



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**“Bases bioquímicas de la muerte celular inducida por
fumonisina B1 en plantas”**

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Autor: Lic. en Bioq. Clínica Santiago Nicolás Otaiza González

Director de Tesis: Prof. Dr. Martín G. Theumer

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

AÑO: 2017

Director de Tesis:

Prof. Dr. Martín G. Theumer

Comisión asesora:

Prof. Dr. Ariel Goldraj

Prof. Dra. Susana Nuñez Montoya

Prof. Dr. Héctor R. Rubinstein

Evaluador externo:

Prof. Dra. Lilia Cavaglieri

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás.

No hay dos fuegos iguales.

Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores.

Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas.

Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman;

pero otros arden la vida con tantas ganas

que no se puede mirarlos sin parpadear,

y quien se acerca, se enciende.

EDUARDO GALEANO.

Esta tesis está dedicada a Juan y a mi vieja

AGRADECIMIENTOS

A todo el CIBICI, por dejarme ser parte de un departamento donde se puede encontrar personas muy valiosas.

A mi comisión de tesis, Susana Nuñez Montoya y Ariel Goldraj, por sus aportes sumamente positivos y su predisposición en hacer un lugar en sus agendas para armar reuniones y realizar las correcciones de la tesis. A la Dra. Lilia Cavaglieri, por aceptar el compromiso de ser evaluadora externa más allá de la escasez de tiempo.

A Posgrado de la facu: Betina, Erica, Marina, Susana y Paula. Por atenderme fuera de hora y facilitarme todo el “tramiterío” que implica terminar la tesis.

A Martín Theumer, por la confianza que me depositó para encarar el proyecto. Por los consejos experimentales y profesionales, por el aguante en cuanto a actividades extra-laboratorio, por la flexibilidad que siempre tuvo para que pudiera hacer mi *rotation* de buscar a Juan al cole. Más allá de las diferencias que por ahí tuvimos, es una persona de la cual aprendí muchísimo, me ayudó a crecer profesionalmente y siempre trató de sacar más de lo que podía dar en el trabajo.

A mi lab., el 109. A mi director temporal, el Dr. Rubinstein. Por ser el filtro previo a Martín. Por su apertura en escucharme siempre que necesité un consejo. Las jefas Laura Cervi y Laura Chiapello. A Lau Gatica y Gabi Furlán. A los becarios: Vero Mary (ya casi jefa), Silvi, Pili, Vero Burstein, Dai, Lore, Leo, Cristian y Nacho que son los que me bancaron los 5 años de laburo y lo más importante: todo el proceso de escritura, con los consecuentes cambios de humor. Voy a extrañar los desayunos/meriendas de los viernes y las largas charlas y debates de los almuerzos (menos las de maquillaje).

A los laboratorios de bromato y del ISIDSA. Al Turco y la Romi, que fueron los primeros en abrirme las puertas del CIBICI, dándome la oportunidad de “agarrarle el gustito” a la investigación. Con los que siempre pude contar para consejos sobre el laburo. A Vale Amé, Vero Baroni y Magda, por permitirme formar parte del grupo más allá de estar en otro laboratorio. A Euge y Rocío, amigas de fierro que me acompañaron y me ayudaron en los momentos que necesité. A Lid, una laborante incansable que me dio mil manos y consejos que me permitieron llegar a este momento. A Chani y Andre que siempre están para levantarte el ánimo. A Nati, Marilín, Juli y Lucas. Todos excelentes personas y amigos que me acompañaron desde que arranqué en el CIBICI.

A Ramiro Lascano y Laura Saavedra, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo para hacer el posdoc y seguir haciéndome camino en la investigación. Experiencia que estoy seguro va a ser muy positiva y productiva.

A la familia. Mi mamá (“Abu Nelly”). Una mujer enorme de fortaleza. La que me ayudó muchísimo en terminar esta etapa. ¡Te quiero mucho vieja! A mis hermanos: Fede, Machi, Lucas, Pupino, Laura, Paula y Gabi. Gracias porque a pesar de las diferencias sabemos que puedo contar con uds. A mis sobrinos: Sofi, Juli, Cami, Mica, Agus, Viki, Luci, Fran y Marti. A los cuñados: Erica, Ale, Romi y Walter. A mis tíos (Kika y Gordo) y primos: Mari, Caro, Juli y Maxi.

A Emilse. Gracias por compartir las alegrías y satisfacciones que nos genera ver crecer a Juan. Por esos ratitos de más que te quedabas con él para que pudiera terminar de escribir la tesis. Ahora compañera de vida y mamá de la persona más importante.

A mis hermanos por elección: Rodrigo (el gordo), Santi, Riki, Mauro, Gabi, Fran (el Pelado) y Luciano. Los amigos de toda la vida que, aunque estén todos hechos percha, viejos y con panza, se arman juntadas que pareciera que no pasó el tiempo. Gracias por estar siempre y por las mil manos, más allá de mis “borradones” del mapa.

A los Raggiesbara: Chechelo, Wally, Chami, Mauro, el Garza, Pozito, Franco, Ale, Emi y Charly (el alma del grupo). Por esos asados con mucha cerveza de la buena. Una banda de amigos que en media hora te pueden saturar el WhatsApp con 200 de mensajes sin desperdicio.

Y finalmente, a la persona más importante: Juan. El que me acompaña cada día y me hace recordar cómo mirar, qué es lo importante en la vida. Quien, con un abrazo, un beso y un “te amo papá” o “te quiero mucho” me ilumina el día y hace que disfrute cada momento con su compañía. El que me desenchufa de la vida “adulta” con sus miles de “tres ratitos más papi” sentados en el suelo, jugando, inventando historias.

ÍNDICE

RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
1- INTRODUCCIÓN.....	1
1-1- Las micotoxinas.....	2
1-2- Las fumonisinas.....	3
1-3- Toxicidad de las fumonisinas en animales y humanos.....	4
1-4- Enfermedades del maíz.....	6
1-5- Toxicidad y mecanismos de detoxificación de fumonisinas en plantas.....	8
1-6- El estrés oxidativo en respuesta a patógenos y sus toxinas.....	10
1-7- La muerte celular en la interacción planta-patógeno.....	12
1-8- Participación de las fitohormonas en la inducción de muerte celular.....	13
2- OBJETIVOS.....	15
3- RESULTADOS.....	17
3-1- CAPÍTULO I: EFECTOS DE FUMONISINA B1 A LOS 7, 14 Y 21 DPS.....	18
3-1-1- Obtención de fumonisina B1 a partir de cultivo líquido en biorreactor....	18
3-1-2- Análisis de la producción de fumonisina B1.....	18
3-1-3- Modelo de fitotoxicidad en maceta.....	19
3-1-4- Cuantificación de la muerte celular.....	20
3-1-5- Cuantificación de H ₂ O ₂	21
3-1-6- Actividad de enzimas antioxidantes.....	22
3-1-7- Cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico.....	24
3-1-8- Cuantificación de clorofilas.....	25
3-1-9- Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	26
3-1-10- Conclusiones del Capítulo I.....	28
3-2- CAPÍTULO II: EFECTOS DE FUMONISINA B1 EN LA REPRODUCCIÓN DEL MAÍZ.....	29
3-2-1- Ensayos de germinación de granos de polen.....	29
3-2-2- Estudio de la viabilidad de los granos germinados.....	31
3-2-3- Conclusiones del Capítulo II.....	32
3-3- CAPÍTULO III: EFECTOS AGUDOS DE FUMONISINA B1.....	33
3-3-1- Modelo de fitotoxicidad en hidroponia.....	33
3-3-2- Cuantificación de la muerte celular.....	33
3-3-3- Cuantificación de H ₂ O ₂	34

3-3-4-	Actividad de enzimas antioxidantes.....	35
3-3-5-	Cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico.....	37
3-3-6-	Cuantificación de ácido salicílico.....	37
3-3-7-	Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	38
3-3-8-	Conclusiones del Capítulo III.....	41
3-4-	CAPÍTULO IV: EFECTOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SOBRE LAS VÍAS DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y ÁCIDO JASMÓNICO EN LA MUERTE INDUCIDA A TIEMPOS CORTOS POR FUMONISINA B1.....	42
3-4-1-	Cuantificación de la muerte celular.....	42
3-4-2-	Cuantificación de H ₂ O ₂	43
3-4-3-	Actividad de enzimas antioxidantes.....	44
3-4-4-	Evaluación de Fitohormonas: ácido salicílicos y ácido jasmónico.....	45
3-4-5-	Conclusiones del Capítulo IV.....	48
4-	DISCUSIÓN.....	49
4-1-	Fitotoxicidad crónica de fumonisina B1 en plantas de maíz.....	50
4-2-	Toxicidad sobre la reproducción.....	54
4-3-	Fitotoxicidad aguda en plántulas de maíz.....	56
4-4-	Efecto modulador de las especies reactivas del oxígeno sobre las vías de señalización mediada por los ácidos salicílico y jasmónico, en la muerte celular inducida a tiempos cortos por fumonisna B1.....	59
5-	MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
5-1-	MATERIALES.....	64
5-1-1-	Reactivos.....	64
5-1-2-	Medios de cultivo.....	64
5-1-3-	Soluciones.....	65
5-1-4-	Genotipos de maíz y selección de semillas.....	65
5-1-5-	Cepa fúngica.....	65
5-2-	PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FUMONISINAS.....	66
5-2-1-	Producción de fumonisinas en biorreactor.....	66
5-2-2-	Cuantificación de fumonisinas en el medio Myro fermentado.....	66
5-3-	DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	67
5-3-1-	Modelo de fitotoxicidad en maceta.....	67
5-3-2-	Modelo de fitotoxicidad en polen.....	68
5-3-3-	Modelo de fitotoxicidad en hidroponia.....	69
5-4-	MÉTODOS.....	70
5-4-1-	Cuantificación de la muerte celular.....	70
5-4-2-	Cuantificación de H ₂ O ₂	70

5-4-3-	Cuantificación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.....	71
5-4-4-	Extracción y análisis de actividades de enzimas antioxidantes.....	71
5-4-5-	Cuantificación de clorofilas.....	72
5-4-6-	Ensayos de germinación de granos de polen.....	72
5-4-7-	Estudio de la viabilidad de los granos germinados.....	73
5-4-8-	Cuantificación del ácido salicílico por HPLC-FL.....	73
5-4-9-	Cuantificación de fitohormonas por LC-MS/MS.....	74
5-5-	ANÁLISIS DE DATOS.....	74
5-5-1-	Evaluación estadística.....	74
5-5-2-	Cálculo del índice Respuesta Integrada de Biomarcadores.....	75
6-	REFERENCIAS.....	76
7-	ANEXOS.....	86
7-1-	Anexo I: tablas de funciones discriminantes y matriz de clasificación del análisis discriminante del modelo de fitotoxicidad crónica con fumonisina B1.....	87
7-2-	Anexo II: tablas de funciones discriminantes y matriz de clasificación del análisis discriminante del modelo de fitotoxicidad aguda con fumonisina B1.....	91
9-	PUBLICACIONES.....	95

RESUMEN

Fusarium verticillioides es un fitopatógeno que frecuentemente infecta al maíz y causa patologías severas como el vuelco y las podredumbres de espiga y granos, ocasionando pérdidas millonarias en la producción agrícola. La micotoxina fumonisina B1 (FB1) puede ser sintetizada por el hongo luego de la invasión de la planta. Además, puede ser absorbida por las raíces desde suelos contaminados, distribuyéndose en ambos casos a los tejidos distales de las plántulas.

El objetivo de este trabajo fue profundizar el conocimiento sobre los mecanismos de toxicidad de FB1 en maíz, para conocer su participación en la patogénesis de las infecciones por *F. verticillioides*.

El riego con FB1 (1 y 20 ppm) a los 2, 4 y 6 días post-siembra (dps) alteró los patrones de muerte celular de plántulas de maíz de híbridos susceptible (HS) y resistente (HR) a la infección por *F. verticillioides*, cultivadas en macetas hasta los 21 dps. La toxina indujo estrés oxidativo en forma dosis-dependiente, aunque los resultados sugieren que el HR detoxificaría más eficientemente las especies reactivas de oxígeno (ERO). Por otra parte, la incubación con FB1 (0 – 200 ppm, 1 hora) inhibió la germinación de granos de polen de ambos híbridos, sin afectar la viabilidad. Sin embargo, en el HR la inhibición fue completa a menores concentraciones de FB1, indicando que la toxicidad sobre la reproducción del maíz dependería de su genotipo.

Utilizando un modelo experimental con plántulas cultivadas en hidroponía se identificaron dos fases de la toxicidad aguda de FB1 en relación a la muerte celular, inhibición a las 6 horas post-tratamiento (hpt) con la toxina, y luego la inducción de la muerte a las 24 hpt. Estudios adicionales permitieron concluir que la muerte celular en ambos híbridos estuvo mediada por las ERO. El análisis de las fitohormonas ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) reveló que en el HR la muerte celular a las 24 hpt se produciría por un mecanismo dependiente de AS e independiente de AJ; mientras que en HS la muerte sería producida por una vía mediada por AJ, pero independiente de AS.

Los resultados de este trabajo muestran que FB1 es un factor que puede contribuir a la patogénesis de las infecciones del maíz por *F. verticillioides*, induciendo muerte celular como consecuencia del estrés oxidativo, por mecanismos mediados por AS y AJ. Desde otro enfoque, la FB1 que contamina los suelos puede debilitar a las plantas de maíz aumentando su susceptibilidad a patógenos. Además, independientemente de la fuente de FB1 (infección o absorción desde el suelo), la micotoxina alteraría la reproducción de maíz inhibiendo la germinación de los granos de polen, sin descartar otros posibles mecanismos.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is a phytopathogen that frequently infects corn and causes severe pathologies such as overturning and rotting of spikes and grains, causing millionary losses in agricultural production. The mycotoxin fumonisin B1 (FB1) can be synthesized by the fungus after plant invasion. In addition, it can be absorbed by the roots from contaminated soils, reaching in both cases to the distal tissues of the seedlings.

The aim of this work was to improve the knowledge about the toxicity mechanisms of FB1 in corn, to elucidate its participation in the pathogenesis of *F. verticillioides* infections.

The watering with FB1 (1 and 20 ppm) at 1, 2, 4 and 6 days after planting (dap) altered the cell death patterns of maize seedlings from hybrids susceptible (SH) and resistant (RH) to *F. verticillioides* infection, grown in pots up to 21 dap. The toxin induced oxidative stress in a dose-dependent manner, although the results suggest that RH detoxifies reactive oxygen species (ROS) more efficiently. On other hand, incubation with FB1 (0-200 ppm, 1 hour) inhibited the germination of pollen grains of both hybrids, without affecting the viability. However, in the RH the inhibition was complete at lower concentrations of FB1, indicating that the toxicity in maize reproduction would depend on its genotype.

Using an experimental model with hydroponic-grown seedlings, two phases of the FB1 acute toxicity were identified in relation to cell death; inhibition at 6 hours post-treatment (hpt) with the toxin, and then the induction of death at 24 hpt. Further studies led to the conclusion that cell death in both hybrids was mediated by ROS. The study of the phytohormones salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) revealed that in the HR the cell death at 24 hpt would occur by an SA-dependent and JA-independent mechanism; while in SH the death would be produced by a JA-mediated pathway independent of SA.

The results of this work show that FB1 can contribute to the pathogenesis of maize infections by *F. verticillioides*, inducing cell death as a consequence of oxidative stress, by mechanisms mediated by SA and JA. From another approach, soil-polluting FB1 can weaken maize plants by increasing susceptibility to pathogens. Moreover, regardless of the source of FB1 (infection or absorption from the soil), the mycotoxin would alter the maize reproduction by inhibiting the germination of pollen grains, although other possible mechanisms are not discarded.

ABREVIATURAS

AA:	Ácido ascórbico
ABA:	Ácido abscísico (del inglés <i>abscisic acid</i>)
Abs:	Absorbancia
AD:	Análisis discriminante
AG:	Ácido Giberélico
AJ:	Ácido Jasmónico
APX:	Ascorbato peroxidasas
AS:	Ácido salicílico
CAT:	Catalasa
CE:	Conductividad electrolítica
CS:	Ceramida sintetasas
DHAR:	Dehidroascorbato reductasa
DO:	Densidad óptica
dps:	Días post-siembra
DRBC:	Diclorán rosa de bengala cloranfenicol
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
ET:	Etileno
FAO/WHO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FB:	Fumonisinias de la serie B
FB1:	Fumonisinina B1
FB2:	Fumonisinina B2
FB3:	Fumonisinina B3
FB4:	Fumonisinina B4
FH:	Fitohormonas.
FUM 1/2/3:	Genes relacionados a la síntesis de fumonisinias
GEA:	Guía Estratégica para el Agro
GPOX:	Guaiacol peroxidasas
GPX:	Glutación peroxidasas
GR:	Glutación reductasa
GSH:	glutación reducido
HR:	Híbrido resistente a la infección por <i>Fusarium verticillioides</i>
HS:	Híbrido susceptible a la infección por <i>Fusarium verticillioides</i>
hpt:	Horas post-tratamiento

IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (del inglés <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LCB:	Bases de cadena larga (del inglés <i>long chain bases</i>)
LEME:	Leucoencefalomalacia equina
MCP:	Muerte celular programada
MDHAR:	Monodehidroascorbato reductasa
MG:	Medio de germinación
MPK6:	Proteína quinasas activadas por mitógenos 6 (del inglés <i>mitogen-activated protein kinase 6</i>)
MTT:	2,5-difenil tetrazolio bromuro
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBT:	Nitroazul de tetrazolio
PAL:	Fenilalanina amonía-liasa (del inglés <i>phenylalanine ammonia lyase</i>)
PKS:	Enzima policétido sintasa (del inglés <i>polyketide synthases</i>)
PR:	Genes relacionados a la patogénesis (del inglés <i>pathogenesis related genes</i>)
PRX:	Peroxiredoxinas
Pso:	Fitoesfingosina
Pso-1-P:	Fitoesfingosina 1- fosfato
RH:	Respuesta Hipersensible.
RIB:	Respuesta integrada de biomarcadores
RSA:	Resistencia sistémica adquirida
Sa:	Esfinganina
Sa-1-P:	Esfinganina 1- fosfato
So:	Esfingosina
SOD:	Superóxido dismutasas
TBA:	Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS:	Sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (del inglés <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA:	Ácido tricloroacético
TEP:	1,1,3,3-tertrametóxipropano

1- INTRODUCCIÓN

1-1- Las micotoxinas.

Las micotoxinas son productos naturales de bajo peso molecular, sintetizados por el metabolismo secundario de algunos hongos filamentosos, cuando el micelio se encuentra con limitación de algunos nutrientes, pero con disponibilidad de fuentes carbonadas. Estos compuestos se biosintetizan a partir de metabolitos primarios, principalmente cuando el desarrollo del micelio se encuentra detenido en la fase estacionaria de crecimiento. Las micotoxinas no intervienen en el desarrollo del moho y, en la mayoría de los casos, carecen de funciones fisiológicas conocidas para el hongo productor, pero se cree que tienen un papel fundamental en la eliminación de otros microorganismos que compiten por el mismo sustrato (Sorenson, 1993).

Hasta el momento, se han aislado y caracterizado químicamente más de cuatrocientas micotoxinas, las cuales son producidas principalmente por cuatro géneros fúngicos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*. A su vez, una misma cepa toxicogénica puede producir diferentes micotoxinas y una determinada micotoxina puede ser sintetizada por diferentes géneros fúngicos. Sin embargo, no todas las especies incluidas dentro de estos géneros tienen la capacidad de producir micotoxinas y, además, dentro de un mismo género y especie de hongo productor de micotoxinas, hay cepas con distinta capacidad toxicogénica. Estas toxinas ocasionan pérdidas anuales de millones de dólares en el mundo por la desvalorización de los productos agrícolas, afectando el comercio nacional e internacional y por los gastos generados en la salud pública (Richard, 2007). Las aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, toxinas tremorgénicas y los alcaloides del cornezuelo de centeno tienen la mayor importancia en la salud pública y en la actividad agronómica. Otro grupo de micotoxinas denominadas emergentes, han cobrado un creciente interés en el último tiempo, principalmente la fusaproliferina, beauvericina, enniatinas y moniliformina.

La invasión fúngica de los cultivos o de los granos almacenados genera preocupación debido a la posible contaminación de las materias primas con micotoxinas y al riesgo toxicológico asociado. Luego de su síntesis, los tratamientos tecnológicos a los que se someten los alimentos no logran eliminarlas eficientemente lo que provoca que entren en las cadenas alimentarias de humanos y animales.

En cuanto a los límites máximos de micotoxinas permitidos en los alimentos, en la Argentina sólo existe legislación para las aflatoxinas totales; ésta especifica los límites máximos para maní, maíz y sus derivados, y para la aflatoxina M1 en leche (fluida y en polvo) (Código alimentario argentino). Debido a la falta de reglamentaciones para las restantes micotoxinas, en nuestro país se consideran los límites impuestos por la legislación de la Comunidad Europea. Por lo tanto, sería importante establecer valores máximos de tolerancia para las fumonisinas en materias primas y alimentos elaborados, debido a que ha sido detectada en alto porcentaje en maíz analizado en los últimos años en la

Argentina (Castellari *et al.*, 2015). Esta micotoxina podría generar problemas para la comercialización e industrialización de los granos, ya sea para consumo animal o humano.

1-2- Las fumonisinas.

En 1988, Gelderblom y cols. describieron que las fumonisinas, una nueva clase de micotoxinas identificadas a partir de cultivos de *Fusarium moniliforme* (actualmente *F. verticillioides*), poseían actividad promotora de cáncer (Gelderblom *et al.*, 1988). 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 tricarbónicos en diferentes posiciones a lo largo del esqueleto carbonado (Proctor *et al.*, 1999) (Figura 1). 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 (Musser, 1996; Rheeder *et al.*, 2002). Las fumonisinas de la serie B (FB) son las más abundantes en maíz contaminado de manera natural (Nelson *et al.*, 1983). En función de la presencia o ausencia de grupos hidroxilo en los carbonos 5 y 10 se distinguen las cuatro fumonisinas de esta serie: FB1, FB2, FB3 y FB4 (Proctor *et al.*, 1999). 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 (Nelson *et al.*, 1983). Las otras fumonisinas de la serie B, especialmente FB2 y la FB3, aparecen en niveles más bajos, constituyendo hasta el 10 – 20 % del contenido total de fumonisinas, respectivamente (Musser, 1996).

El gen FUM1 fue el primer gen descrito relacionado con la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*. Codifica para la enzima policétido sintasa (PKS), la cual 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 a partir de un derivado del acetato (Proctor *et al.*, 1999). Las PKSs están presentes en hongos, bacterias y plantas donde producen 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 (Desjardins and Proctor, 2007; Proctor *et al.*, 1999). La importancia del descubrimiento de este gen radica en que al ser interrumpido se observa que no se producen las fumonisinas.

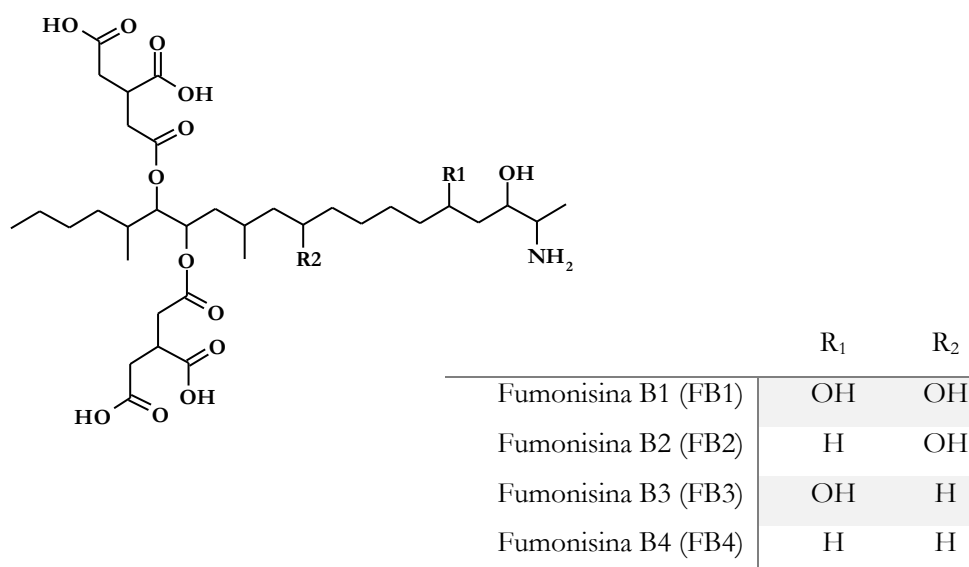


Figura 1. Estructura química de las principales fumonisinas del grupo B (FB).

Investigaciones posteriores establecieron que los genes relacionados con la síntesis de las fumonisinas se encuentran juntos, organizados en un *cluster* que consta de 42 kilobases (Desjardins and Proctor, 2007). Los genes FUM2 y FUM3 confieren la capacidad de hidroxilar la cadena de la molécula en las posiciones C-10 y C-5, respectivamente (Desjardins *et al.*, 1996). 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.

1-3- Toxicidad de las fumonisinas en animales y humanos

Las micotoxinas producidas por algunas especies de *Fusarium* tienen gran relevancia en el sector agrícola y alimentario, debido a que el consumo de alimentos contaminados con estas micotoxinas ha sido asociado a cuadros de toxicidad celular, efectos sobre el crecimiento y el desarrollo de animales, e incluso cáncer en humanos y animales domésticos (Marasas, 1995). Desde 1850, se han descrito muchos casos de intoxicaciones del ganado por consumo de piensos enmohecidos, lo que en ese entonces se denominó “envenenamiento del forraje”. Un trabajo realizado por Sheldon (1904) fue el que asoció a *F. moniliforme* (hoy *F. verticillioides*) como responsable de esa intoxicación. La manifestación más drástica de la intoxicación es una patología conocida como leucoencefalomalacia equina (LEME), que se caracteriza porque causa la muerte del animal en el término de unas pocas horas a una semana (Marasas, 1995). Posteriormente, un grupo de investigadores de Sudáfrica que aislaron y caracterizaron las fumonisinas, demostraron que la FB1 por sí sola, lograba reproducir la LEME en caballos (Marasas *et al.*, 1988). Estos animales resultaron ser los más sensibles a las fumonisinas, ya que el consumo de alimentos contaminados con dosis de 8 ppm de FB1 es suficiente

para desarrollar síntomas relacionados con LEME (Wilson, 1992). Luego, 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 (Harrison *et al.*, 1990). 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 (Marasas *et al.*, 2004; Theumer *et al.*, 2002).

