18:0) su sustrato que por CS-II, que utiliza Pso (t18:0) como sustrato [113]. Saucedo-García y cols. [116], a su vez, observaron que el incremento de la concentración de Sa, actuaría como un 2º mensajero en la ruta de la muerte celular programada, y se generaría por una regulación fisiológica compleja de diferentes reacciones enzimáticas involucradas en el metabolismo de la Sa.

De esta manera, en el modelo de infección con el hongo hemibiotrófico, y específicamente en raíz, en plántulas resistentes, un incremento en FB1, conduciría a una acumulación de esfinganina, por inhibir CS-I. A su vez, Sa, activaría las rutas de señalización que conducen a inducir muerte celular,

determinando una respuesta de defensa fenotípicamente resistente. Por otro lado, en raíces de HS, FB1 induciría un aumento principalmente de fitoesfingosina, por inhibición de la enzima CS-II, donde el incremento de Pso no estaría operando en la vía de señalización que conduce a la MCP, determinando un perfil de respuesta de susceptibilidad a la patogénesis.

Asimismo, es interesante observar el mismo perfil de respuesta para cada uno de los híbridos, en el modelo de fitotoxicidad.

El rol específico de Sa en su participación en la respuesta de defensa en plantas, se correlaciona con estudios realizados en *Arabidopsis* spp., mediante los cuales se demostraron que luego de tratamientos con FB1, las plántulas "wild type" presentaron aumentos marcados de Sa y fenotipo de MCP, no siendo así para el caso de las mutantes *lob2a-1* (gen que codifica para la Serina Palmitoil Transferasa) [116]. Otro trabajo realizado en una doble mutante de *Arabidopsis sbb1 sbb2*, la cual resulta defectuosa para dos LCB hidrolasas, mostraron un incremento notable de Sa y zonas necróticas y muerte prematura [155].

Por otra parte, en el presente estudio, en las muestras de la porción aérea de las plántulas resistentes inoculadas con *F. verticillioides*, a diferencia de lo observado en raíz, no se registraron cambios significativos en la concentración de Sa. Esto se condice con los niveles bajos de FB1 (cerca al límite de cuantificación) detectados en esta parte de la plántula. A su vez, las hojas, presentaron sectores de muerte celular, lo que podría ser una consecuencia de los cambios inducidos por la disrupción del metabolismo lipídico en raíz. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Willians y cols. [122], quienes demostraron que la incidencia de lesiones foliares se correlacionaban con los niveles de FB1 y con la alteración del metabolismo lipídico, en raíces.

En este trabajo, en la porción aérea proveniente de plántulas expuestas a FB1, los niveles de toxina son mayores que en plántulas infectadas. En HR, la concentración máxima alcanzada de FB1 se correlacionó con el mayor incremento registrado en los niveles de Sa, en número de veces con respecto al control. Mientras que en el HS, los niveles máximos de la toxina favorecieron la acumulación preferentemente de Pso.

Tras la infección de las plántulas de maíz con *F. verticillioides* o exposición directa a FB1 se produce una disrupción del metabolismo de los esfingolípidos. Sin embargo, se observa una acumulación diferencial de metabolitos, de acuerdo a la resistencia o susceptibilidad de la plántula. En HR, se acumula preferencialmente Sa y hubo inducción de muerte celular, dando un perfil de respuesta fenotípicamente resistente. Mientras que en HS, hubo un elevado incremento en Pso, sin inducción de muerte celular, lo cual estaría relacionado con un perfil de respuesta de susceptibilidad a la patogénesis.

6. PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y DE OTRAS FITOHORMONAS EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN Y A FBI

La activación de una respuesta efectiva contra patógenos es finamente regulada por fitohormonas. A su vez, son varias las evidencias que sugieren una asociación entre la señalización mediada por los esfingolípidos y las fitohormonas en la inmunología vegetal. En este sentido, Rivas y cols. [156] sugirieron recientemente que las bases esfingoides libres modulan la respuesta inmune de manera dependiente con el SA en *Nicotiana benthamiana* comprometiendo la resistencia a *Alternaria alternata* f. sp. *hyoperisici*. Por otra parte, se demostró la participación de FBI y AAL, micotoxinas análogas de Sa, en la inducción de muerte celular en animales y plantas [138; 157-158] y en cuyo proceso podría requerir la activación simultánea de hormonas. Asai y cols. [138-139], describieron que la muerte celular inducida por FBI en *Arabidopsis* spp. es acompañada por la inducción de genes dependientes de SA, JA y ET.

En este trabajo de tesis, al comparar los niveles de SA, JA y ABA, en la porción aérea de las plántulas resistentes y susceptibles infectadas, se observó que sólo en el HR hubo incremento en los niveles de SA, a los 7 dps, sin cambios en JA. De modo interesante, en este híbrido resistente, a los 21 dps, la concentración de SA vuelve a niveles similares a los de control, registrándose un aumento importante de ABA y disminución de JA.