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 la enzima ceramida sintetasa (CS), la cual es clave en el metabolismo de esfingolípidos. En el otro mecanismo, una variación en las proporciones de ácidos grasos y fosfolípidos celulares inducirían cambios en la síntesis de eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos y otros derivados oxigenados. La disrupción del metabolismo de esfingolípidos produce 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. Además, varios estudios indican que FB1 induce cambios en enzimas involucradas en la regulación del ciclo celular, diferenciación y apoptosis (Mobio *et al.*, 2000; Pinelli *et al.*, 1999).

Los problemas en la salud humana y animal relacionados con las fumonisinas son, en su mayoría, debido al consumo de maíz o alimentos derivados contaminados. La exposición a fumonisinas se ha relacionado con una alta incidencia de cáncer esofágico en poblaciones de África (Sydenham *et al.*, 1990), China (Chu and Li, 1994) e Italia (Doko and Visconti, 1994). En estos estudios se han encontrado concentraciones relativamente altas de fumonisinas (más de 75 ppm). Por otro lado, en la Argentina, Castellari y cols. (2015) reportaron la presencia de fumonisinas en muestras de maíz almacenadas en silos bolsa. En regiones donde la dieta de la población está sustentada a base de maíz, es muy importante el nivel de contaminación de los productos agrícolas y sus subproductos, debido a que el nivel de ingesta diaria de micotoxina puede ser superior a los límites máximos establecidos. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/WHO) asigna una ingesta tolerable máxima de 2 µg/kg de peso corporal para FB1, FB2 y FB3, solas o en combinación (IPCS-WHO, 2000). Por otro lado, La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) clasificó a las fumonisinas como compuestos probablemente carcinogénicos para humanos (grupo 2B) (IARC, 1993).

1-4- Enfermedades del maíz.

El maíz (*Zea mays L.*) es una de las materias primas más importantes del mundo actual, debido a que es un sustento de la producción animal y es clave en la industria de los alimentos. Además, se convirtió en los últimos años en un insumo principal para producción de biocombustibles como el etanol, biogás y biodiesel; y también ocupa un lugar esencial en la fabricación de materiales biodegradables como los bioplásticos. Todo esto trae como ventaja que los países generen menor cantidad de excedentes y así, aprovechan al máximo las materias primas agropecuarias.

Según la estimación de la Guía Estratégica para el Agro (GEA) publicada por la Bolsa de Cereales de Rosario, la producción de la campaña 2016/17 de la cosecha de maíz será de 35,5 millones de toneladas, lo que significa un crecimiento de un 18 % en relación a la de la campaña 2015/16. Asimismo, Córdoba es la provincia donde se registra mayor producción de maíz en Argentina, le siguen Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe y La Pampa.

Con respecto a las enfermedades foliares del cultivo de maíz en la zona núcleo maicera, el “Mal de Río IV” es una de las enfermedades virales más características de nuestro país y es transmitido de una planta enferma a una sana por un insecto vector llamado *Delphacodes kuschelli*. Por otro lado, entre las enfermedades fúngicas más características se encuentran la “roya” común (*Puccinia sorghi*) y el “tizón foliar” (*Exserohilum turcicum*) que se presentan todos los años con diferentes niveles de severidad según las condiciones climáticas, el material genético sembrado y los biotipos de los patógenos presentes. Asimismo, *F. verticillioides* es una de las especies fúngicas que con mayor frecuencia contamina el maíz en todo el mundo, y en donde pasa la mayor parte de su ciclo de vida. Este hongo ataca todos los estados de crecimiento de la planta y a diferentes partes de la misma, induciendo enfermedades pre y post-cosecha que afectan 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”, 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 (Carmona *et al.*, 2008). 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 (Carmona *et al.*, 2008; Laguna *et al.*, 2010). 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 (Laguna *et al.*, 2010). Por lo tanto, 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.

En las infecciones 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 (Clements *et al.*, 2004; Presello *et al.*, 2006; Presello *et al.*, 2009). Sin embargo, en la actualidad, tanto híbridos de maíces comerciales como líneas endogámicas no alcanzan el nivel de resistencia deseada (Lanubile *et al.*, 2011; Munkvold, 2003).

Presello y cols. (2006) evaluaron la resistencia a *F. verticillioides* y *F. graminearum* en híbridos argentinos cultivados 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 (Desjardins and Proctor, 2007). 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 (Clements *et al.*, 2004; Nankam and Pataky, 1996).

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 (Ding *et al.*, 2011; Leslie, 1995; Trusov *et al.*, 2013). Este tipo de hongos, 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 el tejido de la planta y continúan su ciclo como saprófito, incluyendo generalmente la esporulación.

Muchos patógenos emplean una serie de estrategias para debilitar o matar a la planta con el fin de obtener acceso a los nutrientes, y varios "efectores" podrían estar involucrados en el proceso de

infección y establecimiento de una interacción parasitaria hongo-planta (factor de virulencia o toxina). Además, estas moléculas efectoras pueden desencadenar respuestas de defensa (factores de avirulencia o desencadenantes). Se han descrito muchos factores proteicos en los procesos patogénicos, como las enzimas degradantes de las paredes celulares (cutinasas, enzimas hidrolíticas, etc.) y las proteínas efectoras de la patogenicidad que pueden ser transferidas a las células del hospedador por el haustorio (estructura especializada para absorber nutrientes y agua del hospedador) durante la infección (Kamoun, 2006). Sin embargo, no se limitan a polipéptidos, sino que también incluyen metabolitos secundarios tales como fitotoxinas, que a menudo participan en los mecanismos de virulencia y patogenicidad.

Las plantas cuentan con mecanismos de defensa pasivos y activos para defenderse del ataque por patógenos. Los mecanismos de defensa pasivos o preexistentes implican barreras estructurales o reservorios estratégicamente posicionados de compuestos antimicrobianos que previenen la colonización del tejido. Por otro lado, las respuestas de defensa activas requieren de la síntesis *de novo* de proteínas, las cuales son reguladas a través de un complejo e interconectado universo de mecanismos que involucran fitohormonas como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno, que resulta en la síntesis de proteínas relacionadas con la defensa. Las vías de transducción de señales inducidas por microorganismos o elicitores, conducen a (i) engrosamiento de la pared celular y lignificación, (ii) la producción de metabolitos antimicrobianos (fitoalexinas), y (iii) la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN). Estas últimas (ERO y ERN) están involucradas en la activación de mecanismos de respuesta hipersensible (RH), un tipo de muerte celular programada desarrollada en el sitio de infección con el objetivo de limitar el avance del patógeno. La eficacia de estas respuestas de defensa determinaría si las plantas son susceptibles o resistentes a la infección por el patógeno (Almagro *et al.*, 2008).

1-5- Toxicidad y mecanismos de detoxificación de fumonisinas en plantas.

Arias y cols. (2016) demostraron que las fumonisinas, además de ser producidas durante la infección por *Fusarium verticillioides*, pueden ser absorbidas desde suelos contaminados y en ambos casos ejercer toxicidad en el maíz. La FB1 es estructuralmente similar a la esfinganina (Sa), por lo tanto, la micotoxina produce una inhibición competitiva de la enzima CS y como consecuencia, la disrupción del metabolismo de lípidos celulares (Figura 2) (Abbas *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 1994; Doko and Visconti, 1994). Esto produce el bloqueo de la síntesis de esfingolípidos complejos y la acumulación de las bases esfingoides libres y sus derivados fosforilados, los cuales son compuestos bioactivos y reguladores clave de la muerte celular programada (MCP). En nuestro laboratorio se demostró que el desbalance lipídico inducido por FB1 en plántulas de maíz es dependiente de su susceptibilidad o resistencia a la infección por *Fusarium* spp. En este sentido, Sa y Pso fueron los

metabolitos que aumentaron en plántulas de híbridos resistentes (HR) y susceptibles (HS) a la infección por *F. verticillioides* expuestos a la toxina, respectivamente. Estos resultados sugieren la existencia de al menos dos isoformas de CS en maíz, con distinta especificidad de sustratos y diferente expresión luego de la exposición a FB1, lo cual podría estar relacionada a la susceptibilidad/resistencia de los híbridos (Arias *et al.*, 2016). En *Arabidopsis* spp., FB1 produce una MCP que se asemeja a la RH, constituyendo un mecanismo de defensa de la planta que disparan las células en el sitio de infección con el patógeno. Además, esta respuesta incluye la acumulación de ERO, depósitos de calosa e inducción dosis-dependiente de genes relacionados a la defensa. La RH es una defensa efectiva de la planta contra patógenos biótrofos, los cuales obtienen los nutrientes del hospedador vivo, pero no lo es para patógenos necrótrofos que se benefician del tejido muerto (Glazebrook, 2005). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la FB1 induce acumulación de ERO, las cuales producen una alteración en el funcionamiento de los cloroplastos junto con la acumulación de ácido salicílico (AS), desencadenando en muerte celular (Xing *et al.*, 2013). Asimismo, se ha descrito que en los procesos de muerte celular inducidos por FB1 están interconectadas vías que involucran la activación de MPK6 (*mitogen-activated protein kinase 6*), aumento de las concentraciones de calcio y la generación de ERO (Saucedo-García *et al.*, 2011b). Debido a que la FB1 es una micotoxina producida principalmente por *F. verticillioides*, el cual es un patógeno que infecta frecuentemente maíz, es importante determinar en esta planta los mecanismos involucrados en la muerte celular inducida por la toxina y evaluar la participación de las ERO en la modulación de mecanismos específicos que llevan a la MCP.

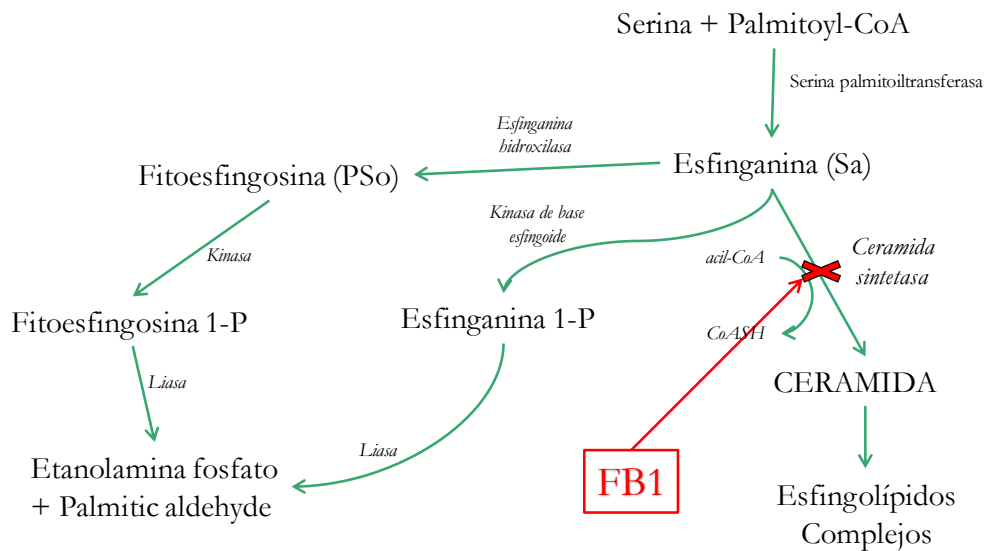


Figura 2. Biosíntesis *de novo* de las bases esfingoides en plantas. Se muestra el punto de disrupción por FB1. Adaptado de Williams y cols. (2007)

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) (Berthiller *et al.*, 2009; Coleman *et al.*, 1997). 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 (Berthiller *et al.*, 2013).

1-6- El estrés oxidativo en respuesta a patógenos y sus toxinas.

Las plantas están sometidas constantemente a cambios ambientales, lo cual provoca alteraciones en su metabolismo tendientes a mantener el balance entre la producción y consumo de energía. Este balance depende de la coordinación de tres procesos críticos para la vida de la planta: fotosíntesis, respiración oscura y foto-respiración. Estos procesos tienen en común la generación de ERO, las cuales se producen como parte del metabolismo aeróbico normal. Los cloroplastos son la principal fuente de ERO intracelular, donde hasta un 30 % del flujo de electrones fotosintéticos puede ser conducido al oxígeno (O_2), en situaciones que provocan un exceso de energía de excitación (Asada, 1999). La cadena respiratoria de las mitocondrias y los peroxisomas son otra fuente de generación de ERO intracelular. Por otro lado, a nivel apoplástico la fuente principal de ERO es el complejo NADPH oxidasa de membrana plasmática, que genera radical superóxido a expensas de NADPH citoplásmico (Sagi *et al.*, 2004).

El término ERO se utiliza para describir la forma del oxígeno que es energéticamente más reactivo que el oxígeno molecular (O_2). Las ERO (también llamadas especies activas del oxígeno, EAO, o intermediarios reactivos del oxígeno, IRO) son especies moleculares que fueron sometidas a la adición de electrones y por lo tanto son formas reducidas del oxígeno. Las ERO incluye dos especies de radicales libres, el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y su forma protonada el radical perhidroxilo (OH_2^{\bullet}); la especie no radicalaria peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el altamente reactivo radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Figura3). También incluye el oxígeno singlete (1O_2) que es generado por fotoexcitación de la clorofila. Situaciones donde la planta es sometida a un estrés ambiental severo, ya

sea de origen biótico o abiótico y en tejidos senescentes, incrementan marcadamente los niveles de ERO, excediendo las capacidades de detoxificación. Las ERO son altamente inestables y reactivas por lo que, su exceso provoca daños en los componentes celulares (lípidos, proteína y ADN), constituyendo lo que se conoce como estrés oxidativo (Foyer and Noctor, 2008; 2011).

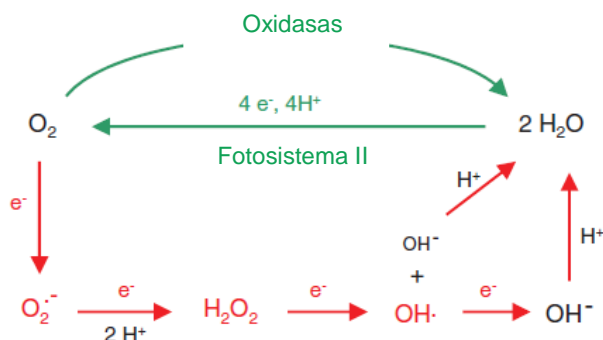


Figura 3. Principales vías de interconversión entre las distintas especies reactivas del oxígeno
Adaptado de Foyer y Noctor (2011).

La capacidad de las plantas de controlar los niveles de las ERO generadas en diferentes condiciones ambientales, depende de la actividad de su sistema antioxidante. El mismo está compuesto por: a) antioxidantes no enzimáticos como ácido ascórbico (AA), glutatión reducido (GSH), carotenoides, α -tocoferol, etc. y b) enzimas como superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), ascorbato peroxidasas (APX), glutatión peroxidasas (GPX), guaiacol peroxidasas (GPOX), peroxiredoxinas (PRX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). A nivel de cloroplastos, donde no se encuentra actividad catalasa, el sistema antioxidante se organiza en un ciclo basado sobre AA y glutatión, denominado ciclo de Asada-Halliwell (Asada, 1999; Mullineaux P, 2002).

En los últimos años, el concepto de las ERO ha cambiado porque además de ser consideradas moléculas tóxicas para la célula, se ha demostrado que tienen funciones relevantes como moléculas señales participando en mecanismos importantes para la biología de la planta. En este sentido, a bajas concentraciones modulan procesos de crecimiento y desarrollo, interacción con microorganismos y respuestas de defensa local y sistémica (Foyer and Noctor, 2011). La relación entre generación/degradación de las ERO y el estado redox de las cadenas de transporte de electrones fotosintéticos y respiratorios, son algunos de los determinantes principales del estado redox celular. Conjuntamente, tiene una función clave en procesos como la percepción de las condiciones ambientales, la modulación del desarrollo, las respuestas de defensa y aclimatación a estrés abiótico,

la interacción con microorganismos simbioses o patógenos y las repuestas hipersensibles, sistémicas adquiridas y sistémicas inducidas (Foyer and Noctor, 2011).

El estrés oxidativo generado por las ERO en la planta puede determinarse utilizando biomarcadores. Estas son sustancias bioindicadoras de un estado biológico determinados. Dentro de los biomarcadores de estrés podemos encontrar a las ERO, moléculas indicadoras de daño en biomoléculas, los componentes antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), indicadores de muerte celular, fitohormonas, entre otras sustancias que correlacionan o vinculan causalmente al estrés biótico o abiótico inducido en la planta (Brain and Cedergreen, 2009).

1-7- La muerte celular en la interacción planta-patógeno.

Toda célula de la planta tiene la capacidad de morir cuando sea necesario. La MCP es un mecanismo que utiliza la planta para crecer, desarrollarse y adaptarse a cambios ambientales. Debido a que las plantas son carentes de circulación y de sistema inmune adaptativo, cada célula tiene la capacidad de detectar un amplio rango de microorganismos extraños y, de ser necesario, sacrificarse ella misma y las células cercanas para evitar el avance del patógeno y lograr el beneficio de toda la planta (Dauphinee and Gunawardena, 2015).

Para la clasificación de la muerte celular en plantas se utilizan criterios morfológicos. Inicialmente se basaron en los sistemas animales, donde se definieron tres tipos 1) MCP Tipo I o Apoptosis, 2) MCP Tipo II o Autofagia y 3) Necrosis. En plantas, se considera que no hay apoptosis debido a que no contienen determinantes claves como proteínas pro-apoptóticas y caspasas (cisteinil-aspartato proteasas). Además, las paredes celulares rígidas impiden la formación de los cuerpos apoptóticos y no hay células fagocíticas. Sin embargo, se pueden encontrar algunos marcadores como condensación y fragmentación de cromatina y salida de citocromo c mitocondrial. Actualmente, la muerte celular en plantas puede clasificarse como i) eventos ordenados de suicidio celular dependientes de energía y de integridad de membranas que se asemejan a mecanismos de muerte autofágicos y ii) mecanismos no ordenados que no requieren energía ni integridad de membranas semejantes a procesos necróticos (van Doorn *et al.*, 2011). La MCP u ordenada participa en el desarrollo, la senescencia y la respuesta a estrés biótico y abiótico. En las respuestas a condiciones de estrés biótico y abiótico están involucradas tanto la MCP como la necrótica y que la inducción de muerte sea de un tipo u otro dependerá de la intensidad del estrés al cual se somete a una célula, un órgano o un individuo (Jiménez *et al.*, 2009; Mur *et al.*, 2007).

1-8- Participación de las fitohormonas en la inducción de muerte celular.

Las plantas regulan su crecimiento y desarrollo en respuesta a estímulos internos y externos. Las fitohormonas son un grupo de moléculas de señalización que se encuentran en pequeñas cantidades en las células de la planta y median dicha respuesta. Tienen un rol fundamental en procesos de aclimatación en respuesta a los cambios ambientales constantes promoviendo el crecimiento, desarrollo, reparto y reasignación de nutrientes. Pueden actuar en el sitio de síntesis o en otras partes de la planta mediante su transporte. A su vez, son importantes en la respuesta al estrés debido a que modulan respuestas fisiológicas y moleculares, lo cual es fundamental para la supervivencia de la planta como organismo sésil. Las principales fitohormonas son el AS, AJ, etileno (ET), ácido abscísico (ABA), auxinas, citoquininas y ácido giberélico (AG).

El AS es un compuesto fenólico natural involucrado en la defensa de la planta en respuesta al ataque por patógenos. Tiene un rol fundamental en la regulación del crecimiento, madurez y desarrollo de la planta, como así también en respuesta a estrés. La síntesis de AS ocurre por medio de dos mecanismos: la vía del isocorismato y la de la fenilalanina amonía-liasa (PAL, phenylalanine ammonia-lyase) (Shabir H. Wani, 2016). Tras la infección por un patógeno, los niveles de AS de la planta aumentan. A su vez la aplicación exógena de la fitohormona, induce la activación de genes relacionados a la patogénesis (PR, *pathogenesis related genes*), lo que genera la resistencia a un rango amplio de patógenos (Bari and Jones, 2009). En cuanto a la relación con las ERO hay reportes contradictorios. Mientras que Xing y cols. (2013) sugieren que las ERO inducen la síntesis de AS, Van Camp y cols. (1998) muestran que la acumulación de AS potencia la generación de las ERO. Sin embargo, mutantes deficientes en AS muestran que la señalización redox se produce independientemente de AS (Grant and Jones, 2009), lo que sugiere diferencias en la interacción ERO-AS.

El AJ o jasmonatos son moléculas que pertenecen al grupo de la oxilipinas y son sintetizadas a partir del ácido α -linolénico. Están implicadas en diversos procesos asociados con el desarrollo y supervivencia de la planta, incluyendo la reproducción, floración, fructificación, senescencia, metabolismo secundario y la señalización al estrés de tipo biótico y abiótico (Shabir H. Wani, 2016). El AJ es un regulador esencial de la defensa frente a patógenos necrótrofos, pero también está implicado en la resistencia sistémica adquirida. El AJ estaría involucrado en la contención de la propagación de la lesión dependiente de las ERO (Overmyer *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, la vía de señalización del AJ es inhibida por FB1 para iniciar la MCP (Zhang *et al.*, 2015).

El ET es una hormona volátil implicada en diferentes funciones de la planta desde germinación a dormancia, madurez y senescencia, la regulación del cierre de estomas, como así también en respuestas a estrés biótico y abiótico (Bartoli *et al.*, 2013). Se ha sugerido que esta fitohormona es un regulador positivo de la producción de ERO y muerte celular, debido a que aumenta la producción

de H₂O₂ en las células de la planta que están destinadas a procesos de MCP (Bartoli *et al.*, 2013; Overmyer *et al.*, 2003).

En la MCP de tipo RH, la propagación de la lesión está bajo control hormonal. Las diferentes fitohormonas y sus interacciones regulan la producción de las ERO y la capacidad de la célula para percibir y reaccionar a las señales mediadas por los intermediarios (Figura 4). La acción de las ERO es amplificada y la muerte celular es inducida a través de la acumulación de AS en el sitio de iniciación del estrés. Durante el período inicial de la muerte celular, la señal mediada por AJ es suprimida por AS y etileno. A su vez, se genera un aumento de la producción de ET en las células circundantes lo cual induce la activación de mecanismos de MCP. Asimismo, se produce activamente O₂^{•-} en el sitio de iniciación del estrés y luego, durante la propagación de la muerte celular, en las células vecinas antes de la difusión de la muerte celular. Así, O₂^{•-} y ET actuarían como propagadores del estrés hacia las células circundantes. Finalmente, la muerte celular se resuelve cuando aumentan los niveles de AJ, la cual es una fitohormona que antagoniza el desarrollo de la lesión, por ejemplo, a través de la inhibición de la síntesis de AS. Paralelamente, el AJ atenúa la sensibilidad celular al ET, lo cual contribuye a detener la propagación de la muerte celular (Overmyer *et al.*, 2003).

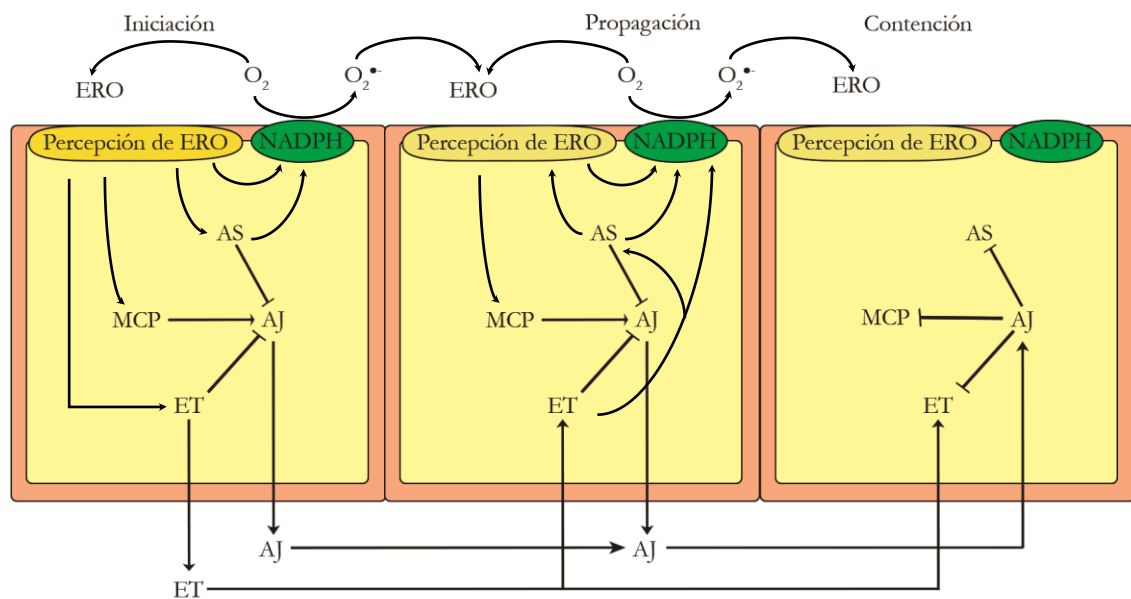


Figura 4. Interacción de las ERO con las fitohormonas en la muerte celular programada. Adaptado de Overmyer y cols. (2003).

2- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Profundizar el conocimiento sobre los mecanismos de toxicidad de FB1 en maíz, para conocer su participación en la patogénesis de las infecciones por *Fusarium verticillioides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar la muerte celular y el estado oxidativo hasta 21 días de la exposición a FB1 en plantas de maíz de híbridos susceptible y resistente a la infección por *F. verticillioides*.
- 2) Identificar efectos tóxicos de la FB1 sobre la reproducción de maíz.
- 3) Estudiar la fitotoxicidad aguda de FB1 en plántulas de maíz, con enfoque en la muerte celular y el estado oxidativo.
- 4) Evaluar los efectos moduladores de las ERO sobre las vías de señalización mediadas por los ácidos salicílico y jasmónico, en la muerte celular inducida a tiempos cortos por FB1.

3- RESULTADOS

3-1- CAPÍTULO I: EFECTOS FITOTÓXICOS DE FB1 EN PLANTAS DE MAÍZ DE HÍBRIDOS SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A LA INFECCIÓN POR *F. verticillioides*: MUERTE CELULAR Y ESTADO OXIDATIVO A LOS 7, 14 Y 21 DÍAS POST-SIEMBRA.

3-1-1- Obtención de FB1 a partir de cultivo líquido en biorreactor.

La FB1 requerida para el tratamiento de las plántulas de maíz fue producida en biorreactor (Fig. 5), como se describe en los Materiales y Métodos.



Figura 5. Producción de FB1 en biorreactor a partir de la cepa R2024 de *F. verticillioides*.

3-1-2- Análisis de la producción de FB1.

Se determinaron las concentraciones de las FB1, FB2 y FB3 en el medio Myro fermentado durante 28 días, mediante HPLC con detección de fluorescencia (HPLC-FL). En la Figura 6 se muestra un cromatograma representativo en el que se observan los picos de las 3 fumonisinas mencionadas anteriormente. La concentración promedio de FB1 producida en las fermentaciones realizadas en este trabajo fue de 40 ppm (n=5). Los caldos de cultivo fermentados se diluyeron con agua destilada a los fines de obtener las soluciones con 1 y 20 ppm de FB1, las que fueron utilizadas para el riego de las plántulas de maíz.