Patógenos biotróficos y hemibiotróficos como por ejemplo *F. verticillioides*, son comúnmente más sensibles a la respuesta de defensa mediada por SA, la cual activa una cascada de señales que generalmente culmina en un tipo de muerte celular programada localizada (RH) [93; 159]. Asimismo, varios estudios han demostrado que la acumulación endógena de SA antagoniza las respuestas JA-dependientes, priorizando la resistencia mediada por SA [160]. Por otra parte, recientemente, se comenzó a estudiar la participación de ABA, y otras fitohormonas en el re-direccionamiento de la respuesta de defensa, al interactuar, sinérgica o antagónicamente con SA-JA-ET [161-164]. Diversas líneas de investigación indicaron que la respuesta de defensa mediada por SA, que normalmente consiste en limitar el crecimiento del patógeno, puede ser suprimida, al menos en parte por el efecto inhibitorio inmune de ABA. Se ha demostrado que la bacteria patógena *P. syringae* puede alterar la fisiología de ABA y auxinas del hospedador, por medio de un efector de virulencia específico, promoviendo la enfermedad de la planta [107; 165-166]. Los niveles de ABA inducidos por la bacteria parecen suprimir la biosíntesis y los efectos de SA, resultando en un aumento de susceptibilidad al patógeno. De la misma manera, Xu y cols. [167], encontraron que ABA incrementó la susceptibilidad *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, patógeno responsable de tizón en hojas de arroz por suprimir la defensa mediada por el SA. Mohr y Cahill [105], describieron que la deposición de lignina asociada con RH en respuesta a la infección con *Pst* 1065 fue removida luego del tratamiento exógeno con ABA, luego de la

infección. Sin embargo, en algunas interacciones, se encontró que ABA puede actuar como un regulador positivo de resistencia hacia la enfermedad. Se observó, por ejemplo, que ABA promueve a la deposición callosa, mejorando así la defensa basal contra los hongos *Blumeria graminis* y *Alternaria brassicicola* [168-169]. En adición, ABA es requerido para el cierre de los estomas, lo cual constituye una parte de la respuesta inmune pre-invasión mediada por SA, siendo esta una de las principales barreras contra la invasión bacteriana [170]. En conjunto, estos estudios demuestran que ABA puede promover la resistencia en algunas interacciones planta-patógenos mientras que en otras incrementa la susceptibilidad. Sin embargo, el "crosstalk" entre las vías de señalización entre ABA y SA parecen ser predominantemente antagonistas [171].

Por otro lado, algunos patógenos pueden interferir o modular las vías metabólicas de las fitohormonas, lo cual constituiría una estrategia efectiva para alterar la inmunidad del hospedador [172]. Una de estas estrategias consiste en la habilidad de secretar fitotoxinas, de manera de incrementar el grado de virulencia en el patógeno y suprimir la respuesta inmune de la planta [88]. En el presente estudio, la aplicación directa de FB1 indujo cambios principalmente a nivel de las concentraciones de ABA, en ambos híbridos, siendo estas notablemente superiores en el HS. A su vez, este incremento en las concentraciones de ABA se correlacionaron con niveles altos de FB1 en las plántulas.

Pseudomonas syringae produce coronatina, un análogo de JA e isoleucina y que promueve la virulencia en plantas por activación de una cascada de señales que inhiben la acumulación del SA [173]. Asimismo, estudios recientes demostraron que efectores tipo III de *P. syringae*, manipularon la señalización de ABA como estrategia de virulencia. La comparación de *Pst* DC3000 WT y el transgénico *bpr-1* defectivo en TTSS, demostraron la habilidad de los efectores tipo III de inducir la biosíntesis de ABA [165]. Notablemente, la sobreexpresión condicional del efector, AvrPtoB, fue suficiente para inducir acumulación endógena de ABA [174].

En el presente trabajo, en el tejido infectado del HR, en forma temprana cuando el mismo presentó las más bajas concentraciones de toxina en la plántula, la respuesta estuvo liderada por SA. A los 21 dps, la participación de ABA, en la resistencia tardía que está caracterizada por eventos tales como la respuesta hipersensible [162], podría estar modulando los niveles de SA o inducir una nueva fase de respuesta.

El tratamiento con FB1, registró un nivel importante de toxinas en las plántulas, con una acumulación preferencial en raíces y una rápida distribución de la misma en la porción aérea, en forma temprana, en comparación con los cultivares infectados; donde los niveles de toxina de la plántula se correlacionaron con un incremento en ABA. El incremento de los niveles de ABA o el aumento de la sensibilidad a la acción de esta fitohormona resulta en una disminución de la resistencia, lo que podría sugerir que este

sería un posible mecanismo por el cual *Fusarium verticillioides*, por medio de la acción de FB1, alteraría el sistema de defensa del hospedador, incrementando su susceptibilidad.

7. CONCLUSION FINAL

Los resultados sugieren que la FB1 es un factor de patogenicidad importante en la interacción *F. verticillioides*-maíz, habiendo reproducido la toxina por sí sola, gran parte de los síntomas de enfermedad observados en la infección fúngica.