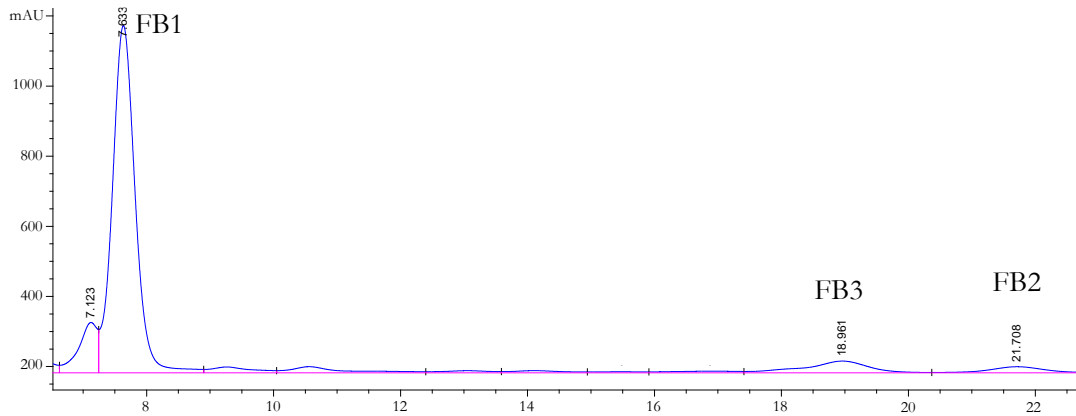


Figura 6. Perfil toxicogénico sintetizado por *F. verticillioides* RC 2024 en el biorreactor. Cromatograma obtenido por HPC-FL, indicando la presencia de FB1, FB2 y FB3 en el extracto de cultivo de *F. verticillioides*, derivatizadas con o-ftaldialdehído (OPA).

3-1-3- Modelo de fitotoxicidad en maceta.

Se sembraron las semillas de híbridos resistente (HR) y susceptible (HS) a la infección por *F. verticillioides* en macetas (Figura 7) conteniendo arena estéril y se regaron con las soluciones acuosas de FB1 (1 o 20 ppm) o agua destilada estéril (Control) a los 2, 4, 6 días post-siembra (dps). Los días subsiguientes las plántulas se continuaron regando con agua destilada estéril. Las cosechas se realizaron a los 7, 14 y 21 dps. En la Fig. 8 se muestran que 1 y 20 ppm de FB1 producen una inhibición en el desarrollo de las plántulas de ambos híbridos a los 7 dps, el cual es dependiente de la dosis. Estos resultados se reproducen con respecto a los informados por Arias y cols. (2012).



Figura 7. Desarrollo de plántulas de maíz en el modelo experimental en maceta.

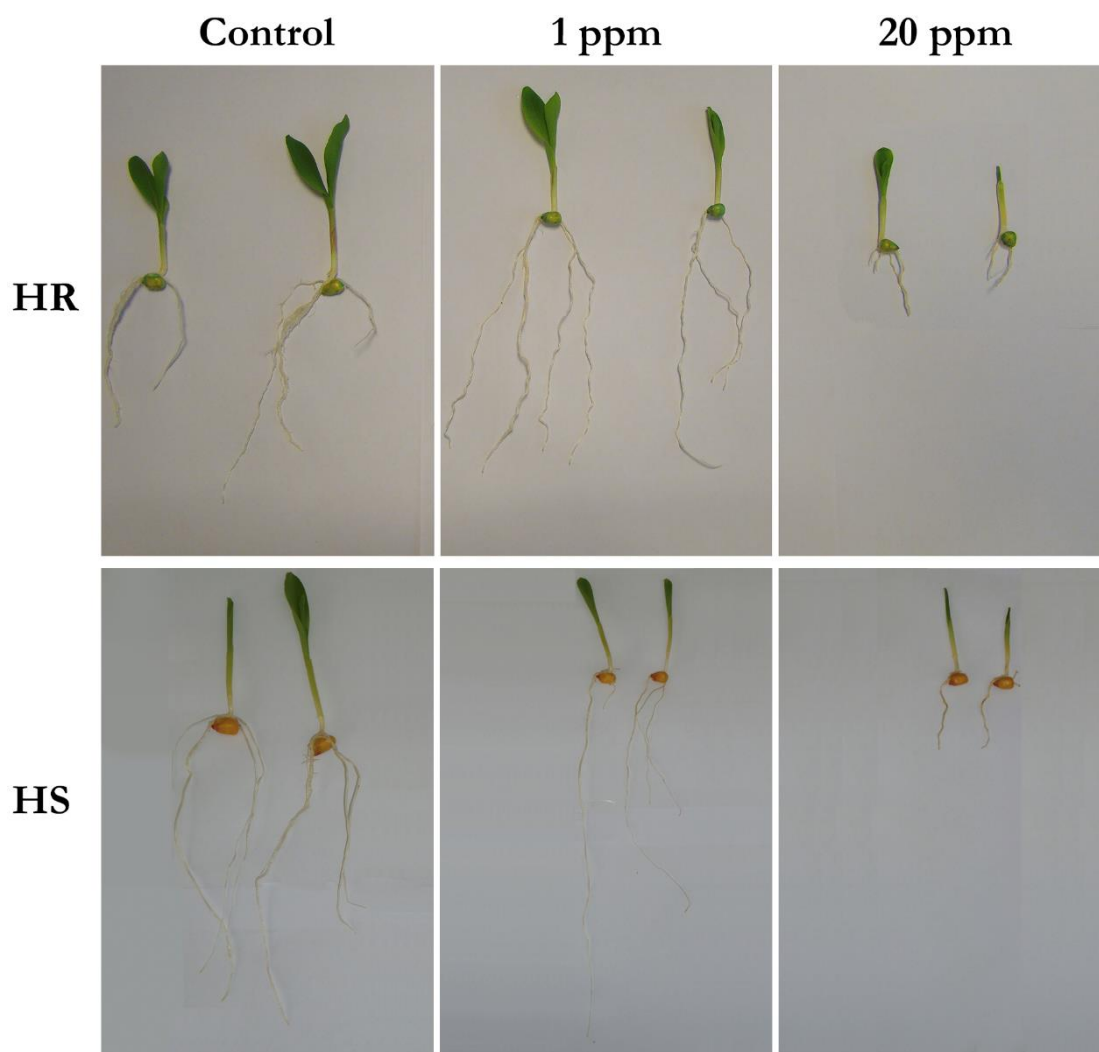


Figura 8. Efectos del riego con FB1 sobre el desarrollo de plántulas de maíz de HS y HR a los 7 días post-siembra.

3-1-4- Cuantificación de la muerte celular.

Con el objetivo de determinar los niveles de muerte celular inducido por FB1 en las plántulas de maíz, se cuantificó el % de conductividad electrolítica (CE) en la parte aérea, el cual es indicativo de pérdida de la integridad de la membrana plasmática y el consecuente eflujo de iones. En la Fig. 9, se observan diferentes perfiles de muerte celular entre híbridos y niveles de exposición a FB1 (1 y 20 ppm). La CE se redujo a los 14 dps en HS regado con 1 ppm de FB1, mientras que se incrementó en HR al mismo tiempo final y concentración de micotoxina. Esas alteraciones fueron transitorias, dado que la CE permaneció inalterada en ambos híbridos a los 21 dps. Por otra parte, la concentración alta de toxina (20 ppm) incrementó significativamente la CE con respecto al control en el HS a los 21 dps, pero no tuvo efectos más temprano en este híbrido ni en el HR.

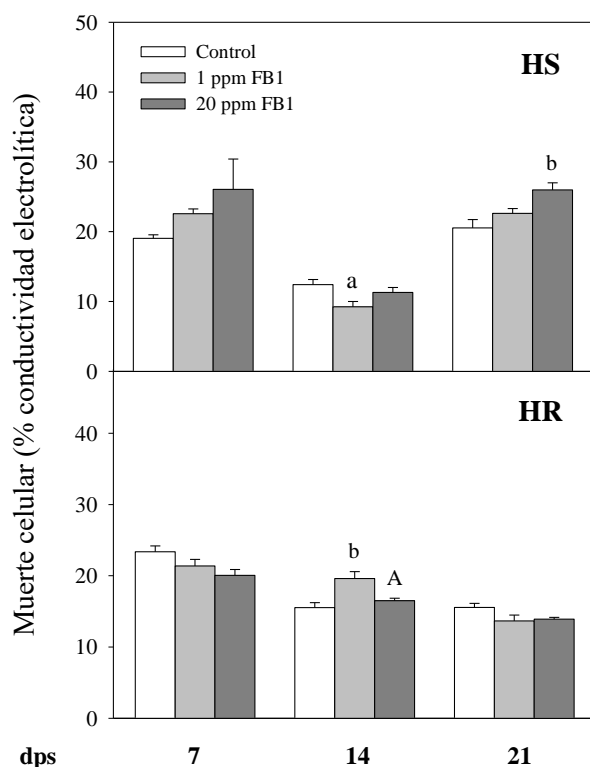


Figura 9. Efectos de FB1 sobre la muerte celular en plántulas de maíz de HS y HR.

Se muestran los promedios \pm SEM. de conductividad electrolítica (%) a los 7, 14 y 21 días post siembra (dps). ^{a,A} $p < 0,05$ y ^{b,B} $p < 0,01$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

3-1-5- Cuantificación de H₂O₂.

Se cuantificaron los niveles de H₂O₂ en plántulas de maíz expuestas o no a FB1 (Fig. 10). En general, la concentración más baja de FB1 utilizada tuvo escasos efectos en HS. Esta disminuyó el H₂O₂ a los 7 dps en raíz de ambos híbridos, mientras que se observaron resultados similares en las partes aéreas sólo del HR. Además, esta ERO se incrementó a los 14 y 21 dps en parte aérea del HR, mientras que en raíz se encontraron niveles de H₂O₂ similares y menores respecto al control, respectivamente.

El riego con 20 ppm de FB1 aumentó los niveles de H₂O₂ en raíz de ambos híbridos en todos los puntos finales evaluados excepto en las raíces de las plántulas del HR a los 21 dps, donde los niveles de H₂O₂ fueron menores a los registrados en las raíces de las plántulas del grupo control. Sin embargo, en parte aérea estos efectos sólo se encontraron a los 7 dps en HS y a 14 dps en HR.

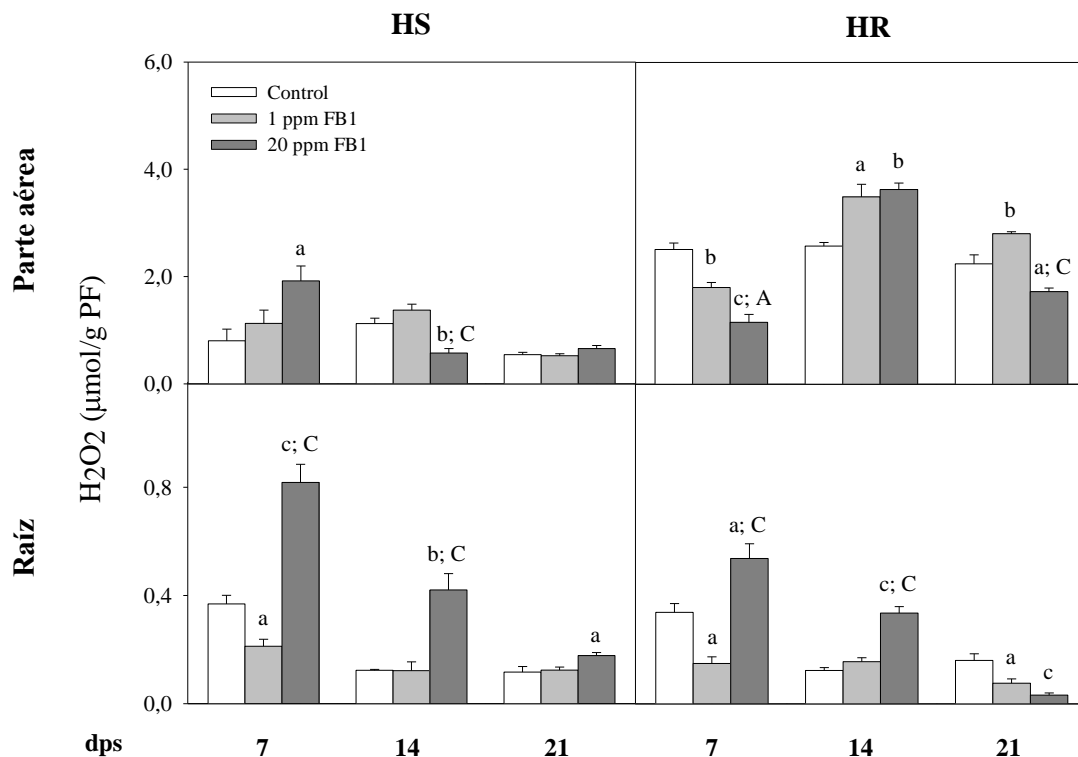


Figura 10. Efectos de FB1 sobre los niveles de H₂O₂ en plántulas de maíz de HS y HR.

PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM de H₂O₂ a los 7, 14 y 21 días post siembra (dps).

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^{c,C} $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

3-1-6- Actividad de enzimas antioxidantes.

El genotipo de maíz susceptible a la infección por *Fusarium verticillioides* se caracterizó por tener mayores actividades SOD y GPOX basales en comparación con el HR, lo cual fue evidenciado tanto en raíces como en partes aéreas, y en todos los tiempos ensayados (Fig. 11 y 12). Además, los efectos de FB1 sobre estas actividades antioxidantes fueron marcadamente diferentes en ambos híbridos. En el HS, el riego con 20 ppm de la toxina indujo a los 7 dps mayores actividades GPOX en raíces y SOD en partes aéreas, mientras que a los 14 dps la menor concentración de micotoxina aumentó esta última actividad en las partes aéreas. Sin embargo, los efectos de FB1 en este híbrido fueron fundamentalmente inhibitorios de ambas enzimas. A los 7 dps se registraron menores actividades SOD y GPOX en raíces de plántulas regadas con 1 ppm de FB1. Cambios similares fueron causados por las dos concentraciones de toxina en las raíces a los 14 y 21 dps, y en las partes aéreas en el último tiempo ensayado.

En general, FB1 incrementó las actividades de las dos enzimas antioxidantes en el HR, excepto por las disminuciones de GPOX registradas a los 14 dps en raíces con 20 ppm, y a los 21 dps en partes aéreas de plántulas expuestas a 1 y 20 ppm. Ambas concentraciones de toxina incrementaron

la GPOX en toda la plántula a los 7 dps, en partes aéreas a los 14 dps, y en partes aéreas y raíces a los 21 dps. Además, el riego con 20 ppm de FB1 aumentó la SOD en toda la plántula a los 7 dps, y en las raíces a los 14 dps.

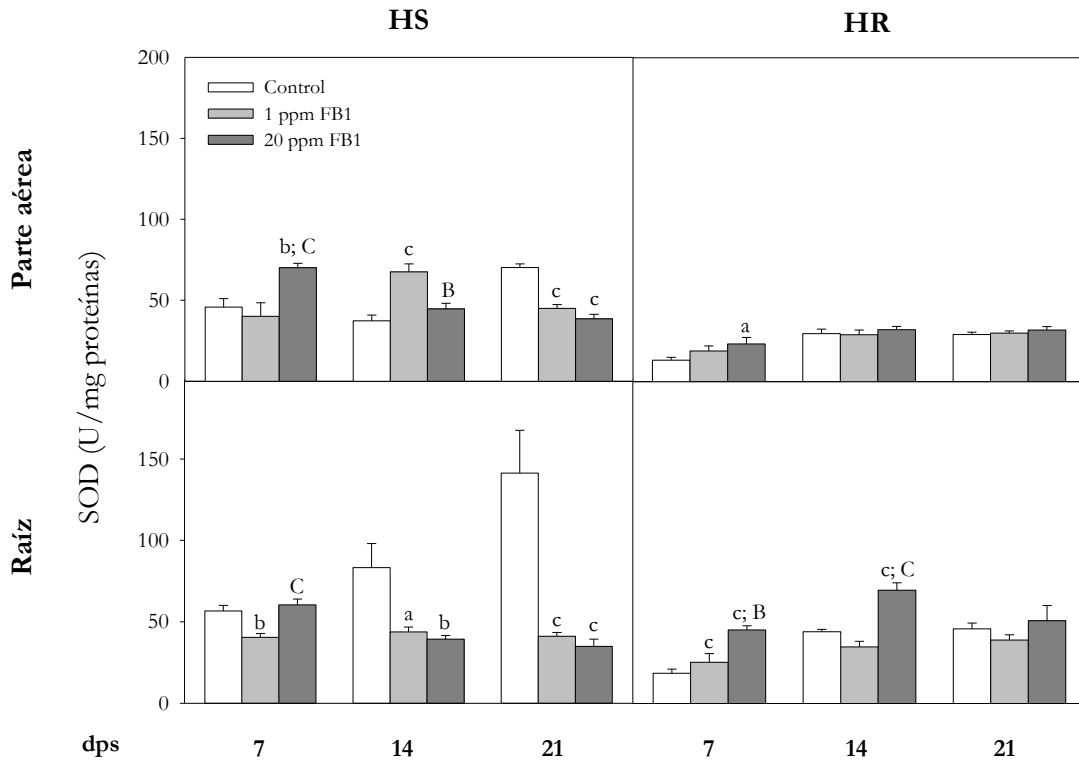


Figura 11. Efectos de FB1 sobre la actividad SOD.

Se muestran los promedios \pm SEM de la actividad SOD a los 7, 14 y 21 días post-siembra (dps).

^a $p < 0,05$; ^{b,B} $p < 0,01$ y ^{c,C} $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

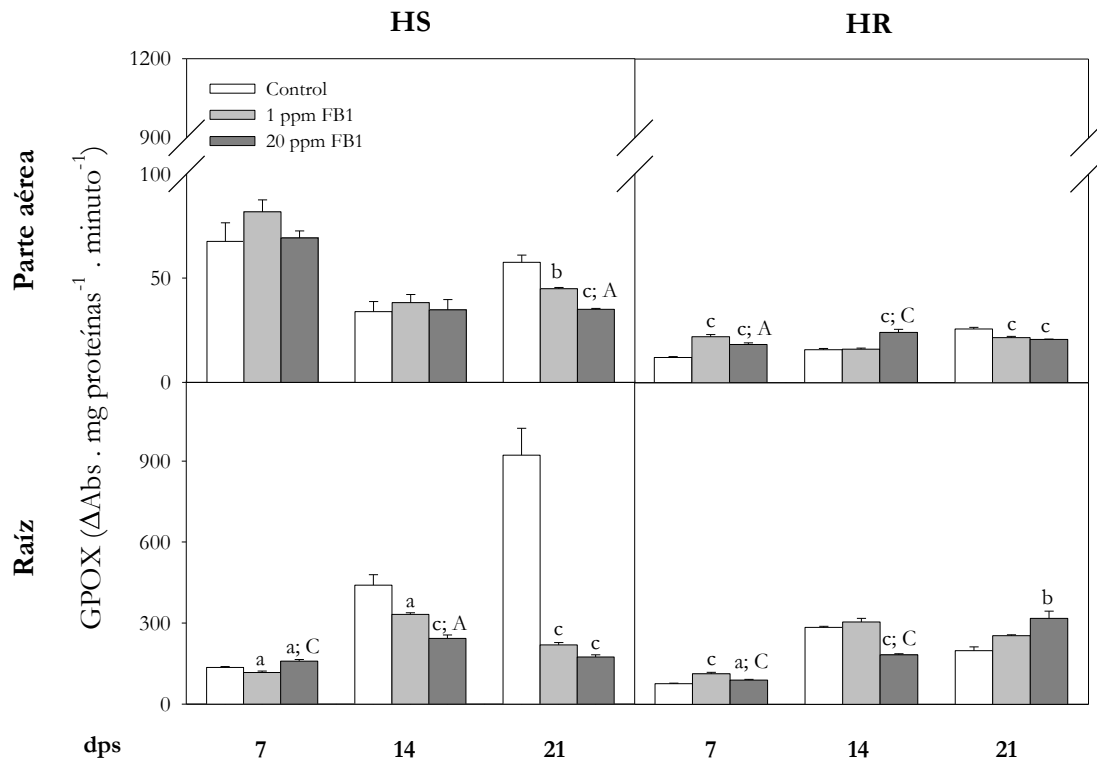


Figura 12. Efectos de FB1 sobre la actividad GPOX.

Se muestran los promedios \pm SEM de la actividad GPOX a los 7, 14 y 21 días post-siembra (dps).

^{a,A} $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^{c,C} $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

3-1-7- Cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico.

Con el objetivo de evaluar si FB1 induce oxidación en biomoléculas, se cuantificaron las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las cuales son ampliamente utilizadas como indicadores de peroxidación lipídica producto del estrés oxidativo (Fig. 13). Los TBARS aumentaron a los 7 dps y disminuyeron a los 21 dps en raíz de ambos híbridos de las plántulas regadas con 1 ppm de FB1. Por otro lado, a los 21 dps los TBARS aumentaron en parte aérea de las plántulas del HR.

También se observaron efectos fitotóxicos en las raíces de las plántulas de ambos híbridos expuestas a 20 ppm de FB1, donde la micotoxina elevó los niveles TBARS a los 7 y 14 dps, mientras que los disminuyó con respecto al control a los 21 dps en el HS. Además, se observó una mayor peroxidación lipídica en la parte aérea de ambos híbridos a los 7 dps, y en el último tiempo final ensayado en el HS.

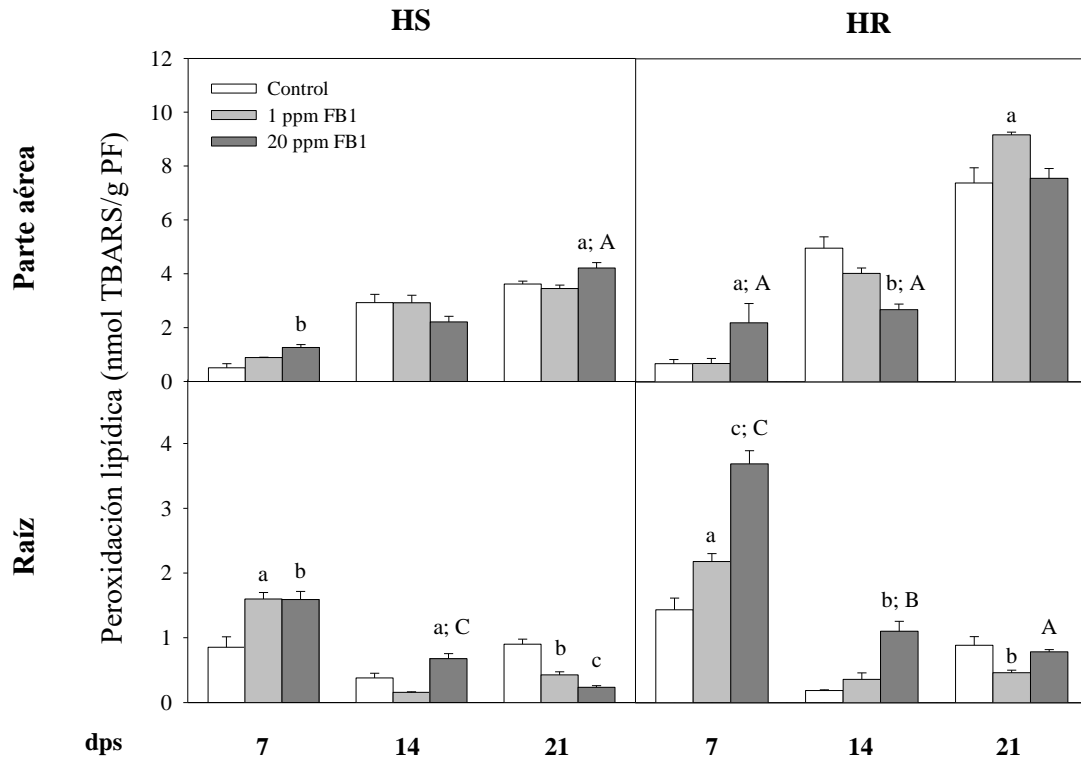


Figura 13. Efectos de FB1 sobre los niveles de TBARS en plántulas de maíz de HS y HR.

PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM de TBARS a los 7, 14 y 21 días post siembra (dps).

^{a,A} $p < 0,05$; ^{b,B} $p < 0,01$ y ^{c,C} $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

3-1-8- Cuantificación de clorofilas.

Los cambios en el contenido de clorofilas en las plántulas regadas con FB1 parecieron ser independiente de la concentración de toxina. En la Fig. 14 se muestra que la micotoxina (1 y 20 ppm) disminuyó el contenido de clorofilas en ambos híbridos a los 7 dps. No obstante, luego se observaron respuestas diferentes entre los genotipos de plantas. Mientras que las clorofilas se redujeron en el HR a los 14 dps, estas se incrementaron en el mismo tiempo final en el HR, y disminuyeron a los 21 dps en este último, pero no en HS.

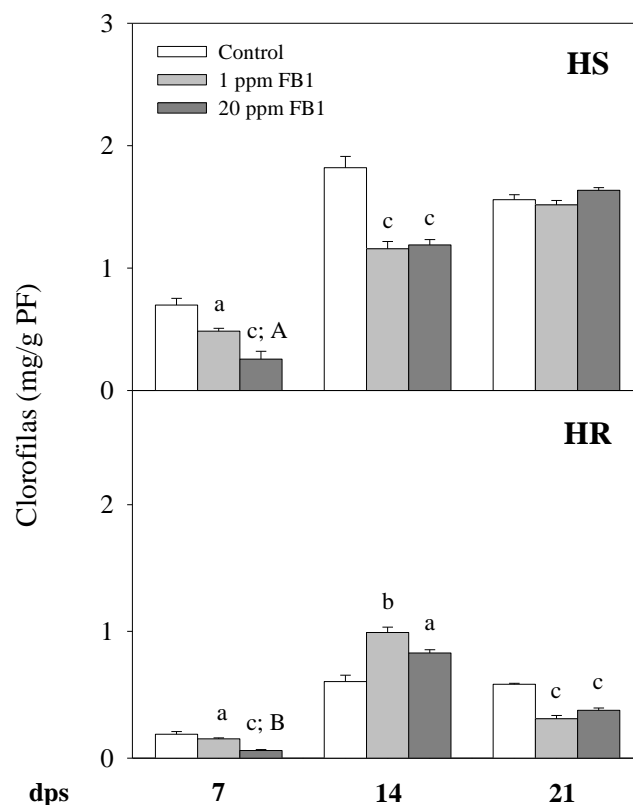


Figura 14. Cambios en el contenido de Clorofilas en parte aérea de plántulas HS y HR de maíz.

PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM de Clorofilas a los 7, 14 y 21 días post siembra (dps).

^{a,A} $p < 0,05$; ^{b,B} $p < 0,01$ y ^c $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

3-1-9 Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB):

Con el fin de identificar aquellos biomarcadores que tienen mayor contribución para describir el estado de estrés generado en planta con los distintos tratamientos con FB1 (1 y 20 ppm), se aplicó un análisis discriminante (Anexo I). Se utilizaron los biomarcadores como variables independientes y los tratamientos como grupos de clasificación. Los resultados obtenidos muestran una discriminación entre tratamientos con el 100 % de asignaciones correctas.

A partir de los parámetros seleccionados por el análisis discriminante se calculó la RIB para cada tratamiento, la cual permite una interpretación más holística del nivel de estrés sufrido por los híbridos. Las RIB calculadas para cada condición experimental se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 15. Las áreas grises delimitadas en cada gráfico por la unión de las RIB de los grupos Control, 1 y 20 ppm de FB1 permiten una mejor visualización del tratamiento que produjo el mayor estrés. Las dos concentraciones de FB1 utilizadas en este estudio causaron aumentos significativos de las RIB con respecto al control. El riego con 20 ppm de FB1 indujo los mayores valores de RIB en ambos híbridos y en casi todos los tiempos evaluados, con la excepción del HR a los 21 dps donde el mayor estrés fue causado por la menor concentración de micotoxina.

Tabla 1. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en plántulas de maíz de HS y HR regadas con concentraciones de FB1.

dps	FB1 (ppm)	RIB				
		Mediana	Media	Min	Max	
HS	0	0,00	0,07	0,00	0,18	
	7	1	1,29 ^c	1,37	0,82	1,96
		20	10,31 ^{c, C}	10,31	10,30	10,32
	14	0	0,00	0,00	0,00	0,00
		1	0,85 ^b	0,85	0,02	1,68
	21	20	5,72 ^{c, C}	5,72	5,64	5,81
0		0,13	0,13	0,00	0,26	
HR	7	1	1,96 ^c	1,96	1,15	2,78
		20	5,04 ^{c, C}	5,04	4,96	5,12
	14	0	0,00	0,00	0,00	0,00
		1	2,29 ^c	2,31	1,26	3,43
	21	20	7,42 ^{c, C}	7,48	7,24	7,76
		0	0,00	0,00	0,00	0,00
21	1	7,81 ^c	7,83	7,75	7,92	
	20	2,08 ^{c, C}	2,18	0,91	3,30	

^b $p < 0,01$ y ^{c,C} $p < 0,001$. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

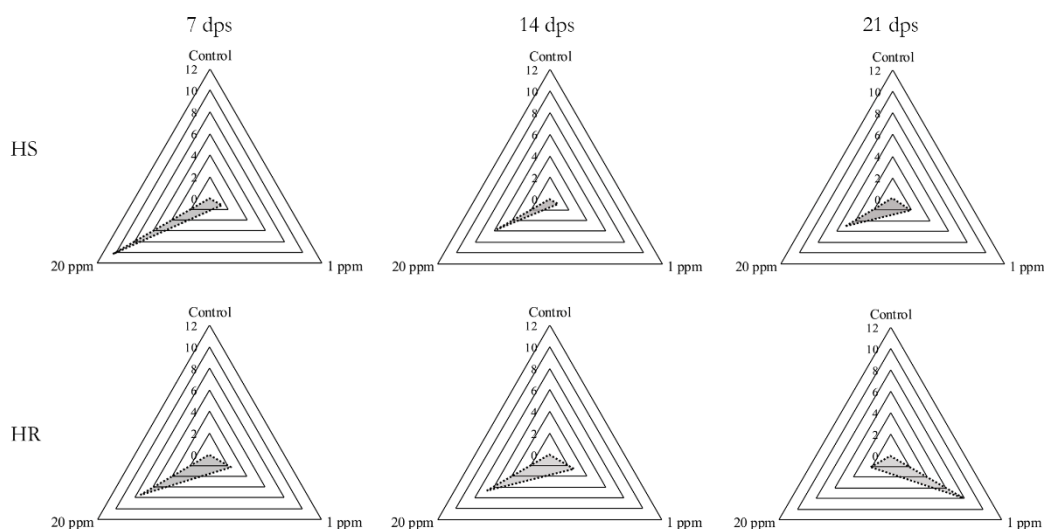


Figura 15. Respuesta Integrada de Biomarcadores (RIB) en plántulas de maíz de HS y HR regadas con concentraciones de FB1.

3-1-10- Conclusiones del capítulo I:

- ✓ FB1 indujo distintos perfiles de muerte entre HS y HR, los cuales dependieron de la concentración de micotoxina y el tiempo de exposición.
- ✓ La susceptibilidad/resistencia de los híbridos de maíz a la fitotoxicidad de FB1, podría relacionarse con la distinta capacidad de amortiguar la producción ERO luego de la exposición de las plántulas a la micotoxina.
- ✓ La RIB permitió observar que el tipo de híbrido y la concentración de toxina condicionaron la cinética de evolución del estrés.
- ✓ En el HR, la mayor concentración de FB1 indujo menor estrés con respecto a la menor concentración a los 21 dps.

3-2- CAPÍTULO II: EFECTOS DE FB1 EN LA REPRODUCCIÓN DEL MAÍZ.

3-2-1- Ensayos de germinación de granos de polen.

Para determinar si FB1 afecta la reproducción del maíz, se desarrolló un modelo experimental para inducir la germinación *in vitro* de tubos polínicos de maíz de híbridos susceptibles y resistentes a

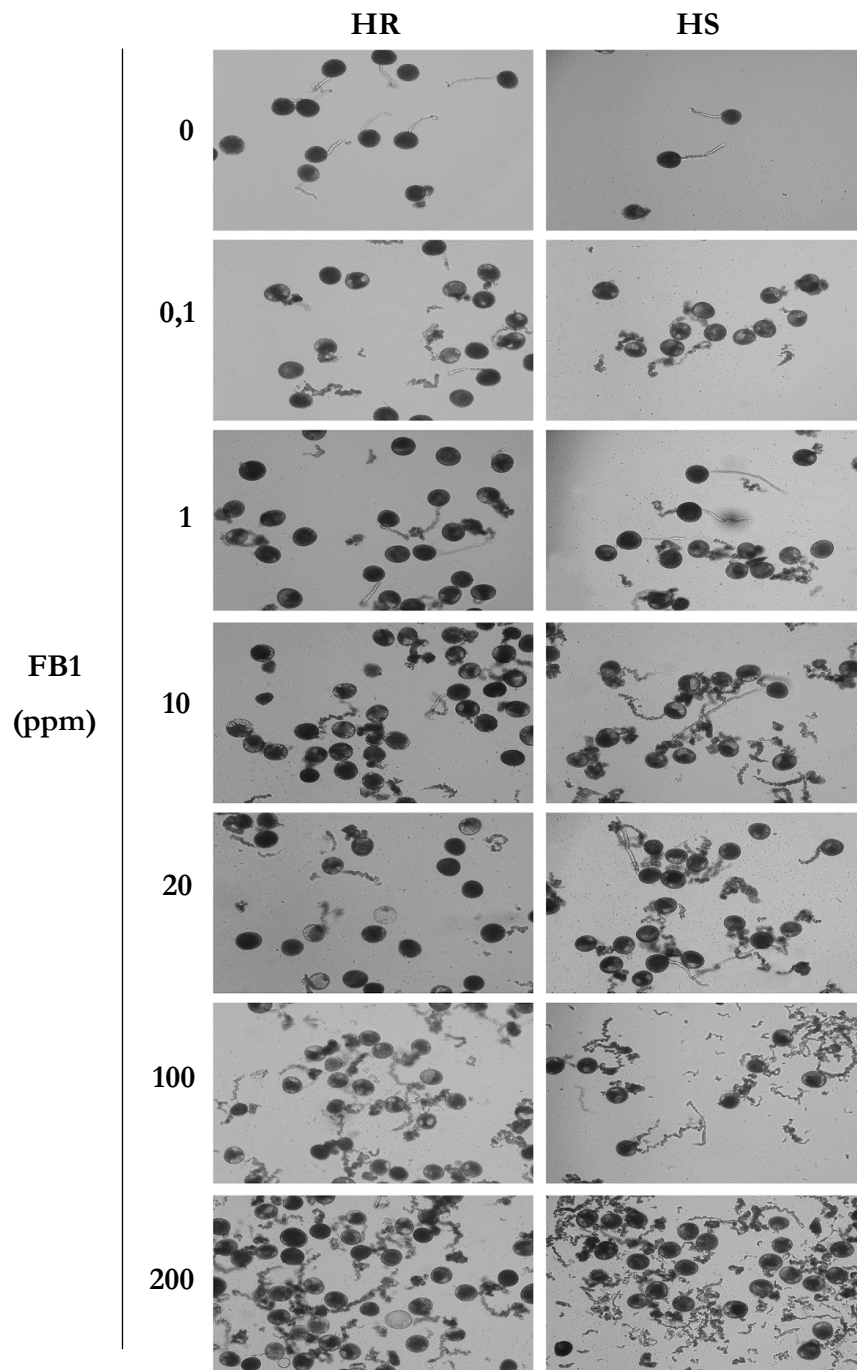


Figura 16. Análisis microscópico de los efectos de FB1 (0 – 200 ppm) sobre la germinación de los granos de polen de maíz de HS y HR.

la infección por *F. verticillioides*. Como se indica en Materiales y Métodos, el polen del HS y HR, se expuso a concentraciones entre 0 y 200 ppm de FB1, y luego se determinó el porcentaje de germinación en cada condición experimental. En la Fig. 16 se observan imágenes representativas de los granos de polen de ambos híbridos expuestos a las distintas concentraciones de toxina.

Mediante el análisis microscópico de los granos de polen a mayor aumento se pudo observar que FB1 provocó cambios en la morfología de los granos de ambos híbridos, produciendo la ruptura de la membrana en la zona de la abertura del grano de polen. Como consecuencia de esa ruptura se produjo la extravasación del contenido celular en forma de evaginaciones similares a los tubos polínicos (a los que se denominó “pseudo tubos polínicos”), pero con trayectorias sinuosas y sin bordes definidos (Fig. 17). La incidencia de estas alteraciones morfológicas también fue dependiente de las dosis de FB1.

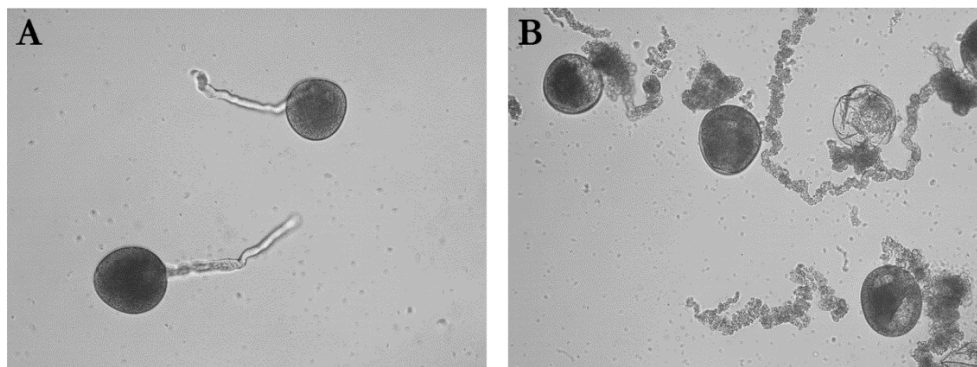


Figura 17. Morfología microscópica de los tubos polínicos (A) y de los “pseudo tubos polínicos” (B).

En la Fig. 18 se observa que FB1 indujo una disminución del % de germinación del tubo polínico en ambos híbridos, siendo un efecto dosis-dependiente en el HR. Además, la toxina causó una inhibición total de la germinación con 10 ppm de FB1 en el HS, mientras que en el HR el mismo efecto se observó con 20 ppm de la micotoxina.

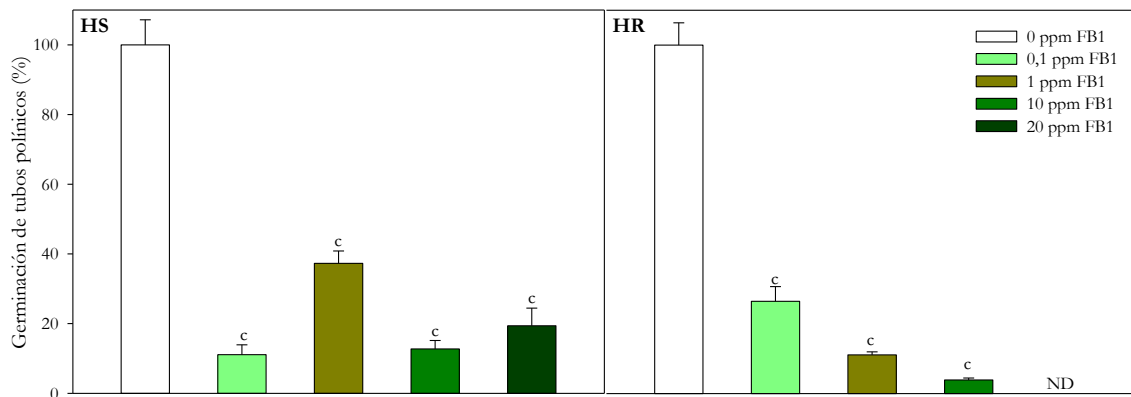


Figura 18. Efectos tóxicos de FB1 sobre la germinación del tubo polínico de granos de polen de maíz de HS y HR.

Se muestran los promedios \pm SEM de los % de germinación del polen expuesto a las distintas concentraciones de FB1. ND, no detectado.

^c $p < 0,001$ indica diferencias con el control.

3-2-2- Estudio de la viabilidad de los granos germinados.

Con el fin de determinar si FB1 altera la viabilidad del polen germinado, a los tratamientos donde hubo germinación se les adicionó MTT como se describe en Materiales y Métodos. Al cuantificar los granos de polen germinados de ambos híbridos se observó que el 100 % es viable independientemente de la concentración de FB1 utilizada. En la Fig. 19 se muestran imágenes representativas de granos de polen germinados y viables (teñidos de azul), de ambos híbridos.

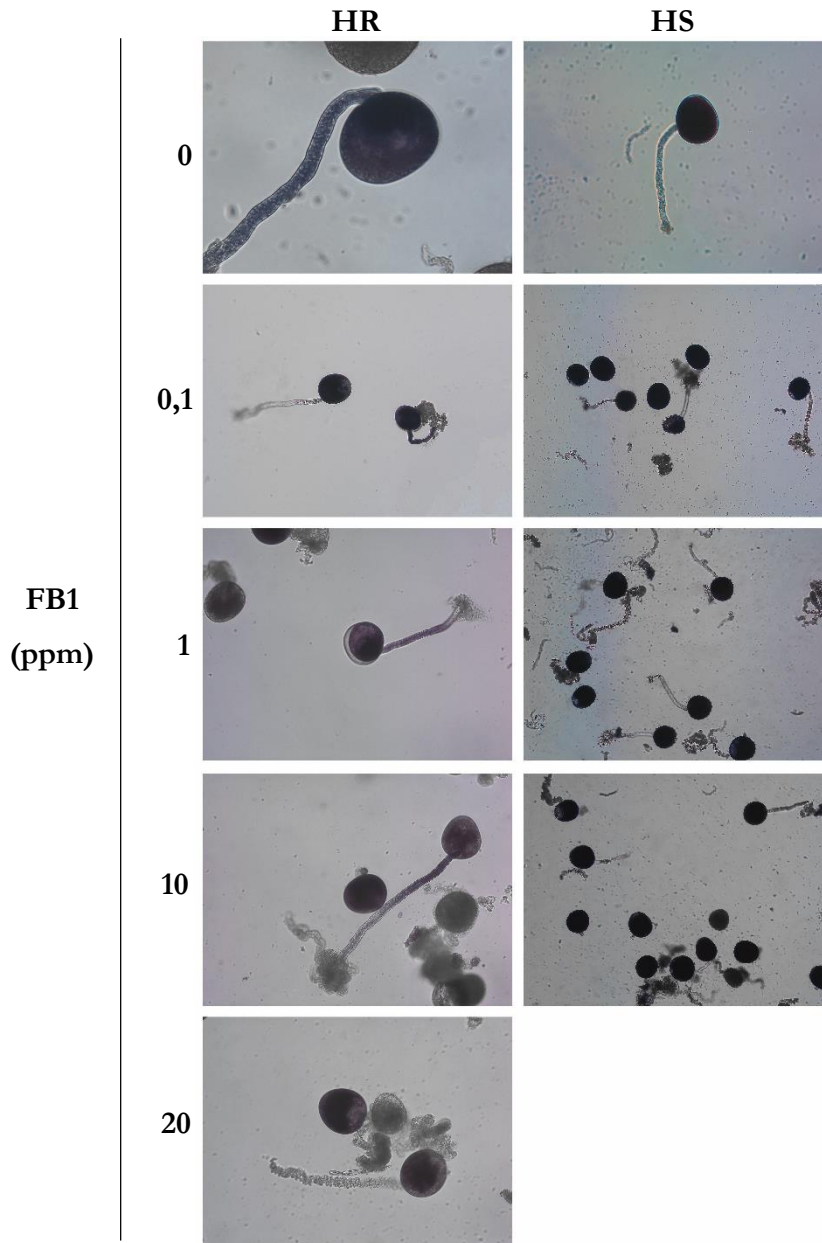


Figura 19. Efectos de FB1 (0 – 20 ppm) sobre la viabilidad de los granos de polen germinados. El polen germinado viable se observa teñido de azul.

3-2-3- Conclusiones del capítulo II:

- ✓ FB1 indujo efectos tóxicos en el grano de polen provocando la inhibición de su germinación tanto en HS como en HR, siendo en este último híbrido una alteración dosis-dependiente.
- ✓ En HR la toxina causó una inhibición completa de la germinación a menores concentraciones que en HS, sugiriendo que la toxicidad de la FB1 sobre la reproducción depende del genotipo del maíz.
- ✓ La viabilidad de los granos de polen germinados no fue afectada por el tratamiento con FB1.
- ✓ La toxicidad de FB1 estaría relacionada, al menos en parte, con el daño en la membrana del polen que causa la liberación del contenido celular, siendo este efecto dependiente de la concentración de toxina.

3-3- CAPÍTULO III: FITOTOXICIDAD AGUDA DE FB1 EN PLÁNTULAS DE MAÍZ.

MUERTE CELULAR Y ESTADO OXIDATIVO.

3-3-1- Modelo de fitotoxicidad en hidroponia.

Para determinar los efectos fitotóxicos agudos (hasta 24 horas) de FB1 en maíz, se cultivaron plántulas de ambos híbridos en hidroponia y a los 14 días de cultivo, se expusieron a concentraciones de FB1 (0, 1 y 20 ppm), en dos tiempos de incubación (6 y 24 horas post- tratamiento, hpt).

En la Fig. 20 se observan las plántulas de maíz a los 14 días de cultivo en hidroponia, en las que no se evidenciaron signos macroscópicos de déficits nutricionales, alteraciones en el desarrollo o vigor de las plántulas, con respecto a las crecidas en el modelo de fitotoxicidad en macetas (Capítulo I).



Figura 20. Desarrollo de las plántulas de maíz a los 14 días de cultivo en hidroponia.

3-3-2- Cuantificación de la muerte celular.

Se estudiaron las CE generadas por partes aéreas de las plántulas, a los fines de determinar los efectos agudos que induce FB1 sobre la muerte celular. En la Fig. 21, se observa que los tratamientos con la micotoxina (1 y 20 ppm) causaron distinto perfil de muerte entre los tiempos ensayados en ambos híbridos. Tanto en HS como en HR, las CE se redujeron a las 6 hpt con 1 ppm de FB1, mientras que la misma concentración de toxina aumentaron la muerte celular a las 24 hpt. Por otra parte, los mismos efectos fueron inducidos en el HS con 20 ppm de FB1; mientras que en el HR esta concentración de toxina disminuyó la CE a las 6 hpt, pero no produjo cambios a las 24 hpt.

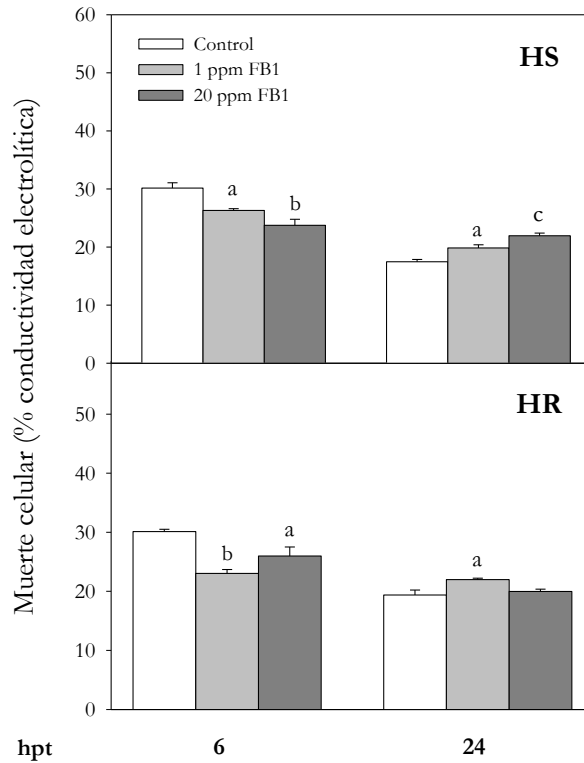


Figura 21. Efectos agudos de FB1 sobre la muerte celular en plántulas de maíz de HS y HR.

Se muestran los promedios \pm SEM. de conductividad electrolítica (%) a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt).

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^c $p < 0,001$ indican diferencias con el control.

3-3-3- Cuantificación de H₂O₂.

Se cuantificaron los niveles de H₂O₂ en ambos híbridos de maíz expuestos o no a FB1. La Fig. 22 muestra que la menor concentración produjo cambios principalmente en el HR, donde la toxina aumentó los niveles de H₂O₂ en ambas partes de la planta y en los dos tiempos evaluados. Sin embargo, la misma concentración de toxina tuvo efectos opuestos a las 24 hpt en raíz y parte aérea de plántulas del HS (disminución y aumento de los niveles de H₂O₂, respectivamente), no observándose cambios en este híbrido a las 6 hpt.

El tratamiento con 20 ppm de FB1 causó alteraciones en las concentraciones de H₂O₂ en las raíces de las plántulas de los dos híbridos, incrementando los niveles tanto a las 6 como a las 24 hpt. Sin embargo, en ninguno de los dos tiempos evaluados se observaron cambios en las concentraciones de esta ERO en las partes aéreas, tanto en el HS como en el HR.

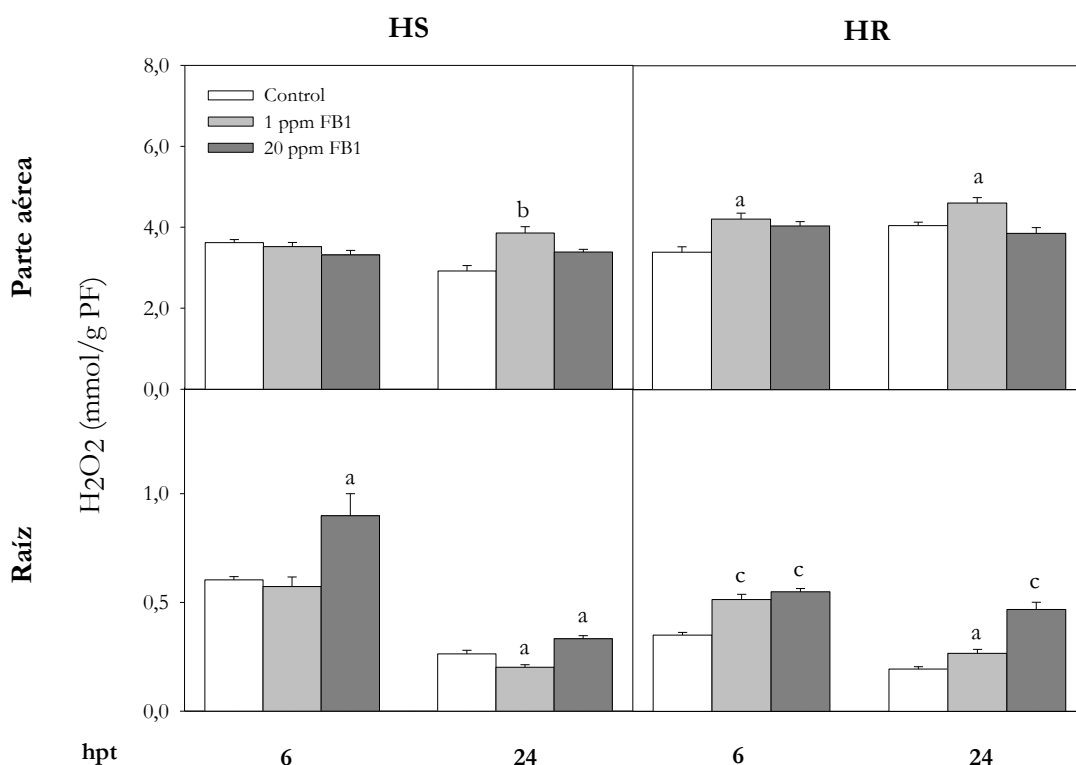


Figura 22. Efectos agudos de FB1 sobre los niveles de H₂O₂ en plántulas de maíz de HS y HR. PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM. de H₂O₂ a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt). ^a p<0,05; ^b p<0,01 y ^c p<0,001. Indican diferencias con el control.

3-3-4- Actividad de enzimas antioxidantes.

Los efectos de FB1 fueron marcadamente diferentes entre ambos híbridos. Al igual que los resultados observados en el modelo experimental en maceta (Capítulo I), el genotipo de maíz susceptible a la infección por *Fusarium verticillioides* se caracterizó por tener mayores actividades SOD y GPOX basales en comparación con el HR, lo cual fue evidenciado tanto en raíces como en partes aéreas, y en todos los tiempos ensayados (Fig. 23 y 24). En el HS, los efectos de FB1 fueron principalmente inhibitorios de ambas actividades enzimáticas. La concentración baja de micotoxina indujo en ambos tiempos ensayados menores actividades de las enzimas antioxidantes en raíz y también de GPOX en parte aérea a 24 hpt. La concentración de 20 ppm de toxina también disminuyó la actividad de GPOX en raíces de este mismo híbrido en ambos tiempos evaluados, mientras que no indujo cambios sobre la actividad SOD con respecto al control.

En general, FB1 aumentó las actividades de las enzimas antioxidantes, excepto por la disminución de SOD en raíces expuestas a 20 ppm de toxina a las 6 hpt. El tratamiento con 1 ppm de FB1 indujo aumento de las actividades SOD y GPOX en ambos tiempos evaluados en parte aérea, y sólo de GPOX a las 24 hpt en las raíces. Además, la mayor concentración de toxina aumentó las actividades de ambas enzimas a las 24 hpt en toda la plántula.

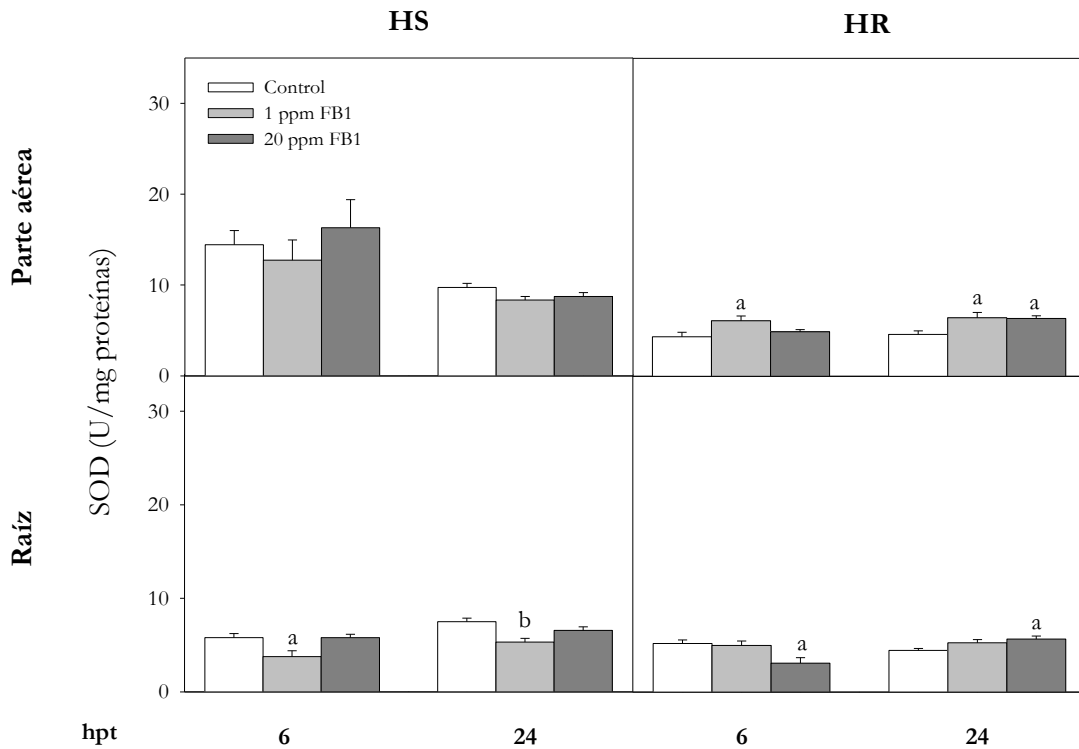


Figura 23. Efectos agudos de FB1 sobre la actividad SOD.

Se muestran los promedios \pm SEM de la actividad SOD a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt).

^a $p < 0,05$ y ^b $p < 0,01$ indican diferencias con el control.

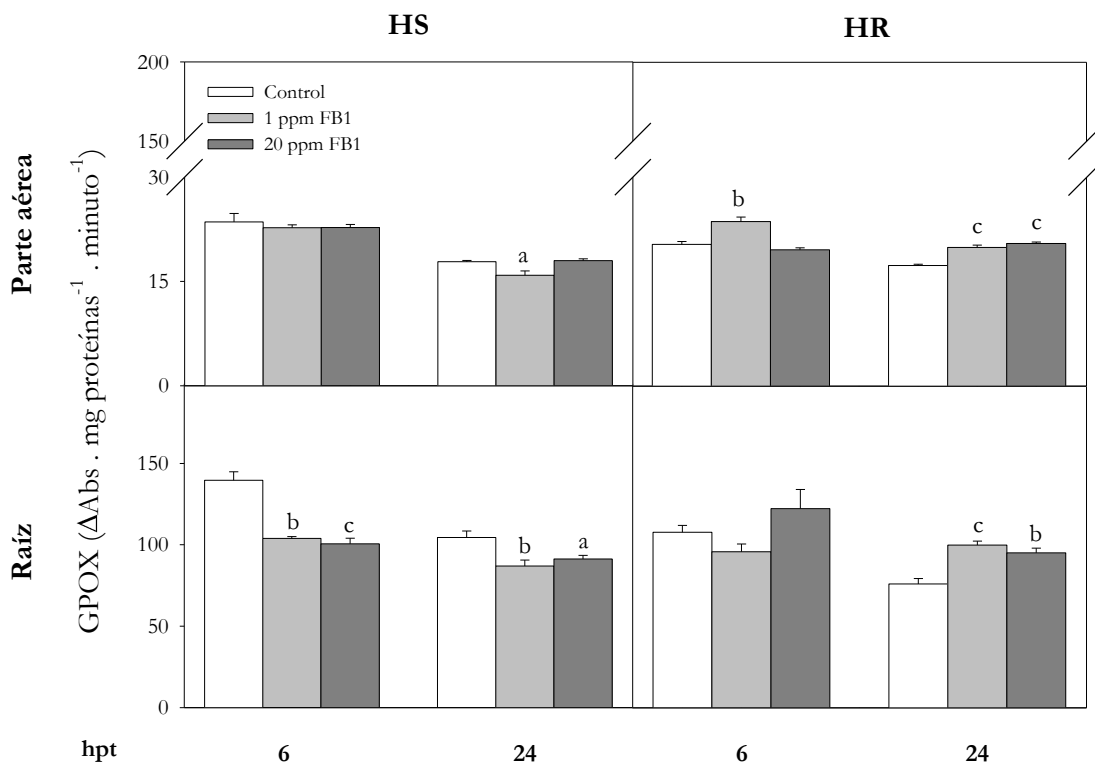


Figura 24. Efectos agudos de FB1 sobre la actividad GPOX.

Se muestran los promedios \pm SEM de la actividad GPOX a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt).

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^c $p < 0,001$ indican diferencias con el control.

3-3-5- Cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico.

Las TBARS se cuantificaron con el fin de estimar el daño oxidativo de lípidos inducido por FB1. Con el tratamiento de 1 ppm, las TBARS aumentaron en parte aérea del HS y en ambas partes de las plántulas del HR a las 6 hpt, mientras que a las 24 hpt disminuyeron tanto en raíz como en parte aérea del genotipo susceptible (Fig. 25).

En el HS el tratamiento con 20 ppm de FB1 aumentó los TBARS a las 6 hpt en parte aérea y los disminuyó a las 24 hpt en ambas partes de la planta. Por otro lado, en el HR la misma concentración de toxina tuvo efectos sólo en último tiempo final ensayado, donde se observó una mayor oxidación de lípidos con respecto al control, en ambas partes de la plántula.

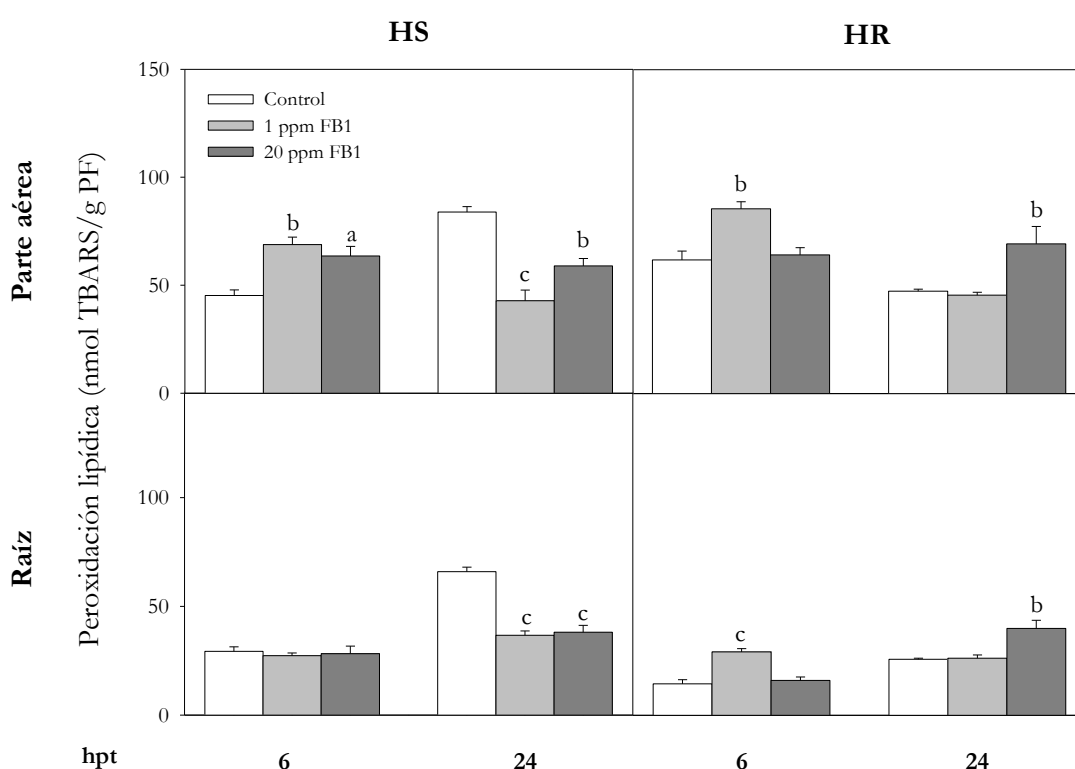


Figura 25. Efectos agudos de FB1 sobre los niveles de TBARS en plántulas de maíz de HS y HR. PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM de TBARS a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt). ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^c $p < 0,001$. Indican diferencias con el control.

3-3-6- Cuantificación de ácido salicílico.

La Fig. 26 muestra que 1 ppm de FB1 indujo efectos opuestos en los niveles AS a las 6 hpt y 24 hpt en ambas partes de la planta del HR (diminución y aumento, respectivamente); mientras que, en las plántulas del genotipo susceptible la misma concentración de toxina no provocó cambios significativos respecto al control.

Por otra parte, a las 6 hpt con 20 ppm de FB1 se observaron menores niveles de AS en parte aérea del HS y en raíz del HR; mientras que a las 24 hpt la FB1 provocó una disminución de la concentración de esta fitohormona en ambas partes de las plántulas del HS.

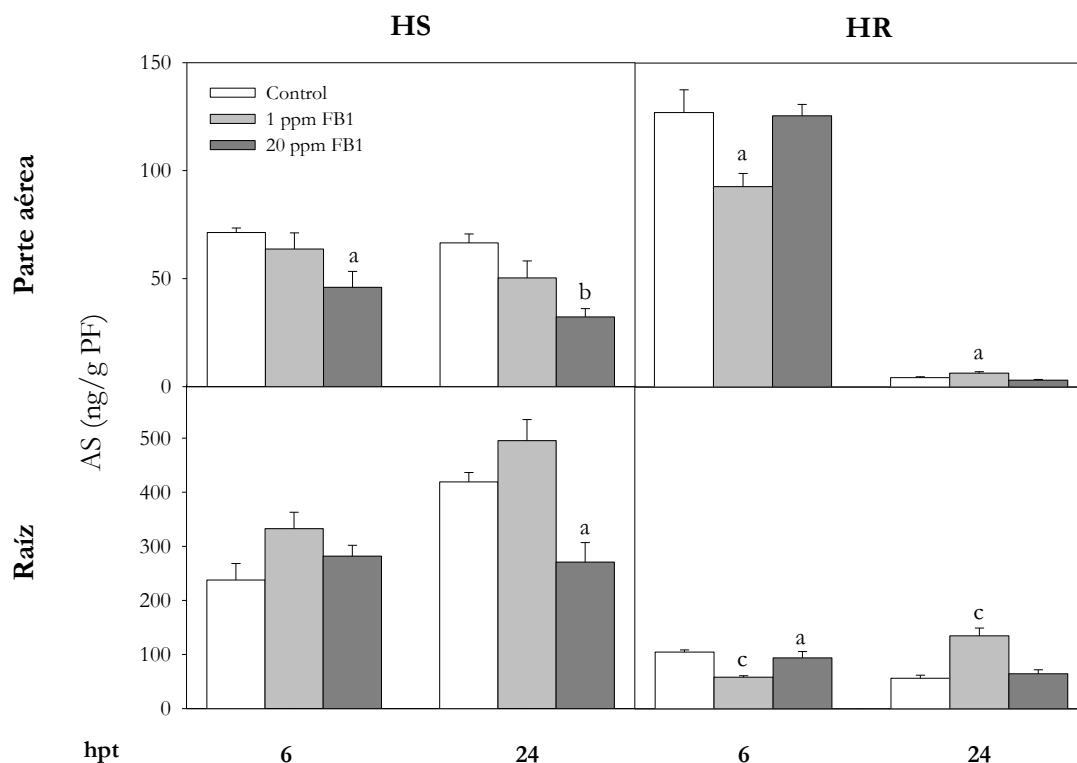


Figura 26. Efectos agudos de FB1 sobre los niveles de AS en plántulas de maíz de HS y HR. PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM de AS a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt).
^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ y ^c $p < 0,001$. Indican diferencias con el control.

3-3-7 Respuesta Integrada de Biomarcadores:

Con el fin de identificar aquellos biomarcadores que tienen mayor contribución para describir el estado de estrés generado en planta con los distintos tratamientos con FB1 (1 y 20 ppm), se aplicó un análisis discriminante. Se utilizaron los biomarcadores como variables independientes y los tratamientos como grupos de clasificación. La discriminación entre tratamientos fue del 100 % de asignaciones correctas y la significancia de los modelos obtenidos (valores de Wilk's Lambda p). Las funciones discriminantes y los biomarcadores seleccionados por el análisis discriminante junto con las significancias de los modelos están detallados en el ANEXO II.

A partir de los parámetros seleccionados por el análisis discriminante se calculó la RIB para cada tratamiento, la cual permite una interpretación global del nivel de estrés sufrido por los híbridos. Debido a que, como se indicó en los Materiales y Métodos, para el cálculo de la RIB se recomiendan como máximo 9 biomarcadores para cada condición experimental, pero el software estadístico

utilizado (R Studio) sólo puede analizar hasta 7 biomarcadores, en los casos donde los resultados del análisis discriminante arrojó un mayor número de biomarcadores, se seleccionaron aquellos con menores valores de lambda (λ) parcial, ya que un menor valor de λ parcial representa una mayor contribución del biomarcador al momento de segregar los grupos.

Los valores de RIB calculados para cada condición experimental se muestran en la Tabla 2 y en la Fig. 27. Las áreas grises delimitadas en cada gráfico por la unión de los RIB de los grupos Control, 1 y 20 ppm de FB1 permiten una mejor visualización del tratamiento que produjo el mayor estrés. Las dos concentraciones de FB1 utilizadas en este estudio causaron aumentos significativos del RIB con respecto a control. El tratamiento con 20 ppm de FB1 indujo los mayores RIB en el HS en los dos tiempos evaluados. Sin embargo, en el HR el mayor estrés fue causado por la menor concentración de micotoxina, en los dos tiempos analizados.

Tabla 2. Efectos agudos de FB1 sobre la respuesta integrada de biomarcadores (RIB) en plántulas de maíz de HS y HR.

	hpt	FB1 (ppm)	RIB				
			Mediana		Media	Min	Máx
HS	6	0	0.00		0.00	0.00	0.18
		1	4.12	c	4.21	3.58	5.00
		20	4.18	c, C	4.45	3.72	5.46
	24	0	0.04		0.11	0.00	0.29
		1	3.56	c	3.76	2.78	4.95
		20	5.71	c, C	5.73	5.26	6.33
HR	6	0	0.00		0.00	0.00	0.00
		1	6.44	c	6.48	6.34	6.66
		20	1.44	c, C	1.48	0.35	2.68
	24	0	0.08		0.08	0.00	0.17
		1	5.57	c	5.57	5.40	5.75
		20	1.03	c, C	1.03	0.17	1.90

^{c,C} p<0,001. Letras minúsculas indican diferencias con el control; letras mayúsculas indican diferencias entre los riegos con 1 ppm y 20 ppm de FB1.

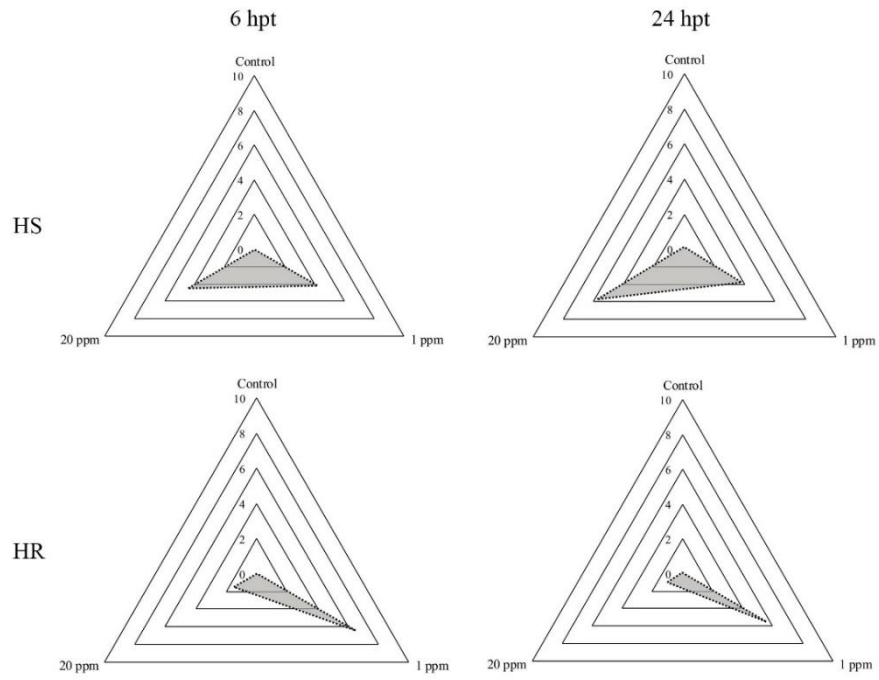


Figura 27. Efectos agudos de FB1 sobre la respuesta integrada de biomarcadores (RIB) en plántulas de maíz de HS y HR.

3-3-8- Conclusiones del capítulo III:

- ✓ El modelo experimental en hidroponia permitió identificar efectos fitotóxicos agudos de FB1 (1 y 20 ppm), los cuales fueron registrados tanto en el HS como en el HR, y en los dos tiempos evaluados.
- ✓ En los dos híbridos estudiados se observaron dos fases de la toxicidad aguda de FB1 en relación a la muerte celular, medidos por variaciones del % CE: Inhibición a las 6 hpt, y luego la inducción de la muerte a las 24 hpt.
- ✓ La toxina indujo estrés oxidativo en ambos híbridos, pero los resultados en conjunto sugieren que el HR controlaría más eficientemente los efectos tóxicos de las ERO.
- ✓ En el HR la muerte celular se produciría por un mecanismo dependiente de AS; mientras que en el HS la muerte sería por una vía independiente de esta fitohormona.

3-4- CAPÍTULO IV: EFECTOS MODULADORES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MEDIADAS POR LOS ÁCIDOS SALICÍLICO Y JASMÓNICO, EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA A TIEMPOS CORTOS POR FB1.

Los resultados del modelo de fitotoxicidad aguda de FB1 mostraron que la micotoxina incrementó la muerte celular en los dos híbridos de maíz utilizados en este trabajo, pero a la vez insinuaron distinta participación del estrés oxidativo y de las fitohormonas en la inducción de dicho efecto. Teniendo en cuenta estas observaciones, en esta etapa de la tesis se evaluó el impacto del pre-tratamiento de las plántulas con un antioxidante (ácido ascórbico, AA) sobre la muerte celular inducida por FB1, y sobre los niveles de dos hormonas (AS y AJ) que participan activamente en los procesos de muerte celular en vegetales.

Para estos experimentos las plántulas fueron tratadas con 1 ppm de FB1, concentración elegida teniendo en cuenta su mayor relevancia biológica, ya que eventualmente podrían encontrarse estos niveles de la micotoxina contaminando naturalmente los suelos.

3-4-1- Cuantificación de la muerte celular.

Se determinaron los % de CE a los fines de conocer los efectos de las ERO sobre la muerte celular inducida por FB1. En la Fig. 28, se observa que el tratamiento con 1 ppm de micotoxina aumentó la muerte a las 24 hpt en ambos híbridos. Pero el pre-tratamiento realizado con AA logró revertir el efecto causado por la toxina en ambos híbridos, provocando una disminución significativa de la muerte con respecto a las plántulas no tratadas con el antioxidante.

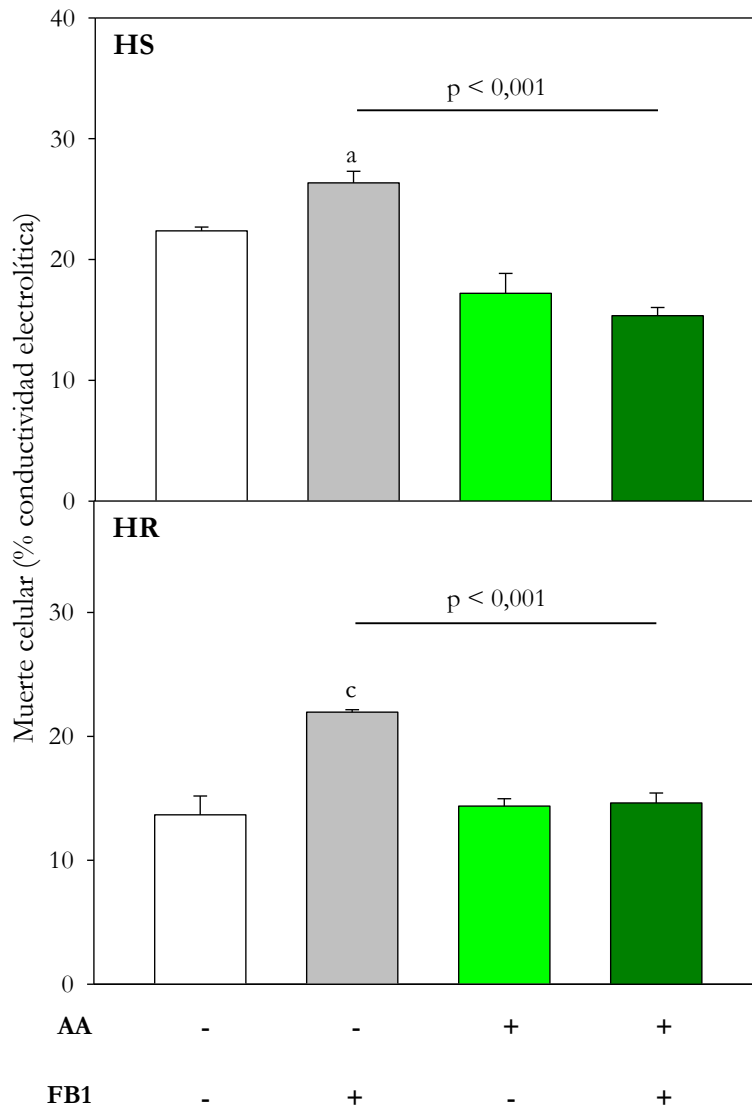


Figura 28. Efectos de 1 ppm de FB1 sobre la muerte celular en plántulas de maíz de HS y HR pre-tratadas o no con 1 mM de AA.

Se muestran los promedios \pm SEM. de conductividad electrolítica (%).

^a $p < 0,05$, ^c $p < 0,001$ indican diferencias con el control; p-valor indicado en el gráfico indica diferencias entre los tratamientos FB1 *vs* AA + FB1.

3-4-2- Cuantificación de H₂O₂.

En la Fig. 29 se observa que 1 ppm de toxina aumentó los niveles de H₂O₂ en ambos híbridos a las 24 hpt, pero el pre-tratamiento con el antioxidante disminuyó significativamente los niveles de esta ERO, tanto en HS como en HR.

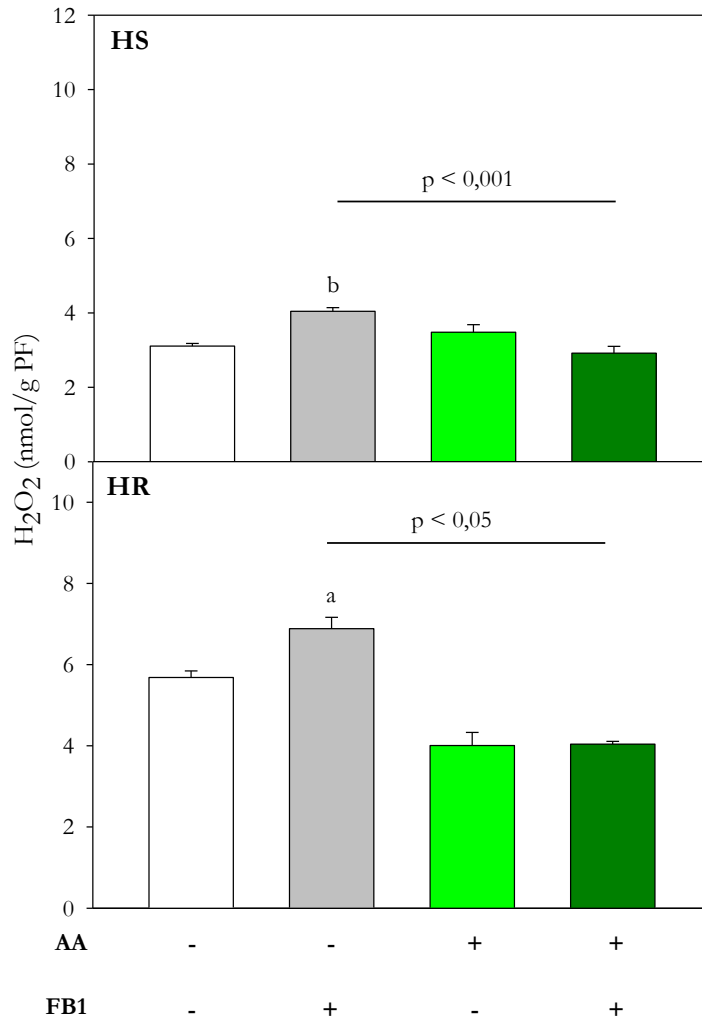


Figura 29. Efectos de 1 ppm de FB1 sobre el contenido de H₂O₂ en plántulas de maíz de HS y HR pre-tratadas o no con 1 mM de AA.

Se muestran los promedios \pm SEM del contenido de H₂O₂.

^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$. indican diferencias con el control; p-valor indicado en el gráfico indica diferencias entre los tratamientos FB1 *vs* AA + FB1.