La toxina puede condicionar la evolución de la interacción hongo-planta aún antes del contacto inicial del patógeno y el maíz. Esto último se basa en que la raíz puede absorber y acumular FB1 presente en el suelo, suministrada con el riego (en este trabajo de Tesis) o naturalmente con rastrojos contaminados, conteniendo altos niveles de la toxina.

Tras la infección, la biosíntesis de FB1 puede favorecer la invasión fúngica y patogenicidad, proporcionándole al hongo un estado de mayor agresividad y/o debilitando los mecanismos de defensa de la planta. En relación a este último aspecto, los resultados de este estudio sugieren fuertemente la existencia de mecanismos de detoxificación de la planta, los cuales serían eficientes hasta cierto grado de contaminación. Superado este umbral, la planta no sería eficiente para controlar la toxicidad de FB1.

Los síntomas de enfermedad causados por el hongo hemibiotrófico estarían relacionados en parte con los desbalances lipídicos generados en la planta por exposición a la toxina. En HR, particularmente en raíz, el aumento de las BE, liderado por Sa, activaría las rutas de señalización que conducen a inducir muerte celular, que acompañado de incrementos del SA, determinarían una respuesta de defensa fenotípicamente resistente. Además en HS, existiría una acumulación preferencial de Pso, cuyo incremento no estaría operando en la vía de señalización que conduce a la MCP, y en donde la participación ABA, como regulador negativo de la resistencia, contribuiría a direccionar un perfil de respuesta de susceptibilidad a la patogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos

Estándares:

Las fumonisinas se adquirieron a partir del PROMEC (Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis, Tygerberg, Republic of South Africa).

DL-eritro-dihidroesfingosina (d18:0) (Sa), y Fitoesfingosina (t18:0) (Pso), ambos con una pureza > 99% se compraron a Avanti Polar Lipids, Alabaster.

Las fitohormonas: (\pm) 2-cis, 4-trans- ácido abscísico (ABA), (\pm) ácido jasmónico (JA), ácido giberélico (GA3) y ácido salicílico (SA) fueron provistas por Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina), mientras que los estándares internos marcados con isótopos (^3H]-ABA, ^3H]-JA, ^3H]-GA3 y ^3H]-SA) fueron provistos por OlChemim Ltd. (Olomouc, República Checa).

Los solventes grado HPLC (metanol y acetonitrilo) fueron adquiridos a Sintorgan, Buenos Aires, Argentina. Las otras drogas usadas en los distintos ensayos fueron de calidad pro-análisis.

Fertilizante: En los ensayos en invernadero se utilizó un fertilizante soluble YARA (Buenos Aires, Argentina), con la siguiente composición: 15% N [6,5% nitrato, 8,5% amonio], 15% P como P_2O_5 , 15% K como K_2O , y 3,2% S.

1.2. Medios de cultivo

Agar agua: Se preparó una solución de agar agar al 2% en agua destilada. Luego de la disolución del agar en baño de agua, el medio de cultivo fue esterilizado mediante autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

Agar V8: Se utilizó para el desarrollo de *F. verticillioides*, previo a la inoculación del maíz. El medio de cultivo fue preparado mediante disolución de 180 ml de jugo comercial V8, 2 g de CaCO_3 y 15 g de agar agar en 850 ml de agua destilada. La esterilización se realizó mediante autoclavado a 121 °C, durante 15 minutos.

Agar papa glucosado (APG): Se utilizó para el estudio de las características culturales de *F. verticillioides*. El medio fue preparado disolviendo el medio de cultivo (39 g del polvo en un litro de agua destilada), luego se calentó hasta ebullición con agitación continua para disolución total y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC): Contiene rosa de bengala y dicloran que inhiben el desarrollo de hongos contaminantes ambientales de crecimiento rápido. El rosa de bengala también es antibacteriano. El medio tuvo la siguiente composición (en g): glucosa 10,00; peptonas 5,00; KH_2PO_4 1,00; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,50; agar agar 15,00; rosa de bengala 0,025 (5% p/v en agua, 0,5 mL); diclorán 0,002 (0,2% p/v en etanol, 1mL); cloranfenicol 0,10, en 1 L. de agua destilada. Se ajustó el pH a 5,6 y luego se esterilizó mediante autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. El medio fue mantenido en oscuridad hasta su utilización.

1.3. Genotipos de maíz: Selección de las semillas

Se utilizaron semillas de maíz (*Zea mays* L.) de híbridos susceptible (HS, 31P77, Pioneer) y resistente (HR, LT 622 MG, Seminium) a la infección con *F. verticillioides* [33].

Para la realización de los estudios se seleccionaron lotes de semillas de maíz, que mostraron ausencia de infección mediante la técnica de plaqueo directo de las mismas, desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito. La desinfección se realizó sumergiendo las semillas durante dos minutos en la solución de hipoclorito al 0,4%, y agitando constantemente. Luego, se eliminó la solución desinfectante y se realizaron tres lavados con agua estéril de un minuto cada uno. Tras eliminar el agua del último lavado se dispusieron los granos en placas con medio de agar diclorán rosa de bengala y cloranfenicol (DRBC). Se utilizaron semillas que no estaban pre-tratadas con biocidas (curadas).

El desarrollo del maíz comprende etapas de crecimiento vegetativo (V) y reproductivo (R). Los estudios realizados en esta tesis fueron hechos sobre plántulas de maíz, en periodo de crecimiento vegetativo (V), entre las etapas VE (emergencia de las plántulas) y V4 (4ª etapa del crecimiento vegetativo, 4-6 hojas visibles).

1.4. Cepa fúngica

Los experimentos se realizaron con la cepa de *F. verticillioides* RC2024, provista gentilmente por el Dpto. de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. La cepa fúngica fue aislada de maíces procedentes de la región agrícola de la localidad de Río Cuarto. La cepa fúngica se conservó en glicerol estéril al 15% a -80 °C.

a) Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de conidias de *F. verticillioides* RC2024, como se describe en la bibliografía [175]. Brevemente, se disgregaron mecánicamente las colonias fúngicas desarrolladas durante siete días a 25 °C en medio agar papa glucosado (APG), con una solución estéril de Tween 20 (2,5 % en PBS). Las suspensiones obtenidas de esta manera se dejaron decantar durante 30 seg, ajustándose luego su turbidez a 0.1 DO con espectrofotómetro a 600 nm, esta densidad representó 10^{12} ufc/ml. Luego, se confirmó la viabilidad conidial mediante el método estándar de recuento en placa con medio de cultivo DRBC. Estas suspensiones de conidias fueron utilizadas para evaluar la capacidad toxicogénica de la cepa, para infectar las semillas de maíz, y para preparar los inóculos para la producción de fumonisinas en biorreactor.

b) Evaluación de la capacidad toxicogénica

Para evaluar la capacidad toxicogénica de *F. verticillioides* RC2024 se colocaron 300 g de maíz en Erlenmeyers de 1L, se hidrataron con 35 ml de agua destilada y se esterilizaron 2 veces (en dos días consecutivos) en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente se inoculó el maíz con 1 ml de una suspensión conidial de la cepa en estudio preparada como se describió en el punto anterior. Las muestras se incubaron durante 28 días a 25 °C en oscuridad, realizando una homogeneización manual diaria durante los cinco primeros días. Luego del período de incubación, las muestras fueron autoclavadas y secadas a 60°C, para luego ser molidas y almacenadas a -20 °C hasta la extracción y análisis de fumonisinas.

c) Extracción y cuantificación de fumonisinas por HPLC-FL

Las fumonisinas se cuantificaron en extractos acuosos del maíz fermentado [52]. Los extractos acuosos fueron diluidos con volúmenes iguales de acetonitrilo. La detección y cuantificación de los extractos fue realizada siguiendo la metodología propuesta por Shephard y col. [176] y Sydenham y col. [177]. Una alícuota de 50 µl de cada extracto fue derivatizado con 200 µl de una solución de o-ftaldialdehído (OPA) obtenida por el agregado de 5 ml de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1M y 50 µl de 2-mercaptoetanol, a 40 mg de OPA disuelto en 1 ml de metanol. Las muestras derivatizadas fueron analizadas usando un sistema HPLC Hewlett-Packard 1100, con bomba isocrítica (G1310A) y acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent Technologies 1200). Las λ fueron de 335 y 440 nm para excitación y emisión, respectivamente. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna de fase reversa C18 (150x4,6)mm, 5 µm, Luna 100 RP-18, conectada a una pre-columna (20x4,6)mm de 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Como fase móvil se utilizó una solución de metanol: NaH_2PO_4 0.1

M (75:25) y pH: 3.35 ± 0.20 ; ajustado con ácido o-fosfórico, y a un flujo de 1.5 ml/min. La cuantificación de las toxinas se realizó extrapolando el área del pico obtenido en el extracto acuoso, sobre una curva de calibración ($r^2 > 0.995$) construida con estándares analíticos de FB1, FB2 y FB3 (pureza > 95%) (PROMEC, Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis, Tygerberg, Republic of South Africa).

El método cromatográfico fue verificado utilizando tanto estándares puros como co-inyecciones. Se estableció como límite de detección (LD) cuando la señal fue 3 veces superior al ruido ($S/R=3$), mientras que $S/R=10$, fue considerado como límite de cuantificación (LC). El LD fue de $0.01 \mu\text{g/g}$ mientras que el LC fue de $0.03 \mu\text{g/g}$. Las co-inyecciones fueron utilizadas para evaluar el porcentaje de recuperación del método, el cual fue mayor al 90% considerando dos concentraciones (0.1 y $1.0 \mu\text{g/g}$).

2. PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS EN BIORREACTOR

Las toxinas se produjeron mediante cultivos de *F. verticillioides* RC2024 en medio líquido. Los cultivos se iniciaron por la inoculación de la suspensión de conidias en un biorreactor de 10L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) conteniendo medio MYRO [1g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 3g KH_2PO_4 , 2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g NaCl, 40 g glucosa, 10 g glicerina; en 1 L de agua destilada], a 28°C con una agitación de 120 rpm [178]. El oxígeno disuelto fue mantenido por agitación y flujo de aire de 2L estándar/min (SLPM) y se trabajó a un pH de 3,5 que fue sostenido por control automático con NaOH 0.1 M. El medio líquido fermentado, durante 28 días, fue autoclavado y luego clarificado por filtración a través de un filtro con poros de $0.45 \mu\text{m}$. La cuantificación de los niveles de FB1 se realizó en las muestras clarificadas mediante HPLC-FL, de acuerdo a la metodología descrita en el punto 1.4.c.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se desarrollaron dos modelos experimentales con híbridos de maíz resistente (HR) y susceptible (HS):

- I- Modelo de infección: Con el objetivo de caracterizar comparativamente la fitopatogenia de la infección en ambientes genéticos resistente y susceptible (Figura 30).
- II- Modelo de fitotoxicidad: Para evaluar la posible participación de la FB1 como factor de patogenicidad en la interacción del hongo con ambos genotipos de maíz (Figura 31).

La cosecha de las plántulas de maíz se realizó a los 7, 14 y 21 días post-siembra (dps).

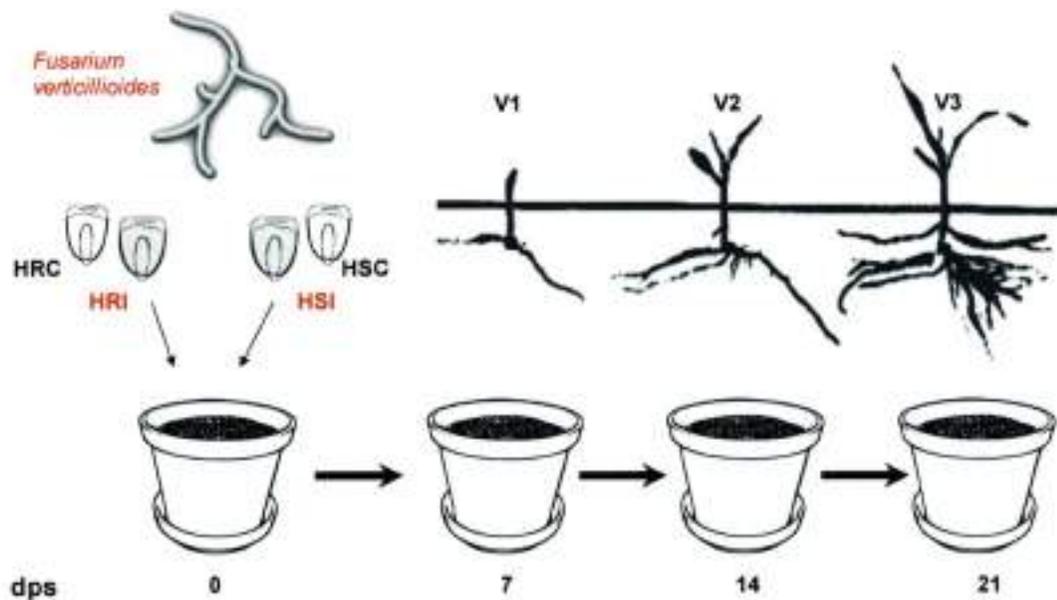


Figura 30: Modelo experimental usado para estudiar la interacción *Zea mays*-*F. verticillioides*. Las semillas de maíz de híbrido resistente (HR) y susceptible (HS), previamente desinfectadas, se trataron durante 18 horas con 10^{12} UFC/ml de la cepa fúngica. Las semillas inoculadas y no inoculadas (control) se sembraron en macetas conteniendo arena autoclavada. Las plántulas se cosecharon a los 7, 14 y 21 dps, cuando alcanzaron los estados vegetativos V1, V2 y V3 respectivamente. HRC: Híbrido resistente control. HRI: Híbrido resistente infectado. HSC: Híbrido susceptible control. HSI: Híbrido susceptible infectado. dps: días post-siembra.