3-4-3- Actividad de enzimas antioxidantes.

Como se observó en el Capítulo II, los efectos de 1 ppm FB1 fueron marcadamente diferentes entre ambos híbridos a las 24 hpt (Fig. 30). En el HS, la toxina inhibió tanto la actividad SOD como la GPOX en el tiempo ensayado, pero el pre-tratamiento de las plántulas de este híbrido con AA revirtió este efecto, provocando un aumento de ambas actividades enzimáticas luego de la exposición a la micotoxina. Por otro lado, en el HR la misma concentración de FB1 indujo aumentos significativos con respecto a los controles de las actividades de ambas enzimas antioxidantes. Pero el pre-tratamiento con el antioxidante revirtió los efectos provocados por la micotoxina, observándose

una disminución significativa tanto de SOD como de GPOX, con respecto a las plántulas del HR no tratadas con AA.

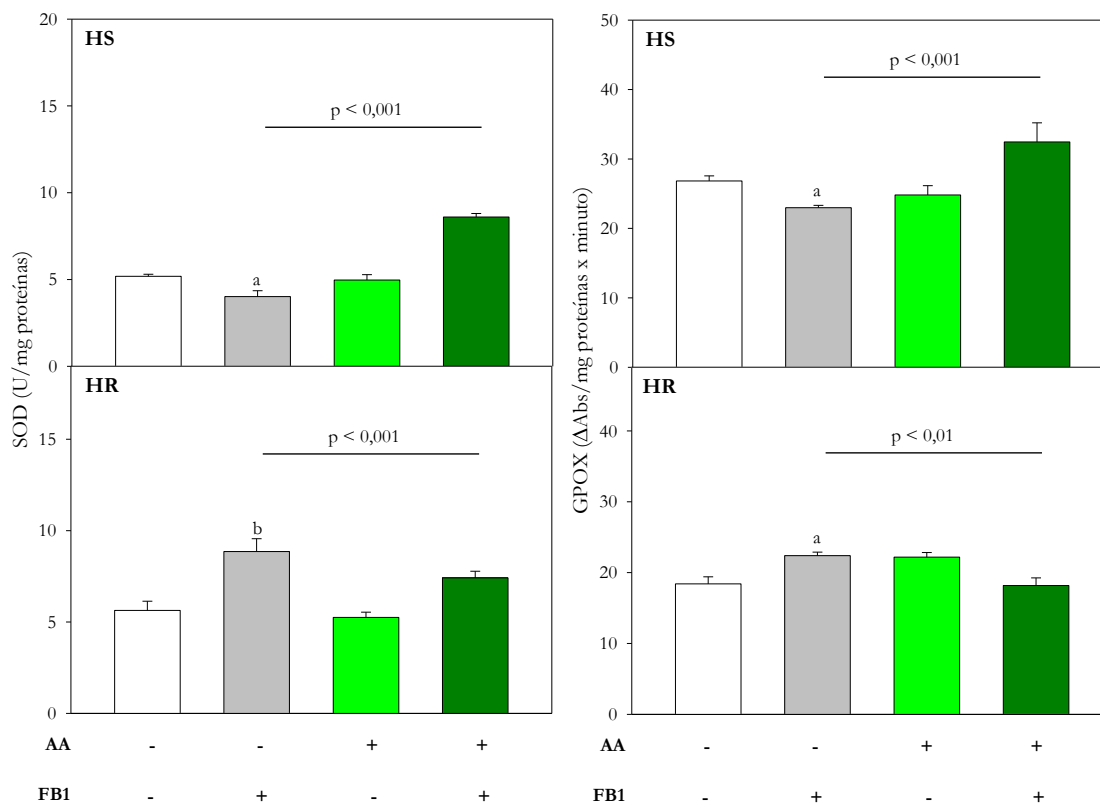


Figura 30. Efectos de 1 ppm de FB1 sobre la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y GPOX) en plántulas de maíz de HS y HR pre-tratadas o no con 1 mM de AA.

Se muestran los promedios \pm SEM de las actividades SOD y GPOX.

^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$ indican diferencias con el control; p-valor indicado en el gráfico señala diferencias entre los tratamientos FB1 vs AA + FB1.

3-4-4- Evaluación de Fitohormonas: ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ).

Con el objetivo evaluar los efectos moduladores de las ERO sobre las vías de señalización mediadas por fitohormonas en la muerte celular inducida por FB1, se cuantificaron los niveles de AS y AJ en plántulas de híbridos susceptibles y resistentes a la infección por *Fusarium verticillioides* a las 24 hpt. En la Figura 31 se muestra un cromatograma representativo (A) y los espectros de masas de estándares de 1 ppm de AS (B) y 0,75 ppm de AJ (C).

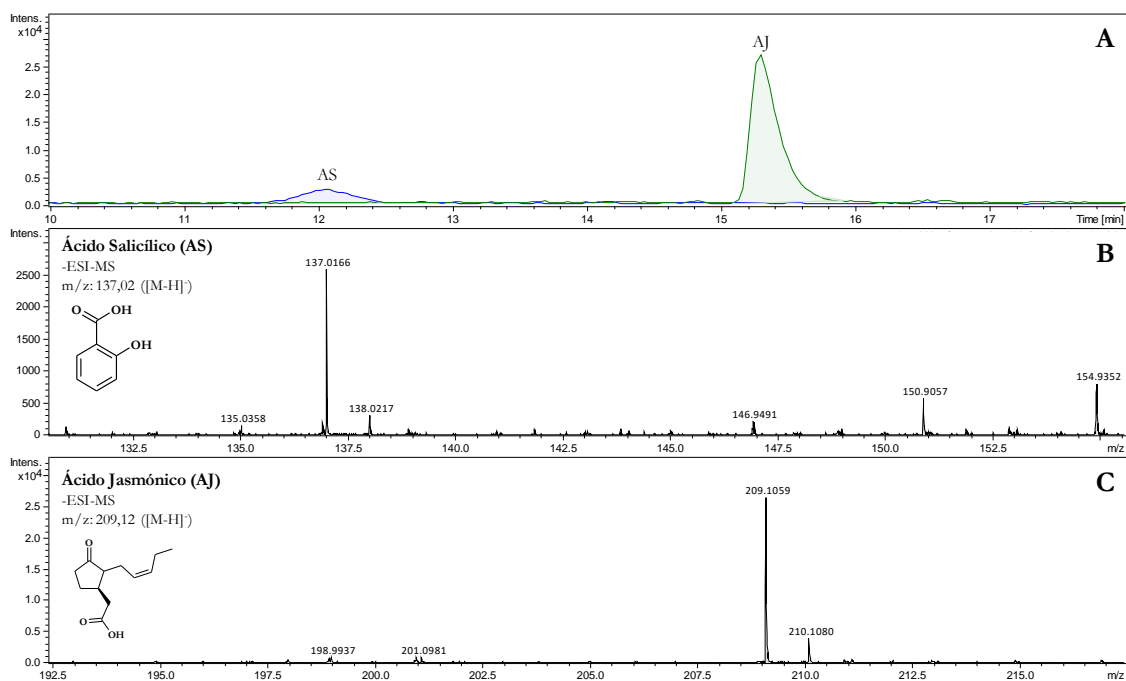


Figura 31. Cromatograma (A) y espectro de masas del AS (B) y del AJ (C).

En la Fig. 32 se muestra que en el HS la toxina (1 ppm) no indujo cambios en los niveles de AS, mientras que produjo una disminución del AJ. Por otro lado, el pre-tratamiento con AA tampoco generó cambios significativos en la concentración de AS, mientras que indujo un aumento de los niveles de AJ luego de la exposición a FB1 con respecto a las plántulas sin pre-tratamiento con el antioxidante. En HR, la misma concentración de toxina causó efectos opuestos en los niveles de AS y AJ (aumento y disminución, respectivamente). El pre-tratamiento con el antioxidante provocó una disminución en los niveles de AS, mientras que no indujo cambios significativos en la concentración de AJ con respecto a las plántulas sin pre-tratamiento con AA y expuestas a FB1.

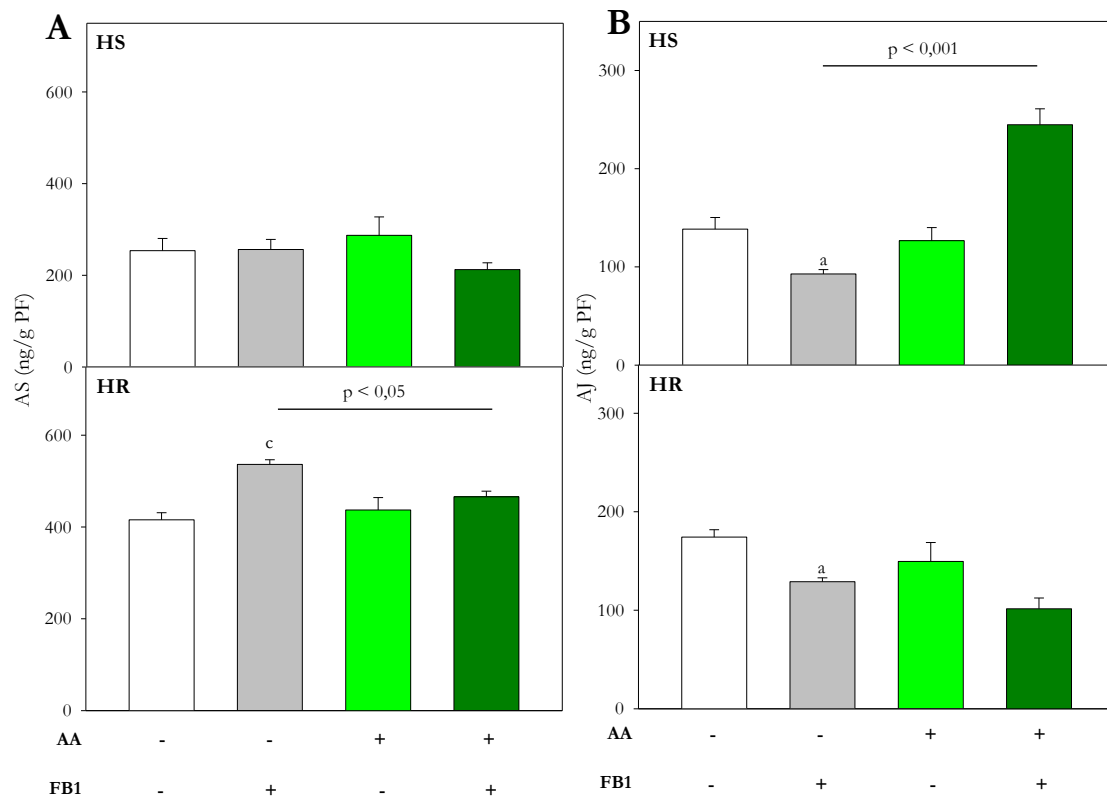


Figura 32. Efectos de 1 ppm de FB1 sobre el contenido de AS y AJ en plántulas de maíz de HS y HR pre-tratadas o no con 1 mM de AA.

PF, peso fresco. Se muestran los promedios \pm SEM del contenido de AS (A) y AJ (B).

^a $p < 0,05$, ^c $p < 0,001$ indican diferencias con el control; p-valor indicado en el gráfico señala diferencias entre los tratamientos FB1 *vs* AA + FB1.

3-4-5- Conclusiones del capítulo IV:

- ✓ La muerte celular inducida por FB1 en híbridos de maíz susceptibles y resistentes a la infección por *F. verticillioides* estaría mediada por ERO.
- ✓ En el HS, el exceso de las ERO inducirían una saturación de la actividad de las enzimas antioxidantes.
- ✓ En HR la muerte celular se produciría por un mecanismo dependiente de AS e independiente de AJ; mientras que en HS la muerte sería por una vía independiente de AS y dependiente de AJ.

4- DISCUSIÓN

4-1- Fitotoxicidad crónica de FB1 en plantas de maíz.

La FB1 puede ser fitotóxica para muchas variedades de plantas y alcanzar los tejidos vegetales mediante al menos dos mecanismos. Por un lado, los hongos productores de FB1 sintetizarían la toxina en los tejidos que colonizan, donde podría ejercer su acción tóxica e incluso diseminarse a sitios distales dentro de la planta. Además de este mecanismo, teniendo en cuenta que FB1 puede encontrarse en rastrojos de maíz contaminado (Abbas *et al.*, 2008) y en agua de drenaje cercana a las tierras para cultivo (Waskiewicz *et al.*, 2015), en nuestro grupo hemos demostrado que esta micotoxina es absorbida por las raíces y distribuida a los tejidos aéreos. Esto podría debilitar las plántulas de maíz, aún en ausencia de infección fúngica, lo cual condicionaría la evolución de la interacción hongo-planta aún antes del primer contacto del maíz con el patógeno (Arias *et al.*, 2016).

Entre sus efectos tóxicos, la muerte celular desencadenada por FB1 ha sido muy estudiada en *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental. Stone y cols. (2000) observaron que plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medio de cultivo Murashige and Skoog (MS) y luego transferidas a medio MS con FB1 (0 a 10 μM) durante 4 días, desarrollaron lesiones necróticas en forma dosis-dependiente, las que fueron evidentes a concentraciones $\geq 0,1 \mu\text{M}$ de toxina. Además, estos investigadores demostraron que la infiltración de hojas de *Arabidopsis* con 10 μM de FB1 produjo la muerte de las hojas tratadas y la formación de lesiones del tipo de respuesta hipersensible (RH), distantes al sitio de infiltración. Además, plántulas de *Arabidopsis* crecidas en maceta y rociadas en la parte aérea con FB1 (5 y 70 μM), desarrollaron síntomas de enfermedad (Abbas *et al.*, 1994). En conjunto, estos resultados demuestran que la muerte celular inducida por FB1 es independiente de la vía de ingreso de la micotoxina a la planta.

En este trabajo observamos que FB1 indujo diferentes perfiles de muerte entre HR y HS los cuales dependieron, además, de la concentración de micotoxina y el tiempo de exposición. La muerte celular puede ser inducida por las micotoxinas como parte de la estrategia del hongo para invadir la planta. En este estudio observamos cambios en la CE, los cuales dependieron de la concentración de FB1, el híbrido y la edad de la planta. Los mayores niveles de CE inducidos a los 14 dps en el HR regado con 1 ppm de FB1 (Fig. 9), probablemente muestran que la toxina causa la pérdida de la integridad de la membrana plasmática llevando al aumento de la permeabilidad de los iones como el último paso de la muerte celular. Un resultado similar pudo observarse a los 21 dps en el HS regado con 20 ppm de FB1. Sin embargo, mientras que en el primer caso (HR regado con 1 ppm de FB1) el aumento de la CE fue transitorio, no podemos aclarar si en el HS este parámetro retorna a valores comparables con el control luego del último tiempo final evaluado. Tampoco está claro el significado de la disminución de la CE observada a los 14 dps en el HS. Conjuntamente, estos resultados muestran que FB1 es un inductor de la muerte celular en plántulas de maíz independientemente de la susceptibilidad o resistencia de los híbridos a la podredumbre de la mazorca por *Fusarium verticillioides* en el campo, aunque la gravedad y la cinética de su fitotoxicidad podría depender del *background*

genético del hospedador. Estos resultados son concordantes con los informados previamente por Williams y cols. (2007), quienes observaron que plántulas de maíz regadas con FB1 (1,4 a 27,7 μM), mostraron retraso del crecimiento y lesiones necróticas en las hojas de las plántulas regadas con concentraciones $\geq 6,9 \mu\text{M}$ de toxina y cosechadas a los 21 dps, apareciendo por primera vez el día 13 dps. Además, la proporción de lesiones necróticas por planta fue dependiente de la dosis. En un trabajo previo desarrollado en nuestro grupo, donde se utilizaron los mismos híbridos de maíz y la misma cepa de *F. verticillioides* usadas en esta tesis, se observaron zonas de necrosis en las hojas y raíces tanto en plántulas maíz de HR y HS infectadas por el hongo, como las no infectadas pero regadas con la toxina, sugiriendo que FB1 podría participar activamente en la muerte celular desencadenada en las plántulas de maíz infectadas por *F. verticillioides* (Arias *et al.*, 2012). Por lo tanto, desde un enfoque centralizado en el hongo, la citotoxicidad de la micotoxina podría ser aprovechada para una posterior invasión fúngica de los tejidos vegetales y el desarrollo de las lesiones foliares. Otros trabajos muestran que la muerte celular inducida por FB1 no sólo sería importante en plantas que ya han emergido. Al respecto, de la Torre-Hernandez y cols. (2010) observaron que 10 μM de toxina afecta la germinación de embriones de maíz provocando muerte celular a las 48 horas post-tratamiento.

La susceptibilidad o resistencia a la infección por *F. verticillioides* está relacionada, además, con la capacidad de los distintos híbridos para desarrollar mecanismos tendientes a controlar la invasión fúngica, detoxificar, o al menos limitar la toxicidad de FB1. En este sentido, Arias y cols. (2016) observaron que en híbridos susceptibles y resistentes de maíz regados con 20 ppm de FB1, la toxina fue tomada por las raíces a partir del suelo, pudiéndose distribuir hacia otras partes de la plántula, aunque localizándose preferencialmente en raíces. Además, la concentración de FB1 fue mayor en HS que en HR, en ambos tejidos evaluados. Estos resultados sugieren que las plántulas de maíz tendrían mecanismos de detoxificación o eliminación de la toxina, los cuales serían más eficientes en híbridos resistentes.

FB1 causó estrés oxidativo en plántulas de ambos híbridos de maíz. Las ERO producidas por la planta en respuesta a la presencia de FB1 pueden desencadenar mecanismos que inducen la muerte celular. Xing y cols. (2013) sugieren que las ERO tienen un rol dual en los procesos de muerte celular inducida por FB1 en *Arabidopsis*. Por un lado, actúan oxidando componentes celulares y, por otro lado, pueden servir como segundos mensajeros que regularían mecanismos que llevan a la muerte celular del tipo RH desencadenada por FB1. Al respecto, mutantes *fbr11-1* (*fumonisin B1 resistant11-1*) de *Arabidopsis*, los cuales fallan en la generación de ERO, son incapaces de iniciar la muerte celular programada cuando son tratados con FB1 (Shi *et al.*, 2007). Esto sugiere que las ERO serían moléculas importantes en la señalización que lleva a la muerte de la planta mediada por la micotoxina.

Por otro lado, la susceptibilidad/resistencia de los híbridos de maíz a la fitotoxicidad de FB1 estaría dada, al menos en parte, por la distinta capacidad de amortiguar la producción ERO luego de la exposición de las plántulas a la micotoxina. Maschietto y cols. (2016) observaron que un genotipo

resistente a la infección por *Fusarium* spp. tuvo mayores niveles basales de enzimas antioxidantes comparado con otro susceptible. Sin embargo, los resultados de este trabajo de tesis no están en línea con los publicados por estos investigadores, ya que en el híbrido susceptible se registraron mayores niveles basales de enzimas antioxidantes (Fig. 11 y 12). Esto podría explicarse, al menos en parte, por la diferencia de los genotipos de maíz utilizados en nuestro sistema experimental (HR: LT621MG y HS: HX31P77) en comparación a los usados por estos investigadores (HR: CO441 y CO433; HS: CO354 y CO389). Si bien en ambos trabajos se emplearon genotipos definidos como “susceptibles” y “resistentes”, en la actualidad no hay híbridos de maíces comerciales ni líneas endogámicas completamente resistentes. Con respecto a esto, en general los distintos germoplasmas de maíz responden de diferente manera a la infección por *Fusarium* spp. Se ha observado la existencia de algunos híbridos susceptibles y de otros que presentan mayor o menor resistencia a la fitopatología causada por este género fúngico (Lanubile *et al.*, 2011). Además, la resistencia a la podredumbre de espiga causada por *Fusarium* spp. está bajo control poligénico y se encuentra fuertemente influenciada por factores ambientales (Presello *et al.*, 2006). Asimismo, junto con los componentes enzimáticos, otros componentes del sistema antioxidante contribuyen para conservar los niveles basales de ERO y a mantener el balance redox (Foyer and Noctor, 2011). Por otro lado, Maschietto y cols. (2016) observaron que las actividades de las enzimas antioxidantes aumentan con mayor rapidez en el genotipo resistente luego de la inoculación con *F. verticillioides*, lo cual está en concordancia con los resultados informados en esta tesis, donde las actividades de las enzimas antioxidantes aumentaron, en términos generales, en las plántulas del HR regadas con FB1. Por lo tanto, la eficiencia en la inducción de los componentes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante sería una característica que le otorga una mayor resistencia al híbrido de maíz a la fitotoxicidad de FB1.

La respuesta integrada de biomarcadores permitió obtener una visión holística del estrés producido por FB1. Asimismo, el tipo de híbrido y la concentración de toxina condicionaron la cinética de evolución del estrés. Los valores de RIB mostraron que 1 ppm de FB1 generó niveles de estrés significativamente menores a 20 ppm, excepto a los 21 dps en el HR. En el HS los resultados discutidos anteriormente señalan que el híbrido mantiene a lo largo del tiempo los niveles de estrés, observándose pocas variaciones (Fig. 15). En cambio, en el HR la respuesta expresada a esta concentración resultó diferente. En este híbrido, los niveles de estrés fueron semejantes a los 7 y 14 dps, mientras que al mayor tiempo de exposición a 1 ppm de FB1, el estrés se incrementó significativamente. Esto último, podría estar indicando la activación parcial de mecanismos de respuesta temprana frente a estrés oxidativo o daño celular en este híbrido. Al aumentar el daño, como lo muestran los niveles de muerte celular a 14 dps, se podrían activar mecanismos suplementarios de defensa para disminuir los efectos de la toxina. Sustentando esta idea, se observó un incremento significativo de la actividad de una enzima antioxidante como la SOD, probablemente en un intento de disminuir los niveles de ERO y los daños a los 21 dps.

Por otra parte, con el riego de 20 ppm de FB1, el menor valor de RIB observado en las plántulas del híbrido resistente con respecto al susceptible a los 7 dps, sugiere que el HR activaría antes o más eficientemente los mecanismos de defensa antioxidante (Fig. 15). En este sentido, los resultados de este trabajo muestran que en el HR las actividades las enzimas antioxidantes (SOD y GPOX) aumentan significativamente en ambas partes de la planta los 7 dps, mientras que en el HS la SOD sólo aumenta en parte aérea y la GPOX en raíz (Fig. 11 y 12). A su vez, los niveles de H₂O₂ son comparativamente menores en el HR con respecto al HS (Fig. 10). Asimismo, la disminución del estrés a los 21 dps en el HR con la misma concentración de FB1 sugiere, que este híbrido respondería más eficientemente para disminuir los niveles de las ERO, lo cual genera un menor nivel de daño de los componentes celulares. Esto concuerda con la disminución de los niveles de H₂O₂ a lo largo del tiempo en la raíz, entre otros parámetros. Además, el HR, logró revertir a los niveles basales la peroxidación lipídica en el último tiempo final evaluado (Fig. 14), mientras que el genotipo susceptible aún presenta mayores niveles de este biomarcador a los 21 dps. Asimismo, los resultados de la CE discutidos anteriormente indican que el HR no desarrolla muerte celular; lo cual podría deberse, al menos parcialmente, a que la magnitud del estrés generado por la toxina estaría dentro de los límites de adaptación de la planta. En este sentido, se ha indicado que la muerte celular generada como consecuencia de un estrés oxidativo generalmente está bajo control genético. A su vez, la modulación de esas respuestas incluye la acción opuesta de señales pro- y anti- muerte celular. Esta última está vinculada a la inducción de genes relacionados a la defensa, incluyendo aquellos que codifican para la defensa antioxidante (Mullineaux and Baker, 2010). Como se mencionó anteriormente, el HR tiene en general una mayor actividad de enzimas antioxidantes luego de la exposición a FB1, por lo tanto este sería uno de los motivos por los cuales este híbrido tendría una mayor capacidad de respuesta ante la exposición crónica con la toxina, logrando disminuir con el tiempo los niveles de estrés. Estos resultados nos estarían indicando la importancia de realizar exposiciones a FB1 por un tiempo mayor a 21 dps con el objetivo de evaluar si el estrés desencadenado por 20 ppm de toxina, logra ser revertido completamente por el HR.

4-2- Toxicidad sobre la reproducción.

En el maíz, tanto la estructura reproductora masculina (androceo) como la femenina (gineceo) se encuentran en flores distintas en la misma planta. Se estima que la planta produce de 2 a 5 millones de granos de polen. La liberación del polen se produce antes que los estilos sean receptivos, pudiendo ocurrir como máximo un 5 % de autopolinización. El polen consiste en una célula vegetativa que contiene dos células espermáticas. Estas células espermáticas deben ser entregadas al óvulo a través del estilo, para lo cual el polen produce el tubo polínico, lo cual requiere para su elongación grandes cantidades de ácidos grasos y síntesis de lípidos de membrana (Ischebeck, 2016). Por lo tanto, las bases esfingoides son esenciales para el desarrollo del polen y la disrupción en la síntesis de estos componentes de la membrana, sería crítica para la formación del tubo polínico. Teniendo en cuenta que el desbalance del metabolismo de los esfingolípidos es un importante mecanismo implicado en la toxicidad de FB1 en células animales y vegetales, es probable que esta alteración contribuya en alguna medida a la fitotoxicidad de FB1 sobre la germinación del tubo polínico.

La FB1 indujo efectos tóxicos en el grano de polen provocando la inhibición de su germinación tanto en HS como en HR, siendo en este último híbrido en forma dosis-dependiente (Fig. 18). Sin embargo, la viabilidad de los granos de polen germinados no fue afectada por el tratamiento con FB1. Si bien hasta el momento no hay antecedentes de los efectos de FB1 sobre la polinización en maíz, se ha observado que otras toxinas de origen fúngico pueden alterar la biología de la reproducción. En este sentido, se observó que polen de *Lilium longiflorum*, incubado con 25 y 30 ppm de aflatoxina B1, la cual es una micotoxina producida por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, redujo la germinación del tubo polínico en 27,3 y 45,1 %, respectivamente (Jones *et al.*, 1980). Aparte de las toxinas fúngicas, metabolitos de otros microorganismos pueden ser tóxicos para la germinación de los granos de polen. Al respecto, la toxina cylindrospermopsina producida por la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*, inhibe la germinación del polen de tabaco en forma dosis dependiente (Metcalf *et al.*, 2004). Como se mencionó anteriormente, en maíz la FB1 puede ser absorbida por las raíces a partir de suelos contaminados o puede ser sintetizada en la planta luego de la infección con cepas micotoxigénicas de *F. verticillioides* y distribuirse a los tejidos distales (Arias *et al.*, 2016). Al ser una planta de polinización aérea, el polen podría entrar en contacto con una flor femenina que haya acumulado FB1 y por lo tanto, afectar la germinación del tubo polínico y consecuentemente la fecundación. Además, debido a que para la fertilización la mazorca requiere alrededor de 1000 granos de polen (Goss, 1968), y a pesar que la viabilidad del polen germinado no se vio afectada con FB1, la probable presencia de la toxina en los estilos provocaría disminución en el llenado de granos de la mazorca, ocasionando menores rindes de la producción de maíz.

En el HR, la toxina causó una inhibición completa de la germinación a menores concentraciones que en HS, sugiriendo que la toxicidad de la FB1 sobre la reproducción depende del genotipo del maíz. Varios mecanismos podrían contribuir a la resistencia o susceptibilidad de maíz y por lo tanto,

del polen de la planta a la fitotoxicidad por FB1. Ternes y cols. (2011) identificaron en *Arabidopsis thaliana* tres isoformas de Ceramida Sintetasa (LOH1, LOH2 y LOH3), donde LOH1 y LOH3 tienen alta homología y utilizan el mismo sustrato. LOH2 muestra mayor actividad *in vitro* hacia sustratos LCB (*long chain bases*) insaturados (d18:1 y d18:2) que por los saturados (d18:0) (Luttgeharm *et al.*, 2016). Además, en polen de *Arabidopsis* se ha descrito una mayor presencia de la CS LOH2 en comparación con LOH1 y LOH3 (Ischebeck, 2016; Luttgeharm *et al.*, 2016). Arias y cols. (2016) sugieren la existencia de al menos dos isoformas de CS en maíz con especificidad en diferentes sustratos: CS-I (LOH2) y CS-II (LOH1 y LOH3). A su vez, la afinidad de FB1 por las distintas isoformas podría estar estrechamente relacionada con la susceptibilidad/resistencia de los híbridos a *F. verticillioides*, donde la toxina induciría una mayor inhibición de CS-I en el HR y en CS-II en el HS. En consecuencia, la inhibición completa de la germinación del tubo polínico inducida a concentraciones menores de FB1 en el HR con respecto al HS (Fig. 17) podría deberse, al menos parcialmente, a que en polen de maíz también habría una mayor expresión de la CS LOH2 con respecto a las otras isoformas de la enzima. A su vez, en el genotipo resistente la micotoxina tendría una mayor afinidad por la CS LOH2, lo que provocaría que la FB1 genere una mayor toxicidad sobre el polen de este híbrido.

La FB1 induciría cambios en la composición de la membrana de los granos de polen, determinando la liberación del contenido celular, siendo este efecto dependiente de la concentración de toxina. Estudios previos muestran que la composición lipídica de las membranas de los granos de polen es crítica para que la germinación tenga lugar. En este sentido, mutantes nulas de la subunidad LCB2 de la enzima SPT (*serine palmitoyltransferase*), que cataliza el primer paso de la síntesis de las bases esfingoides de cadena larga, generan un polen no viable (Dietrich *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2008). Además, doble mutantes de los genes redundantes LCB2a t LCB2b en *Arabidopsis* fueron incapaces de transmitir *loci* mutantes a través de polen. Así, el polen carece de la capacidad biosintética de las bases esfingoides de cadena larga, mostrando un contenido reducido de los componentes del sistema endomembranas (RE y Golgi), y la ausencia asociada de la capa de intina de la pared del polen (Dietrich *et al.*, 2008). Adicionalmente, un mutante de inserción de ADN-T de ssSPT, que codifica la subunidad pequeña estimuladora principal de SPT dio como resultado un desarrollo de polen defectuoso (Kimberlin *et al.*, 2013). Por lo tanto, debido a que durante la elongación del tubo polínico se requiere la síntesis de una gran cantidad de lípidos de membrana, el desbalance que induce FB1 en el metabolismo de los esfingolípidos podría ser el principal contribuyente de la toxicidad de la micotoxina en el polen. Esto provocaría una alteración del sistema de membranas del polen, llevando a la ruptura de las mismas, con la extravasación del contenido del polen que observamos al microscopio óptico, y consecuentemente a la deficiencia en la germinación y elongación del tubo polínico (Fig. 16 y 17).

4-3- Fitotoxicidad aguda en plántulas de maíz.

En una etapa aguda de la interacción FB1-maíz, la toxina (1 y 20 ppm) provoca una respuesta bifásica en la muerte celular de las plántulas de ambos híbridos (Fig. 21): inhibición a las 6 hpt, y luego la inducción de la muerte a las 24 hpt, excepto con 20 ppm en HR donde a las 24 hpt la muerte se revierte a los niveles basales. Estos resultados se correlacionan con los reportados por Ding y cols. (2011), quienes observaron una respuesta bifásica en la expresión de genes que son críticos en la defensa en trigo inoculado con el hongo hemibiótrofo *F. graminearum*, sugiriendo que el nivel de resistencia de un híbrido es determinado por el momento en el que se activan las reacciones de defensa. En maíz, se observó que en la interacción de las plántulas y el hongo micotoxicogénico *F. verticillioides*, la cinética de respuesta de defensa de la planta se correlaciona con el crecimiento del patógeno y el contenido de FB1 en los tejidos. Además, se observó que el genotipo resistente limita más eficientemente y en una etapa más temprana, el crecimiento del hongo y la acumulación de FB1 (Maschietto *et al.*, 2015). Debido a que *F. graminearum* y *F. verticillioides* son hongos productores de FB1, estos resultados podrían sugerir que la toxina, si bien podría no ser esencial para la patogenicidad del hongo en maíz, contribuiría en su patogenicidad, aunque, por otro lado, induciría la activación de mecanismos de defensa en la planta con el objetivo de frenar el avance del hongo.

La toxina causó estrés oxidativo en ambos híbridos, pero los resultados en conjunto sugieren que, al igual que en la toxicidad crónica, en una interacción aguda maíz-FB1, el genotipo resistente controlaría más eficientemente los efectos tóxicos de las ERO. Las ERO generadas en una interacción aguda de la planta y el patógeno, serían importantes para lograr respuestas de resistencia eficientes, tanto locales como sistémicas. En este sentido, Alavarez y cols. (1998) reportaron que la inoculación de hojas de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae*, genera un estallido oxidativo primario en el sitio de infección lo que desarrolla una RH localizada. A su vez, observaron que se acumula H₂O₂ en pequeños grupos antes de las 2 horas posteriores al estallido oxidativo inicial en las hojas que no fueron inoculadas, lo cual es seguido por la formación de lesiones microscópicas del tipo de RH. También en *Arabidopsis* se ha reportado la producción aguda de las ERO luego de la exposición a FB1. Este sería uno de los pasos iniciales del mecanismo que lleva a la muerte celular programada (Saucedo-García *et al.*, 2011b). Por lo tanto, se puede sugerir que en el sistema maíz-FB1, la síntesis y acumulación de ERO, particularmente H₂O₂, sería uno de los pasos claves en la modulación de los mecanismos bioquímicos que llevan a la muerte celular. Además, la cinética con la cual se producen las ERO y la eficiencia para mantenerlas dentro de niveles que no sean tóxicos para la planta, serían importantes para generar respuestas de defensa necesarias para lograr resistencia y aclimatación en una exposición crónica a FB1 (y al patógeno *F. verticillioides*). En este sentido, los sistemas antioxidantes, dentro de los cuales se encuentran varias enzimas, son los que le permiten a la planta controlar el estrés producido por la acumulación de ERO. Al igual que en el modelo crónico de fitotoxicidad de FB1 sobre maíz, los niveles basales de las enzimas antioxidantes del HR utilizado en

este trabajo de tesis no son significativamente mayores que los del HS, lo cual no está en concordancia con lo reportado por otros investigadores (Lanubile *et al.*, 2013; Maschietto *et al.*, 2015). Sin embargo, al igual que los resultados informados en los trabajos de estos autores, los niveles de las actividades de las enzimas antioxidantes aumentan luego de la exposición de las plántulas del HR a FB1. Como discutimos anteriormente, este perfil también se observa en la exposición crónica de las plántulas con FB1. Por lo tanto, esta capacidad de activar rápidamente los componentes enzimáticos del sistema de defensa antioxidante luego de la exposición a la toxina, y además mantenerlos activos cuando el estrés se mantiene en el tiempo, sería una característica intrínseca del híbrido que le otorga mayor resistencia a la fitotoxicidad causada por la micotoxina.

En el HR, la muerte celular se produciría por un mecanismo dependiente de AS; mientras que en el HS la muerte sería por una vía independiente de esta fitohormona. En *Arabidopsis* spp., se ha demostrado que la muerte celular causada por la infiltración de hojas con 10 μ M (0,01 ppm) de FB1, se produciría por una vía dependiente de AS (Xing *et al.*, 2013). Ding y cols. (2011) propusieron que la demora en la activación de los mecanismos de defensa mediados por AS se asocia con susceptibilidad de un híbrido de trigo a la infección por *F. graminearum*. En embriones de maíz incubados con FB1 se observaron aumentos significativos de AS a partir de las 36 horas de exposición, los cuales fueron dependientes de la dosis de toxina. Este aumento de AS, estuvo acompañado de una inducción de la muerte celular de los embriones incubados con la toxina (de la Torre-Hernandez *et al.*, 2010). Se ha observado que la exposición de plántulas de *Arabidopsis* spp. a FB1 reduce el contenido de AJ (Zhang *et al.*, 2015). Además, la aplicación exógena de AS potencia la supresión de la vía del AJ luego del tratamiento con FB1. Esto sugiere que la activación de la vía del AS por la acción de FB1 inhibe la vía del AJ, lo cual contribuiría a la respuesta de defensa de la planta contra la toxina (Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, algunos fitopatógenos pueden manipular, a partir de la producción de toxinas, los mecanismos mediados por las fitohormonas con el objetivo de tener acceso a los nutrientes y contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. En este sentido, se ha demostrado que la toxina coronatina sintetizada por *Pseudomonas syringae* simula al ácido jasmónico e isoleucina, e inhibe la acumulación de AS en *Arabidopsis* spp., lo cual es esencial para la resistencia a la bacteria (Kloek *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2012).

Al igual que en el modelo en maceta, donde evaluamos los efectos crónicos de la exposición de FB1 sobre el maíz, los resultados de la respuesta integrada de biomarcadores sugieren que la concentración de toxina y el *background* genético de los híbridos fueron determinantes del perfil de estrés inducido en la exposición aguda de las plántulas de maíz a FB1. Los resultados de la RIB (Fig. 27) muestran que en el HR la menor concentración de toxina induce mayores niveles de estrés con respecto a la concentración de 20 ppm, mientras que en el HS la misma concentración de toxina también induce estrés, pero comparativamente menor al generado en el genotipo resistente. Sin embargo, los valores de la RIB a las 24 hpt son significativamente menores que a las 6 hpt en HR, lo

que mostraría que este híbrido estaría activando mecanismos de defensa antioxidantes con el objetivo de disminuir el estrés generado por la toxina. Esto está en concordancia con los resultados discutidos anteriormente, donde observamos que las actividades de las enzimas antioxidantes (SOD y GPOX) aumentan a las 6 hpt sólo en parte aérea, pero a las 24 hpt este aumento se observa en ambas partes de la plántula para la GPOX y en parte aérea para la SOD (Fig. 23 y 24). Por otro lado, los niveles de estrés inducidos por FB1 (1 ppm) en el HS, comparativamente se mantuvieron constantes entre los distintos tiempos evaluados (Fig. 27). A su vez, en este híbrido los niveles de las actividades de las enzimas antioxidantes fueron significativamente menores al control en toda la plántula, tanto a las 6 como a las 24 hpt. A pesar de estas diferencias, la concentración baja de toxina induce muerte celular en ambos híbridos a las 24 hpt, pero sólo en el HR este resultado está en concordancia con los mayores niveles de AS. Por otro lado, los menores valores de RIB observados en la exposición a 20 ppm de toxina en el HR con respecto al HS, indican que FB1 genera menos estrés en el genotipo resistente. Al igual que en el modelo crónico de exposición a la misma concentración de micotoxina, en una interacción aguda maíz-FB1 el HR activaría mecanismos de defensa antioxidantes con mayor rapidez y eficiencia que el HS. En este sentido, los resultados discutidos anteriormente mostraron una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, particularmente a las 24 hpt. Coincidentemente, a ese mismo tiempo el HR revierte los niveles de muerte celular a valores comparables al control, mientras que, en el genotipo susceptible la toxina induce muerte celular (Fig. 21). En conjunto, los resultados obtenidos por la exposición de ambos híbridos con FB1 (1 y 20 ppm de FB1), sugieren que la velocidad con la que se activan los mecanismos de defensa, particularmente las enzimas antioxidantes, también serían importantes en una interacción aguda del sistema maíz-FB1. Esto estaría condicionando la cinética de evolución del estrés inducido por la toxina en la planta y, por consiguiente, le otorgaría al híbrido mayor resistencia a la fitotoxicidad de FB1.

4-4- Efecto modulador de las ERO sobre las vías de señalización mediada por AS y AJ en la muerte celular inducida a tiempos cortos por FB1.

Varios mecanismos pueden estar alterados por la exposición a FB1 en plantas, pero cómo convergen en la muerte celular inducida por la toxina, aún no está totalmente claro. En *Arabidopsis spp.*, se ha visto que la muerte celular inducida por FB1 produce la disrupción de la membrana vacuolar, seguida de la formación de lesiones. A su vez, la enzima de procesamiento vacuolar (*vacuolar processing enzyme*, VPE) sería clave en la muerte celular inducida por la toxina en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Kuroyanagi *et al.*, 2005). FB1 inhibe competitivamente la Ceramida Sintetasa (CS), lo cual produce desbalance de los lípidos que están involucrados en procesos de muerte celular programada (Saucedo-García *et al.*, 2011a). Por otro lado, Arias y cols. (2016) observaron que el riego de plántulas de maíz de híbridos susceptibles y resistentes a la infección por *F. verticillioides* con 20 ppm de FB1, produce aumento de los niveles de esfinganina (Sa) y fitoesfingosina (Pso) en ambos híbridos. Sin embargo, en el HR la toxina induce un mayor incremento de Sa, mientras que en HS se produce un mayor aumento de fitoesfingosina (Pso). Teniendo en cuenta que Saucedo García y cols. (2011a) reportaron que Sa induce muerte celular programada mientras que Pso no, Arias y cols. (Arias *et al.*, 2016) sugirieron que el aumento de Sa en el genotipo resistente de maíz podría activar mecanismos de muerte celular localizada con el objetivo de eliminar el patógeno, llevando a una respuesta de defensa fenotípicamente resistente. Por otro lado, el incremento de los niveles de Pso inducido por la toxina en el genotipo susceptible podría estimular mecanismos bioquímicos ineficientes para eliminar el patógeno, llevando así a un fenotipo susceptible a la patogénesis por *Fusarium spp.*

Sin embargo, además del desbalance lipídico, varios mecanismos pueden contribuir a la resistencia/susceptibilidad de las plántulas de maíz. En este sentido, las ERO podrían tener un papel importante en la regulación de los mecanismos que llevan a la muerte celular y también en la modulación de los distintos procesos que podrían determinar la susceptibilidad/resistencia de un híbrido. En *Arabidopsis* se determinó que el desbalance lipídico inducido por FB1 genera altos niveles de ERO, llevando a la MCP, sugiriendo que las ERO actuarían como transductores de la muerte celular mediada por el desbalance lipídico generado por FB1 (Saucedo-García *et al.*, 2011b). En hojas de *Arabidopsis* infiltradas con 10 μ M (0,01 ppm) de FB1, la toxina genera muerte celular con características de RH, donde se produce una acumulación de ERO en los márgenes de la lesión (Stone *et al.*, 2000). Por otro lado, Xing y cols. (2013) sugieren que el aumento de las ERO por el estrés generado por FB1 proviene principalmente de los cloroplastos y que la pérdida de la integridad del cloroplasto precedido de la ruptura vacuolar y el colapso celular, podrían ser los pasos iniciales que desencadenan la respuesta hipersensible mediada por las ERO. Por lo tanto, sería importante identificar los mecanismos que podrían ser modulados por las ERO tras la exposición del maíz a FB1.

En este trabajo de tesis, observamos que las ERO tendrían un papel clave en la inducción de la muerte celular por FB1 tanto en híbridos susceptibles como resistentes de maíz. La acumulación de ERO en la planta, además de generar daño celular puede actuar como segundo mensajero activando o inhibiendo mecanismos de respuesta mediados por fitohormonas (Kwak *et al.*, 2006). En este sentido, las ERO generadas como consecuencia del estrés producido en la interacción maíz-FB1, modulan en forma diferente las vías del AS y AJ en ambos híbridos. Se ha demostrado que el pre-tratamiento de hojas de *Arabidopsis thaliana* con secuestrantes de las ERO como el ácido ascórbico y la posterior infiltración con 10 μM (0,01 ppm) de FB1 reduce los niveles de AS inducidos por la toxina, lo que sugiere que la síntesis de esta fitohormona podría ser incrementada por la producción de las ERO (Xing *et al.*, 2013). Asai y cols. (2000) demostraron que la muerte celular inducida por FB1 en protoplastos de *Arabidopsis* requiere de vías de señalamiento dependientes de AS, AJ y ET. Esto sería dependiente de la luz, por lo que los autores proponen que las ERO generadas durante la fotosíntesis estarían involucradas en los procesos de muerte celular. Otros trabajos como el de Koornneef y Pieterse (2008) demuestran que la acumulación endógena de AS antagoniza las respuestas dependientes de AJ, priorizando la resistencia mediada por AS.

El AS podría modular los mecanismos de defensa antioxidante. Se ha demostrado que en plántulas de *Arabidopsis*, niveles altos de AS se asocian con mayores contenidos de glutatión reducido (GSH), sugiriendo una correlación entre el contenido de AS, H_2O_2 y GSH en plantas, lo cual implica que esta fitohormona tiene un rol esencial en procesos de aclimatación y de regulación de la homeostasis redox de la célula (Mateo *et al.*, 2006). Asimismo, el AS mejora la resistencia al estrés por bajas temperaturas en sandía, incrementando las actividades de las enzimas guayacol peroxidasa, ascorbato peroxidasa y superóxido dismutasa (Jing-Hua *et al.*, 2008).

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes observada en plántulas de maíz del HR (Fig. 30), se correlaciona con el aumento del AS (Fig. 32 A) y de H_2O_2 (Fig. 29), lo que sugiere que esta fitohormona estaría contribuyendo a mantener el balance redox de la plántula.

Como se discutió en los modelos experimentales de fitotoxicidad crónica y aguda de FB1, las menores actividades de las enzimas SOD y GPOX en el genotipo susceptible de maíz luego de la exposición a la micotoxina, sería una característica intrínseca del híbrido. Sin embargo, las ERO estarían contribuyendo negativamente en la actividad de enzimas antioxidantes luego del tratamiento con la toxina en el HS, debido a que los resultados del pre-tratamiento sobre este híbrido con ácido ascórbico y posterior exposición a FB1, muestran un aumento de ambas actividades enzimáticas (Fig. 30). En este sentido, es posible que en el HS las ERO generadas como consecuencia del estrés oxidativo inducido por FB1, estén produciendo una saturación de los componentes enzimáticos del sistema antioxidante. Sin embargo, no se descarta que otros mecanismos de detoxificación puedan

estar actuando en este híbrido con el objetivo de disminuir las ERO, entre ellos los componentes no enzimáticos del sistema antioxidante (Foyer and Noctor, 2008; 2011; Pavet *et al.*, 2005).

A partir de estas consideraciones, se proponen distintos mecanismos bioquímicos involucrados en la muerte celular inducida por FB1 en los híbridos de maíz susceptible y resistente usados en este trabajo (Fig. 28).

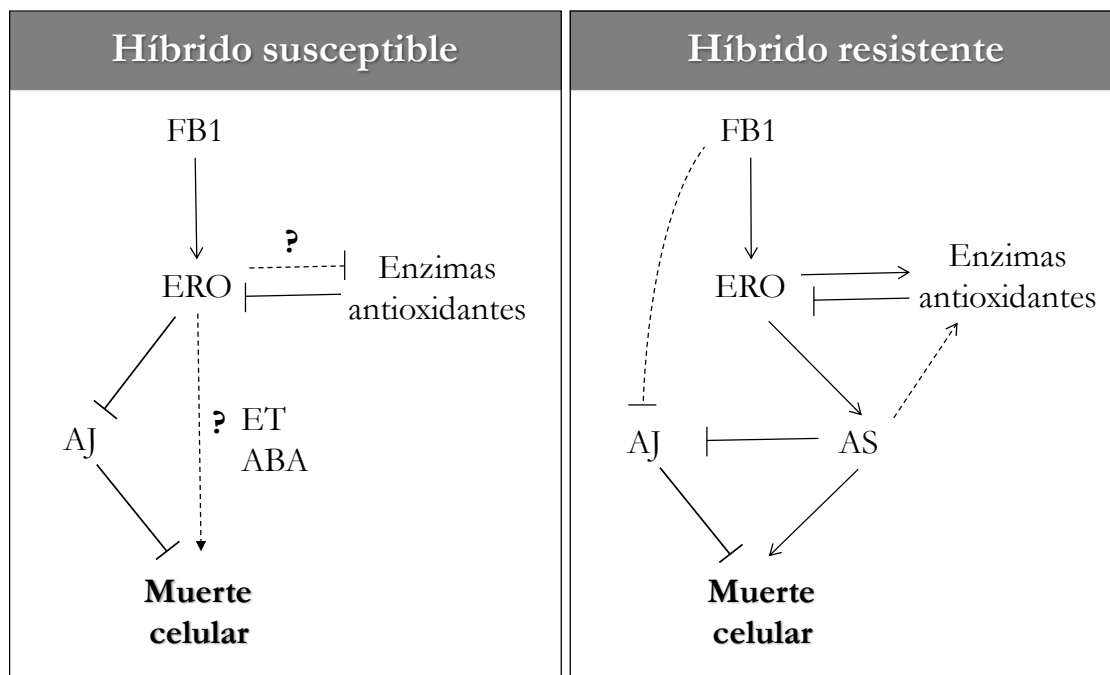


Figura 28. Mecanismos bioquímicos involucrados en la muerte celular inducida por FB1 en los híbridos susceptible y resistente de maíz. Ver explicación en el texto.

En una interacción aguda maíz-FB1, la toxina aumenta los niveles de ERO tanto en el genotipo susceptible como en el resistente. Estas ERO además de generar estrés oxidativo, modularían mecanismos en forma diferencial entre ambos híbridos. En el HS, las ERO afectarían las defensas antioxidantes, probablemente generando una saturación de la actividad de sus componentes enzimáticos. Esto no permitiría que se contrarreste la producción y los efectos tóxicos de las ERO en la célula, induciendo la muerte celular. Por otro lado, el aumento de ERO inhibiría la síntesis del AJ, fitohormona que está involucrada en eventos que previenen la muerte celular. A su vez no se descarta la activación de la síntesis de fitohormonas inductoras de la MCP distintas de AS, como ser ABA o ET.

Por otro lado, en el HR el estrés oxidativo generado por las ERO estaría más contenido por las células de la planta debido a la mayor actividad de las enzimas antioxidantes. Por otra parte, las ERO inducirían la síntesis del AS, fitohormona involucrada en la inducción de la muerte celular. Como fue

discutido anteriormente, el AS podría tener un efecto positivo en las actividades de las enzimas antioxidantes. A su vez, el aumento de los niveles de AS, generaría la inhibición de la vía del AJ, la cual también estaría inhibida directamente por la FB1.

Los mecanismos de defensa que se activan en el primer contacto de la planta con FB1, como respuesta al estrés inducido por la toxina, serían determinantes sobre el destino de la planta, ya que le permitirían generar un balance entre respuestas de aclimatación y de muerte celular. En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que entre los efectos agudos de la interacción de la planta con FB1, las ERO tienen un rol dual en la muerte celular inducida por la micotoxina. Por un lado, generando estrés oxidativo y por otro modulando mecanismos que involucran a las fitohormonas con el objetivo de activar respuestas de defensa tendientes a eliminar o al menos disminuir los efectos fitotóxicos de FB1. Asimismo, la susceptibilidad/resistencia de un híbrido de maíz estaría dada por la distinta capacidad de contener el estrés generado por la toxina y por la distinta modulación de las vías del AS y AJ por parte de las ERO.

Los resultados de este trabajo muestran que FB1 es un factor que puede contribuir a la patogénesis de las infecciones del maíz por *F. verticillioides*, induciendo muerte celular como consecuencia del estrés oxidativo, por mecanismos mediados por AS y AJ. Desde otro enfoque, la FB1 que contamina los suelos puede debilitar a las plantas de maíz aumentando su susceptibilidad a patógenos. Además, independientemente de la fuente de FB1 (infección o absorción desde el suelo), la micotoxina alteraría la reproducción de maíz inhibiendo la germinación de los granos de polen, sin descartar otros posibles mecanismos.

5- MATERIALES Y MÉTODOS

5-1- MATERIALES.

5-1-1- Reactivos.

Las fumonisinas se adquirieron en PROMEC (Programme on Mycotoxins and Experimental Carcinogenesis, Tygerberg, Republic of South Africa). En los ensayos en macetas 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. Los solventes grado HPLC (metanol y acetonitrilo) fueron adquiridos a Sintorgan, Buenos Aires, Argentina. Las otras drogas y solventes utilizados en los distintos ensayos fueron de calidad pro-análisis. 2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT), nitroazul de tetrazolio (NBT), 1,1,3,3-tertrametóxipropano (TEP, ≥ 97 %), ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, ≥ 98 %), superóxido dismutasa (SOD), guaiacol, ácido tricloroacético (TCA), (\pm) ácido jasmónico (AJ), y ácido salicílico (AS) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina. El reactivo de Bradford se obtuvo de Laboratorios Bio-Rad (Buenos Aires, Argentina). Para la preparación de soluciones estándares, diluciones y blancos se utilizó agua ultra-pura (Millipore, sistema Milli-Q).

5-1-2- 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 15 minutos de autoclavado a 121 °C.

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 medio tuvo la siguiente composición (en g): Glucosa 10,00; peptona 5,00; KH_2PO_4 1,00; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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.

Myro líquido. Se utilizó para la producción de fumonisinas en biorreactor. El medio tuvo la siguiente composición: 1g $(NH_4)_2HPO_4$, 3g KH_2PO_4 , 2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5g NaCl, 40 g sacarosa, 10 g glicerina; en 10 L de agua destilada. La esterilización se realizó mediante 15 minutos de autoclavado a 121 °C.

5-1-3- Soluciones.

Medio de germinación (MG) de tubos polínicos. Se utilizó para los ensayos de fitotoxicidad de FB1 en polen. El medio tuvo la siguiente composición: 300 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 100 mg/L H_3BO_3 y 12 % sacarosa.