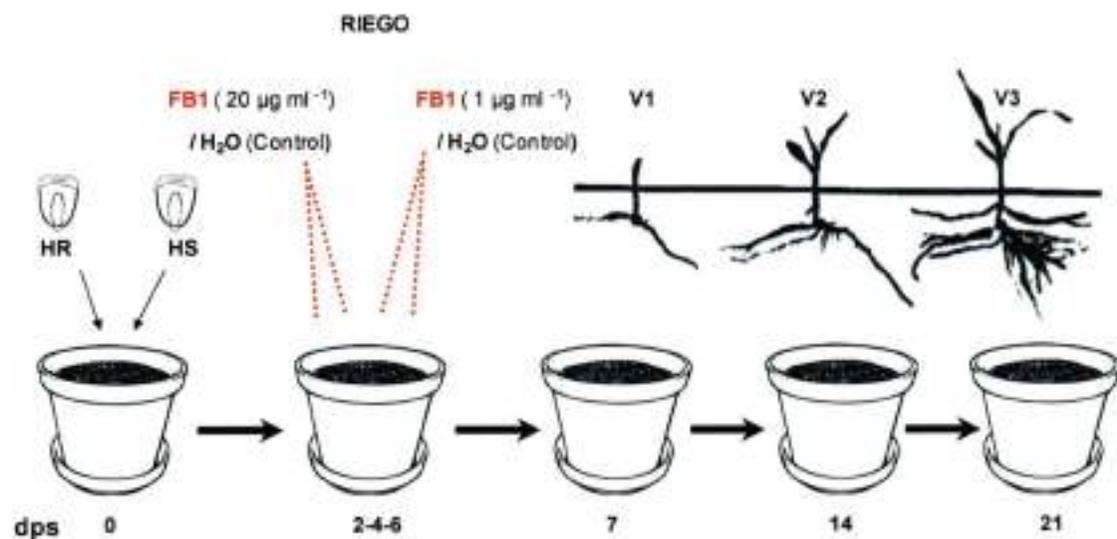


Figura 31: Modelo experimental de fitotoxicidad para el estudio de los efectos *in vivo* de FB1 sobre el híbrido resistente (HR) e híbrido susceptible (HS) de maíz.

Las semillas desinfectadas de HR y HS se sembraron en macetas conteniendo arena autoclavada y se regaron a los 2, 4 y 6 días post-siembra, con soluciones acuosas de FB1 a dos concentraciones distintas (1 y 20 ppm) o con agua destilada estéril (control). Las plántulas se cosecharon a los 7, 14 y 21 dps, cuando alcanzaron los estados vegetativos V1, V2 y V3 respectivamente. dps: días post-siembra.

3.1. Acondicionamiento e infección de las semillas

Las semillas del HR y del HS fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas durante dos minutos en una solución de 0.4% de hipoclorito, se enjuagaron tres veces con agua destilada autoclavada, y se secaron sobre papeles absorbentes estériles.

En el modelo de infección con *F. verticillioides*, la misma se realizó el día anterior a la siembra, incubando las semillas con la suspensión de conidias de *F. verticillioides* RC2024 preparada como se describe en 1.4.a. Como control se sumergieron semillas en 15 ml de buffer de fosfato estéril (PBS, pH: 7.4). La incubación se realizó a 28 °C por 18 horas. Para evaluar la eficiencia de la infección, parte de las semillas tratadas y seleccionadas al azar se desinfectaron superficialmente con 0.4% de hipoclorito (como se describió anteriormente) y se sembraron mediante la técnica de plaqueo directo en placas con medio DRBC. Se consideró que la infección había sido eficiente al observar desarrollo de colonias fúngicas características a los 5 días de incubación.

En el modelo de fitotoxicidad, las semillas fueron incubadas a 28 °C con PBS durante 18 horas.

3.2. Condiciones de siembra y cultivo de maíz

Las semillas infectadas y no infectadas fueron sembradas a 2-3 cm de profundidad, en macetas de 24 cm de diámetro conteniendo arena lavada y autoclavada dos veces, en días consecutivos. Se dispusieron 10 semillas por maceta, con 3 replicas por tratamiento y se aplicó un fertilizante soluble antes de la siembra, y dos veces por semana durante todo el período experimental, el cual fue indispensable para asegurar el desarrollo normal de las plantas en suelos carentes de nutrientes. Las macetas fueron regadas con 100 ml de agua destilada estéril (modelo de infección) a los 2, 4 y 6 días post-siembra (dps). En el modelo de fitotoxicidad los riegos también se realizaron a los 2, 4 y 6 dps, pero con 100 ml de soluciones acuosas de FB1 a dos concentraciones distintas (1µg/ml y 20µg/ml) o con agua destilada estéril (control). Luego se procedió con riegos cada 3 días con agua destilada estéril. Las macetas se colocaron en el invernadero del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC), y se mantuvieron bajo condiciones controladas tanto hídricas como de temperatura y ciclos de luz/oscuridad de 14/10 horas durante todo el período experimental.

4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD

4.1 Estudio de parámetros de desarrollo de las plántulas

Las plántulas fueron cosechadas, lavadas con agua destilada y se realizó la medición de la longitud de las raíces primarias y del tallo, donde la longitud de este último fue definido como el segmento que comienza a partir del sitio de unión de la semilla y que finaliza en el extremo distal de la 1ª hoja. Luego, se procedió a remover la semilla, y posteriormente las raíces fueron separadas cuidadosamente de la porción aérea y secadas a 60 °C en estufa por 72 horas para la determinación de la biomasa.

4.2. Evaluación macroscópica de síntomas de enfermedad

Se evaluó la incidencia de las alteraciones morfológicas y de lesiones en hojas, y se tomaron fotos de las lesiones representativas de cada grupo experimental mediante una cámara digital Sony Cyber-Shot DSC-S700 con una resolución de 7,2 megapíxeles.

5. CINÉTICA DE DISTRIBUCIÓN FÚNGICA

5.1. Aislamiento fúngico

La colonización fúngica fue evaluada semanalmente mediante aislamiento fúngico a partir de segmentos (desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito a 0,4 %) de raíz, mesocótilo, nudo, tallo y 1ª hoja, sobre medio APG. Las partes de la plántula en las cuales se visualizó crecimiento fúngico se consideraron invadidas por el hongo, tras confirmar mediante microscopía de campo claro, que se trataba de un micelio de *F. verticillioides*.

5.2. Evaluación microscópica

En forma conjunta con el aislamiento fúngico, este parámetro fue utilizado como una medida de la extensión de la infección del hongo en las plántulas. Las raíces limpias fueron clarificadas con KOH 10%. Tras eliminar el hidróxido y añadirle HCl 10% hasta que quedaran translúcidas, se tiñeron con azul de trypan al 0,05%:lactoglicerol:agua (1:1:1). Las raíces fueron decoloradas luego con la solución de lactoglicerol y montadas en la misma solución para observar al microscopio de campo claro, e identificar la presencia de hifas y evaluar la colonización radical. Para las hojas se realizó el mismo procedimiento, pero la clarificación se realizó con etanol 96% y luego se procedió con la tinción con azul de trypan. Las muestras fueron observadas con un microscopio Nikon Eclipse TE2000-U (Tokyo, Japón). Las fotos fueron tomadas con cámara Nikon DS-5 M con resolución superior a 2560–1920 pix (Captura).

6. MORFOLOGÍA RADICAL

El sistema radical fresco fue lavado con agua destilada, colocado en una bandeja con agua, y fue desplegado con la ayuda de pinzas plásticas con el fin de evitar solapamientos. Las raíces fueron inmediatamente digitalizadas individualmente en un escáner de superficie plana, HP Photosmart Scan 3110, a una resolución de 200 dpi. Se utilizó un background negro con el fin de obtener imágenes con buen contraste. Las imágenes fueron procesadas mediante el software Root Image Analyzer (USA) y se evaluaron los siguientes parámetros: longitud total de la raíz, superficie y volumen. La longitud específica de raíz (SRL) fue calculada como la relación entre la longitud total de la raíz con respecto a la masa seca. La calibración de este sistema de medición fue realizada con alambres metálicos de longitudes conocidas [125].

7. CONTENIDO DE MATERIA SECA DE HOJA

El contenido de materia seca de hoja (LDMC, *Leaves Dry Matter Content*) fue calculado como la relación entre la masa seca de hoja con respecto al peso del mismo tejido en fresco. La masa seca del tejido foliar se obtuvo por peso constante tras secado en estufa a 40 °C por aproximadamente 5 días.

8. CUANTIFICACIÓN DE FB1 Y BASES ESFINGOIDES (SA Y PSO) POR LC-MS/MS EN PLANTAS

El análisis en raíces y parte aérea, se realizó luego de pulverizar los tejidos con N₂ líquido. Se pesaron 10 mg del material vegetal liofilizado y se realizó la extracción de los metabolitos con un 1 ml de acetonitrilo:agua (1:1) + 5% de ácido fórmico. Los tubos fueron agitados brevemente con vórtex y luego se lo dejó en agitador orbital (suavemente) por 3 horas. Los extractos fueron centrifugados a 15,000 fuerza centrífuga relativa (rcf) por 15 min y luego el sobrenadante fue filtrado a través de membranas con poros de 0.22 µm.

La determinación de FB1 se realizó por cromatografía líquida acoplada a un detector de masa-masa (LC-MS/MS), según un método existente en la bibliografía [179]. El ensayo fue llevado a cabo en el equipo MicroTOFQ II (Bruker Daltonics, MA, USA), provisto de una fuente de ionización ESI operada en modo positivo con nitrógeno como gas de nebulización (1 psi) y gas de secado (4 L/min, 180 °C); capilaridad 5000 V y plate offset a 400 V. La exactitud de la masa fue verificada por infusión de formiato de sodio (10 mM, Sigma-Aldrich, Argentina) disuelto en alcohol isopropílico:agua (1:1). El HPLC fue usado para separar los compuestos de interés, por medio de una columna C18-RP (Agilent ZORBAX XDB-C18; 50x3.0 mm; 1.8 µm di.). Las muestras fueron introducidas en el HPLC por

medio de un automuestreador (Agilent HiP-ALSSL+), a un flujo de 0.3 ml/min y la fase móvil mediante una bomba binaria (Agilent 1200 SL), usando como solventes (A) agua ultra pura suplementada con ácido fórmico 0.5% y (B) acetonitrilo grado HPLC. Las transiciones medidas en el modo Multiple Reaction Monitoring (MRM) para cada metabolito fueron: FB1: 722.3>704.3, Sa: 302.2>284.3, Pso: 318.2>300.2.

9. EVALUACIÓN DE MUERTE CELULAR

Coloración con azul de Evans:

Se procedió de acuerdo a la metodología propuesta por Xing y col. [180]. Brevemente, las hojas fueron separadas del resto de la plántula y sumergidas en una solución acuosa de azul de Evans (0.1 %, p/v) e infiltradas al vacío por 5 min y luego por 10 min. Luego, las muestras fueron mantenidas en la solución del colorante por 2 horas, y se procedió al lavado de las mismas con solución buffer conteniendo 0.05% de Tween 20 (v/v). El lavado se repitió tres veces, cada uno de 15 min. Para la remoción de la clorofila, las hojas fueron colocadas en tubos Falcon con etanol al 95 % por 15 min en baño de agua a 100 °C. Las muestras fueron inmediatamente escaneadas, con un escáner HP Photosmart Scan 3110 a una resolución de 200 dpi. El precipitado azul proveniente de 50 mg del material vegetal fue solubilizado con 750 µl de 1.5 % de SDS en 50% de metanol (v/v) a 100 °C por 30 min y cuantificado por medición de la absorbancia a 595 nm.

10. CUANTIFICACIÓN DE FITOHOMONAS POR LC-MS/MS

Se cuantificaron los niveles de JA, SA, ABA y GA en la porción aérea de plantas. La extracción y purificación se realizó por el método modificado de Durgbanshi y cols. [181]. Se pesaron 200 mg de tejido previamente pulverizado con N₂ líquido y liofilizado. Se homogeneizó con agua destilada (solvente de extracción), y luego de transferir el homogenato a un tubo Falcon de 50 ml se le adicionaron 50 ng de los estándares deuterados correspondientes a JA, SA, ABA y GA. A continuación se agitó levemente con ultraturrax y se centrifugó 15 min a 5000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se ajustó el pH a 2,8-3 con ácido acético glacial al 15%. A continuación, se realizó una doble partición con éter etílico: Primero se agregaron 5 ml de éter etílico, se agitó 30 seg en vórtex, se centrifugó 1 min a 5000 rpm y se trasvasó la fase orgánica (fase superior) con pipeta Pasteur a un balón de 10 ml. Se repitió el procedimiento. El extracto orgánico obtenido fue secado luego en evaporador rotativo, a una temperatura aproximada de 33- 34 °C. Los extractos reconstituidos con 1500 µl de metanol pro-análisis 100% fueron cargados en un cartucho con filtro de celulosa acoplado a cámara de vacío



Supelco y filtrados lentamente. Al filtrado se lo recogió en tubos Eppendorf de 2 ml y se los evaporó a sequedad por medio de concentrador centrífugo (Speed Vac) a aproximadamente 35-38 °C. Se resolvió en 50 µl de metanol 100% (grado HPLC), se agitó levemente con vórtex y se colocó la muestra en viales con insertos.

La separación cromatográfica se realizó luego de inyectar 10 µl al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Alliance 2695 (Waters, Milford, MA, USA), empleando un gradiente de incremento lineal de 40 a 80% de metanol/agua/ácido acético (0.2%) en un tiempo de 25 min por corrida. Se utilizó una columna de fase reversa C18 (100 mm x 2.1 mm; 3-µm) con un flujo de corrida de 0.2 ml/min. Para la identificación y cuantificación se utilizó un espectrómetro de masa con triple cuádrupolo (Quattro Ultima pt; Micromass, Manchester, UK), acoplado al HPLC antes mencionado (LC-MS/MS). La fuente de ionización utilizada fue con electrospray (ESI) y la cuantificación se realizó en modo MRM (monitoreo de reacción múltiple) y el Software utilizado fue MassLynx TM v. 4.1, Micromass, Manchester, UK). Las transiciones medidas en el modo Multiple Reaction Monitoring (MRM) para cada metabolito fueron: JA: 209>59, (D6) JA: 215>59, SA: 137>93, (D4)SA: 141>97, ABA: 263>153, (D6)ABA: 269>159, GA3: 345 >239, (D2)GA3: 347>241. La cuantificación de las hormonas se realizó mediante las respectivas curvas de calibración con ajuste lineal, obteniéndose los resultados en pmol de hormona x gr⁻¹ de peso seco en muestras vegetales y en pmol x muestra en medio de cultivo de hongos.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el software InStat versión 3.01 (La Jolla, CA92037, USA). El análisis estadístico de los datos provenientes del estudio de toxicidad fue realizado mediante el análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) y test de comparaciones múltiples de Bonferroni, cuando los datos presentaban homogeneidad de varianza. En los casos en que esto no ocurrió, los datos se analizaron con el post-test de Kruskal-Wallis. Para los estudios de infección, la comparación entre los grupos se hizo mediante el test t de Student. En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas para p<0.05.

REFERENCIAS