Solución de hidroponia. La solución tuvo la siguiente composición: 2,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,0 mM K_2SO_4 , 0,2 mM KH_2PO_4 , 0,6 mM MgSO_4 , 5,0 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl , 1,0 μM H_3BO_4 , 2,0 μM MnSO_4 , 0,5 μM ZnSO_4 , 0,3 μM CuSO_4 , 0,005 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 200 μM Fe-EDTA (Zörb *et al.*, 2013).

5-1-4- Genotipos de maíz y 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* (Presello *et al.*, 2009).

Para la realización de los estudios se seleccionaron lotes de semillas de maíz que mostraron ausencia de infección, mediante la técnica de plaqueo. Una vez desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito, las semillas se dispusieron en placas con medio de agar 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 fueron realizados sobre plántulas de maíz en período de crecimiento vegetativo (V), entre las etapas VE (emergencia de las plántulas) y V4 (4^o etapa del crecimiento vegetativo, 4-6 hojas visibles) y en granos de polen (fase reproductiva).

5-1-5- Cepa fúngica.

Los experimentos se realizaron con la cepa RC2024 de *F. verticillioides*, 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, y se conservó a -80 °C en glicerol estéril al 15 %.

La toxicogénesis de la cepa *F. verticillioides* RC2024 fue evaluada previamente en nuestro laboratorio utilizando maíz como sustrato, habiéndose sintetizado las fumonisinas FB1:FB2:FB3 en la proporción 88:5:7 (Arias *et al.*, 2012).

Preparación de los inóculos: Se prepararon suspensiones de conidias de *F. verticillioides* RC2024, como se describe en la bibliografía (Pujol *et al.*, 1996). Brevemente, se disgregaron mecánicamente las colonias fúngicas desarrolladas durante siete días a 25 °C en medio agar V8, con una solución estéril de Tween 20 (2,5 % en PBS). Las suspensiones obtenidas de esta manera se dejaron decantar durante 30 s, ajustándose luego su turbidez a 0,1 DO a 600 nm con espectrofotómetro (Shimadzu MultiSpec-1501, Japón). Luego, se confirmó la viabilidad conidial mediante el método estándar de recuento en placa, usando medio de cultivo DRBC. Estas suspensiones de conidias fueron utilizadas para preparar los inóculos para la producción de fumonisinas en biorreactor.

5-2- PRODUCCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FUMONISINAS.

5-2-1- Producción de fumonisinas en biorreactor.

La toxina utilizada en los ensayos de las plántulas de maíz, se produjo mediante cultivos de *F. verticillioides* RC2024 en medio Myro líquido (Arias *et al.*, 2016; Arias *et al.*, 2012). Los cultivos se iniciaron mediante la inoculación de suspensiones de conidias en biorreactor de 10 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) conteniendo medio Myro estéril (ver punto 5-1-2), a 28 °C con una agitación de 120 rpm (Dantzer *et al.*, 1996). El oxígeno disuelto fue mantenido por agitación y flujo de aire de 2 litros estándar/min (SLPM) y se trabajó en un rango de pH de $3,5 \pm 0,1$ que fue sostenido con un control automático con bomba peristáltica que adicionó 0,1 M de H_2PO_3 o NaOH. El medio líquido fermentado por 28 días fue autoclavado y luego clarificado por filtración a través de filtros con poros de 0,45 μm de diámetro. Las muestras clarificadas fueron utilizadas para la cuantificación de fumonisinas, y para preparar las soluciones de riego.

5-2-2- Cuantificación de fumonisinas en el medio Myro fermentado.

Las fumonisinas producidas en biorreactor se cuantificaron mediante HPLC-FL. Las muestras del medio Myro fermentado fueron diluidas con volúmenes iguales de acetonitrilo. La detección y cuantificación de la fumonisinas en los extractos fue realizada siguiendo la metodología propuesta por Shephard y cols. (1990) y Sydenham y cols. (1996). Una alícuota de 50 μL de la muestra diluida fue derivatizada con 200 μL de una solución de o-ftaldialdehído (OPA) obtenida por el agregado de 0,1 M de $Na_2B_4O_7$ (5 mL) y 2-mercaptoetanol (50 μL) a 40 mg de OPA disuelto en 1 mL de metanol. Las muestras derivatizadas fueron analizadas usando un sistema HPLC Hewlett-Packard 1100, con un *loop* de 20 μL y con bomba isocrática (G1310A) acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent Technologies 1200). Las longitudes de onda 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 (150 x 4,6 mm), 5 μm , Luna 100 RP-18, conectada a una pre-columna (20 x 4,6 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), con pH de $3,35 \pm 0,20$ ajustado con ácido o-fosfórico y a un flujo de 1,5 mL/min. La cuantificación de las toxinas se realizó extrapolando las áreas de los picos obtenidos en la muestra, sobre curvas de calibración ($r^2 > 0,995$), construidas con estándar analítico de FB1 (pureza > 95 %). Para el procesamiento de datos se utilizó el *software* HP Chemistation Rev. A07.01.

5-3- DISEÑOS EXPERIMENTALES.

Se desarrollaron los siguientes modelos experimentales:

- ✓ Modelo de fitotoxicidad en maceta: Para caracterizar la muerte celular y el estado oxidativo hasta 15 días de la exposición a FB1 (21 dps).
- ✓ Modelo de fitotoxicidad en polen: Para identificar efectos tóxicos de la FB1 sobre la reproducción de maíz.
- ✓ Modelo de fitotoxicidad en hidroponia: Para evaluar a) la fitotoxicidad aguda de FB1 en plántulas de maíz, y b) los efectos moduladores de las ERO sobre las vías de señalización mediadas por los ácidos salicílico y jasmónico, en la muerte celular inducida a tiempos cortos por FB1.

Acondicionamiento de las semillas:

Las semillas de HR e HS utilizadas en los modelos de fitotoxicidad de FB1 en maceta y en hidroponia fueron desinfectadas superficialmente, sumergiéndolas durante dos minutos en una solución de 0,4 % de hipoclorito. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada autoclavada y se secaron sobre papeles absorbentes estériles.

5-3-1- Modelo de fitotoxicidad en maceta.

En el siguiente esquema se muestra el modelo de fitotoxicidad en maceta:

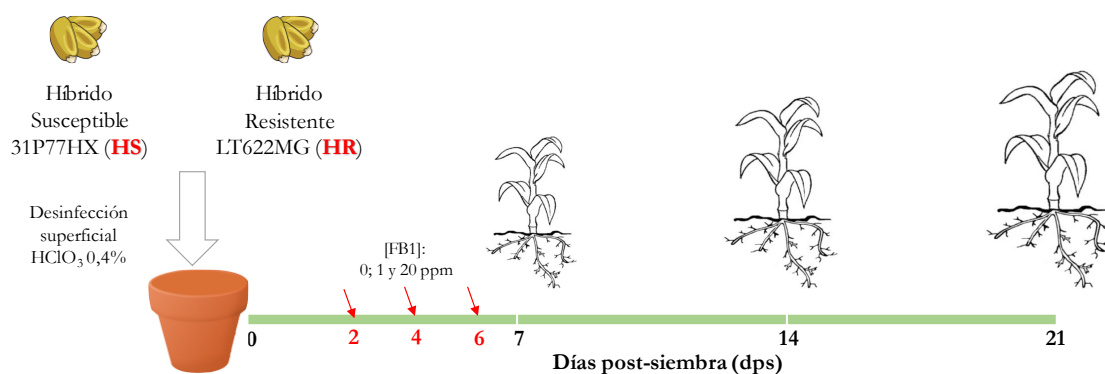


Figura 29. Modelo de fitotoxicidad de FB1 en maceta.

Las semillas fueron sembradas a 2-3 cm de profundidad, en macetas de 24 cm de diámetro que contenían arena lavada y autoclavada (dos veces en días consecutivos). Se dispusieron 10 semillas por maceta, con 3 réplicas por tratamiento. Se aplicó un fertilizante soluble antes de la siembra, y dos veces por semana durante todo el período experimental, lo cual fue indispensable para asegurar el desarrollo normal de las plantas en suelos carentes de nutrientes. Las macetas fueron regadas con 100 mL de soluciones acuosas de FB1 a dos concentraciones distintas (1 y 20 ppm) o con agua destilada estéril (Control) a los 2, 4 y 6 días post- siembra (dps). Luego se procedió con riegos con agua destilada estéril cada 3 días. La cosecha de las plántulas se realizó a los 7, 14 y 21 dps, cuando alcanzaron los estados vegetativos V1, V2 y V3, respectivamente. Las macetas se colocaron en el invernadero del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC), y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C) y luz/oscuridad (14/10 h) durante todo el período experimental. Inmediatamente luego de la cosecha, se obtuvieron 6 discos a partir de las hojas de cada plántula (n=6 por grupo) para la medición de la conductividad electrolítica (CE). Las plántulas restantes se lavaron cuidadosamente, se separaron raíces de partes aéreas, se molieron en N₂ líquido y luego se conservaron a -80 °C para las determinaciones de H₂O₂, TBARS, enzimas antioxidantes (SOD y GPOX) y clorofilas.

5-3-2- Modelo de fitotoxicidad en polen:

Los efectos de FB1 sobre la reproducción de maíz fueron evaluados en granos de polen obtenidos en el estado reproductivo de plantas de maíz de los dos híbridos utilizados en este trabajo de tesis. Las plantas fueron cultivadas entre los meses de septiembre de 2015 y enero de 2016 en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC). El polen fresco fue recogido en forma manual e inmediatamente resuspendido a una concentración aproximada de 150 células/ μ L de MG (ver punto 5-1-3).

Los granos de polen fueron incubados en placas de 48 pocillos con 0 (Control); 0,1; 1; 10; 20; 100 y 200 ppm de FB1 en MG. El volumen final en cada pocillo fue de 100 μ L, conteniendo aproximadamente 1000 granos de polen. La mezcla fue incubada a 24 °C por 1 h, y luego se evaluaron los efectos de la micotoxina sobre la germinación de los granos de polen, y sobre la viabilidad de los granos germinados.

5-3-3- Modelo de fitotoxicidad en hidroponia:

En el siguiente esquema se muestra el modelo de fitotoxicidad en hidroponia:

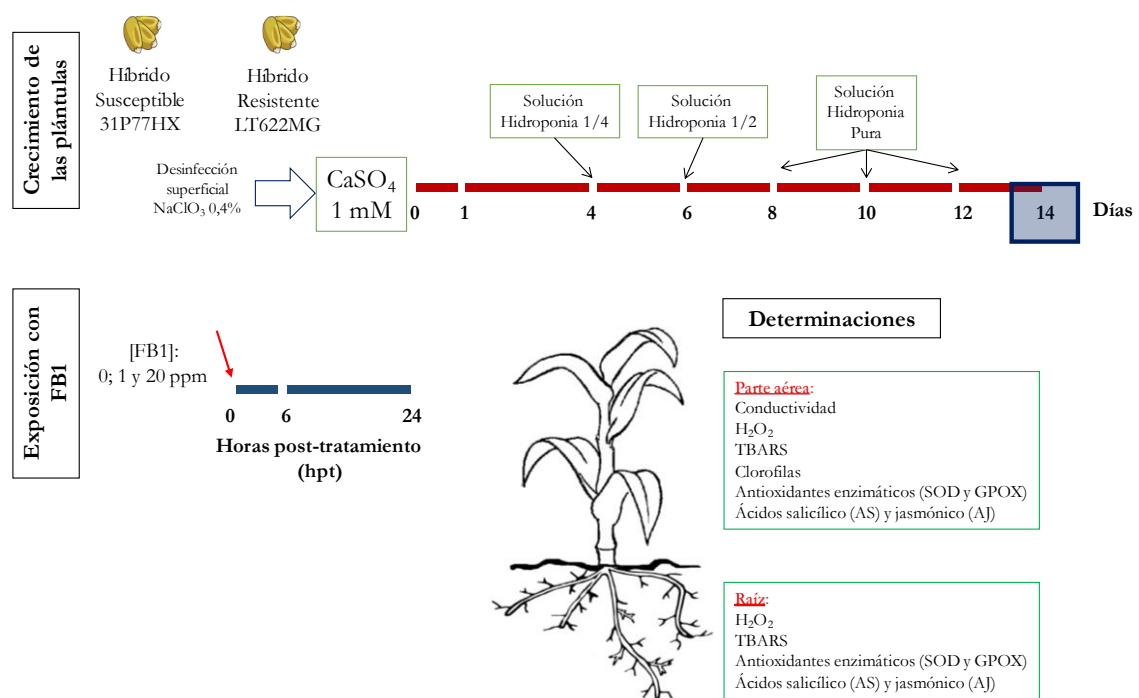


Figura 30. Modelo de fitotoxicidad de FB1 en hidroponia.

Se sumergieron semillas de ambos híbridos de maíz en una solución de CuSO₄ 1 mM a 25 °C por período de 24 horas. Luego, fueron incubadas por 3 días adicionales entre papeles de filtro humedecidos con la misma solución. Posteriormente, las semillas germinadas se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL (una por cada tubo), conteniendo solución de hidroponia (0,25X). La concentración de esta solución se incrementó de manera gradual a 0,5X y 1X a los 2 y 4 días de cultivo en hidroponia, respectivamente. Se utilizó una solución de hidroponia (ver punto 5-1-3), la cual se cambió cada dos días para evitar el consumo total de los nutrientes. A los 14 días, las plántulas fueron expuestas a 0

(Control), 1 y 20 ppm de FB1 (disuelta en solución de hidroponía), y luego se cosecharon a las 6 y 24 horas post-tratamiento (hpt) con la toxina.

Efectos de las ERO sobre las vías de señalización mediadas por los AS y AJ, en la muerte celular inducida a tiempos cortos por FB1.

Para evaluar si las ERO modulan las vías bioquímicas de las fitohormonas AS y AJ en la muerte celular inducida por FB1 se repitió el esquema experimental descrito en el punto anterior. La parte aérea de las plántulas se roció con ácido ascórbico (AA) 1 mM, 2 horas antes del tratamiento con la micotoxina (incubación con 1 ppm de FB1 por 24 horas). Para conocer los efectos del pre-tratamiento con AA, se incluyeron en estos ensayos plántulas rociadas con el antioxidante, pero no expuestas a la FB1.

En todos los casos, luego de la cosecha se obtuvieron 6 discos a partir de las hojas de cada plántula (n=6 por grupo) para la medición de la CE. Las plántulas restantes se lavaron cuidadosamente, se separaron raíces de partes aéreas, se molieron en N₂ líquido y luego se conservaron a -80 °C hasta la cuantificación de H₂O₂, TBARS, enzimas antioxidantes (SOD y GPOX), AS y AJ.

Las plántulas fueron cultivadas en el invernadero del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC), y se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (22 °C) y luz/oscuridad (14/10 h) durante todo el período experimental.

5-4- MÉTODOS.

5-4-1- Cuantificación de la muerte celular.

Se realizó mediante la técnica de conductividad electrolítica (CE) a partir de discos de hojas como describe Rizhsky y cols. (2002), con algunas modificaciones. Los discos de las hojas, obtenidos como se describió anteriormente en los Modelos experimentales I y III, se sumergieron en 10 mL de agua ultra-pura y se agitaron a 60 rpm por 2 h a temperatura ambiente. Luego de la agitación, la conductividad de la solución se midió con conductímetro (Lutron CD 4301). Posteriormente, la solución se calentó a 95 °C por 25 minutos para lisar completamente la pared celular. La conductividad de la solución después de calentar fue registrada como la conductividad total. El porcentaje de CE se determinó como la conductividad inicial / la conductividad total x 100.

5-4-2- Cuantificación de H₂O₂.

Se realizó de acuerdo a la técnica de Alexieva y cols. (2001), donde el H₂O₂ reacciona con el yoduro en medio ácido, liberando yodo que genera una solución de color amarillo. Se homogeneizaron 0,3 g

de tejido molido con N₂ líquido en 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Se centrifugó a 4°C a 12.000 g por 15 minutos y se obtuvo el sobrenadante. La mezcla de reacción consistió en 160 µL de sobrenadante de extracto de tejido en TCA 0,1%, 160 µL de buffer KH₂PO₄/K₂HPO₄ 100 mM (pH 6,8) y 680 µL de una solución de IK 1M. El blanco consistió en TCA 0,1% en ausencia de extracto. La reacción transcurrió 1 h en oscuridad. Se determinó la absorbancia a 390 nm utilizando un lector de placas (Bio-Tek, Synergy HT). La concentración de H₂O₂ se calculó de acuerdo a una curva patrón realizada bajo las mismas condiciones a partir de diluciones de una solución de H₂O₂ (1mM).

5-4-3- Cuantificación de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Se determinó como parámetro indicador de peroxidación lipídica, mediante la técnica descrita por Heath and Packer (1968) con algunas modificaciones. Brevemente, 0,5 g tejido molido (raíz o parte aérea) se homogeneizó en 2,5 mL de TCA 20 % (p/v) y se centrifugó a 4 °C a 12000 g durante 4 minutos. Luego se mezclaron iguales volúmenes de sobrenadante y reactivo de determinación compuesto por TBA 0,5 % (v/v) en TCA 20 % (p/v). Se calentaron las muestras a 95 °C por 25 minutos. Finalmente, se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 4 °C a 9000 g durante 6 minutos. Se midió la absorbancia a 532 nm en el sobrenadante contra un blanco de TBA, sustrayendo la absorbancia de turbidez a 600 nm. Las absorbancias fueron medidas utilizando un lector de placas (Bio-Tek, Synergy HT). La cantidad de MDA se calculó de acuerdo a una curva patrón realizada bajo las mismas condiciones a partir de una solución de TEP (100 µM).

5-4-4- Extracción y análisis de actividades de enzimas antioxidantes:

Extracción de enzimas: Se realizó sobre las plantas individuales de acuerdo a la técnica descrita por Monferrán y cols. (2009), con algunas modificaciones. El tejido molido (raíz o parte aérea) se homogeneizó con buffer de ruptura compuesto por KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1 M, pH 6,5, 20 % (v/v) de glicerol, EDTA 1 mM y dithioerythritol 1,4 mM. Luego de centrifugar 10 min a 13000 g, el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas totales (Bradford, 1976) y de las enzimas antioxidantes, las cuales fueron realizadas espectrofotométricamente utilizando un lector de placas (Bio-Tek, Synergy HT).

Actividad guaiacol peroxidasa (GPOX): Se determinó según la técnica descrita por Bergmeyer y cols. (1983). Se mezclaron 860 µL de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (0,1 M, pH 5,0) con 40 µL de guaiacol (100 mM en DMSO) y 40 µL de H₂O₂ (200 mM en DMSO). Luego, se agregaron 40 µL de extracto de proteínas o buffer de ruptura (Blanco) y se realizó una cinética de 4 min a 436 nm. A partir del

rango lineal, se determinó el ΔAbs (Abs del tiempo final – Abs del tiempo inicial) y los resultados se expresaron como $\Delta\text{Abs} \cdot \text{mg de proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Actividad de superóxido dismutasa (SOD): Se determinó según la técnica descrita por Aiassa y cols. (2010). En presencia de la luz, la riboflavina pierde un electrón e induce la generación de radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Debido a que la enzima SOD actúa mediante la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a mayor actividad enzimática, menor es la reducción del NBT. La mezcla de reacción consistió en 10 μL de extracto de proteína, estándar SOD o buffer de ruptura (Blanco), 30 μL metionina 47,7 mM, 10 μL NBT 0,825 mM en PBS, 30 μL EDTA 0,367 μM y 30 μL riboflavina 7,33 μM . La microplaca conteniendo las muestras se expuso a luz fluorescente de 20 W por 30 minutos para desencadenar la reacción. La lectura del color final se determinó espectrofotométricamente a 595 nm. Los resultados se expresaron en Unidades SOD/mg de proteínas, extrapolando las lecturas obtenidas sobre una curva de calibración realizada con estándar SOD (0,25 - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, equivalentes a 1,14 - 2,56 Unidades SOD/mL).

5-4-5- Cuantificación de clorofilas.

Se determinó en parte aérea de acuerdo a la técnica descrita por Wintermans y de Mots (1965). Brevemente, 300 mg de tejido molido se homogeneizó con 10 mL de etanol 96 % (v/v) y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 min. Se midieron las absorbancias del sobrenadante a 649 y 665 nm utilizando un lector de placas (Bio-Tek, Synergy HT). Las concentraciones de clorofila a y b se calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

$$\text{Chl a (mg/L)} = (13,65 \times \text{Abs}_{665}) - (5,7 \times \text{Abs}_{649})$$

$$\text{Chl b (mg/L)} = (27,79 \times \text{Abs}_{649}) - (7,6 \times \text{Abs}_{665})$$

Los resultados se expresaron en mg de clorofila total (a+b)/g de peso fresco.

5-4-6- Ensayos de germinación de granos de polen.

Los granos de polen incubados con FB1 (0-200 ppm) fueron observados mediante microscopía de campo claro en un microscopio Nikon acoplado a una cámara digital. Se tomaron imágenes representativas de los distintos tratamientos, a partir de las cuales se hizo el recuento de germinación de los granos. El polen se consideró “germinado”, cuando el largo del tubo polínico superaba el diámetro del grano. La longitud del tubo polínico fue determinada mediante el software Adobe Photoshop CC (versión 2015.0.0). Los resultados se expresaron en porcentaje de germinación (polen germinado/polen total x 100).

5-4-7- Estudio de la viabilidad de los granos germinados:

Se determinó mediante el test del MTT, el cual es amarillo en solución y por la actividad de deshidrogenasas mitocondriales en células vivas, es convertido a un precipitado azul (formazán) que queda retenido dentro del polen viable.

Una vez finalizada la incubación de los granos de polen con la FB1 (0 – 200 ppm), se le adicionó una solución de MTT (concentración final de 0,5 % de MTT/pocillo) y se lo incubó a 30 °C durante 15 minutos. Luego, los granos fueron observados mediante microscopía de campo claro en un microscopio óptico Nikon acoplado a una cámara digital. Se tomaron imágenes representativas de los distintos tratamientos, a partir de las cuales hicieron los recuentos de granos de polen germinados viables (azules) y no viables (sin coloración azul). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad = $\frac{\text{granos germinados viables}}{\text{granos totales}} * 100$.

5-4-8- Cuantificación de AS por HPLC-FL.

Se cuantificaron los niveles de ácido salicílico (AS) en la raíz y parte aérea de las plántulas de ambos híbridos de maíz del modelo de fitotoxicidad aguda. La extracción se realizó utilizando la metodología descrita por de la Torre-Hernandez y cols. (2010), con algunas modificaciones. Brevemente, se molieron 400 – 500 mg de tejido en N₂ líquido con mortero y se realizó una doble extracción con 1 mL de MeOH 90 %. Se centrifugó a 20000 g durante 15 min y recolectó el sobrenadante en eppendorf de 2 mL y se evaporó a sequedad a 60 °C. Posteriormente, se re-disolvió con 0,4 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %, se agitó en vortex y se centrifugó a 3000 g durante 10 min. A continuación, se separó el sobrenadante en eppendorf de 2 mL y se realizó una doble extracción con 1 mL de una solución de acetato de etilo-ciclohexano (1:1) agitando en vortex. Luego, se separó la fase orgánica (fase inferior) en viales y se evaporó a sequedad a 50 °C. Finalmente, se re-disolvió 0,2 mL de MeOH 100 % (grado HPLC) y se agitó levemente con vortex.

El contenido de AS se determinó utilizando un sistema de HPLC Hewlett-Packard series 1100 acoplado a un detector de fluorescencia (Agilent Technologies series 1200) fijado a una longitud de onda de 305 nm de excitación y 405 nm de emisión. La separación se realizó utilizando una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm), 5 µm, Luna 100 RP-18, conectada a una pre-columna (20 x 4,6 mm) de 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se utilizó un sistema de solvente (fase móvil) isocrático compuesto por 40 % de metanol (grado HPLC) y 60 % de agua MilliQ, 4 % ácido acético. El flujo fue de 1,2 mL/min. La identificación y cuantificación del AS se realizó comparando el tiempo de retención y las áreas de los picos con curvas de calibración realizadas con estándares (25 – 2050 ppb) de la fitohormona. Los resultados se expresaron en ng de AS por gramo de peso fresco.

5-4-9- Cuantificación de fitohormonas por LC-MS/MS.

Se cuantificaron los niveles de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS) en la porción aérea de plantas. La extracción se realizó por el método modificado de Pan y cols. (2008), con algunas modificaciones. Brevemente, se pesaron 50 – 100 mg de tejido previamente pulverizado con N₂ líquido. Se homogeneizó con 500 µL de 1-propanol/H₂O/HCl concentrado (2:1:0,002; v/v/v). A continuación, se agitó durante 30 minutos a 4 °C. Luego se agregó 1 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), se agitó durante 30 min a 4 °C y se centrifugó a 13000 g por 5 min. Se recolectó la fase orgánica inferior (aprox. 1 mL) en viales, la cual se evaporó a sequedad con N₂ gaseoso. Finalmente, se re-disolvió con 0,1 - 0,15 mL 100 % (grado HPLC) y se agitó levemente con vortex.

La separación cromatográfica se realizó luego de inyectar 10 µL al cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Agilent technologies 1200 Series system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado con una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), desgasificador de solvente (Agilent G1379 B), autosampler (Agilent G1367 D SL+WP) y una columna de fase reversa (C18 kinetex 2,6 µm, 100 mm x 2,1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se utilizó como fase móvil un sistema binario de solventes compuesto por agua con 0,1 % HCO₂H (A) and MeOH con 0,1 % HCO₂H (B), con un flujo de corrida de 0,25 mL/min. El gradiente inicial de B se mantuvo en un 30 % por 2 min y luego se incrementó linealmente hasta el 100 % a los 28 min. Para la identificación y cuantificación se utilizó un espectrómetro de masa microTOF-Q11 Series QTOF (Bruker, Billerica, MA, USA) acoplado al HPLC antes mencionado (LC-MS/MS). La fuente de ionización utilizada fue con electrospray (ESI) y los *softwares* Compass (versión 3.1) y Data Analysis (versión 4.1) se emplearon para la adquisición y procesamiento de datos, respectivamente. Los espectros de masas de los iones se registraron en modo negativo. La relación masa/carga (m/z) para cada metabolito fueron: AS: 137,02 y AJ: 209,12. La cuantificación de se realizó mediante las respectivas curvas de calibración con ajuste lineal, obteniéndose los resultados en ng de fitohormona/gramo de peso fresco.

5-5- ANÁLISIS DE DATOS.

5-5-1- Evaluación estadística.

Se utilizó el software GraphPad 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 ($p < 0,05$). En todos los casos las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0,05$.

5-5-2- Cálculo del índice "Respuesta Integrada de Biomarcadores" (RIB):

Se calculó como un indicador del nivel general de estrés sufrido por las plántulas de maíz al ser expuestas a la FB1, considerando a los biomarcadores medidos en parte aérea y raíz. Inicialmente fueron seleccionados aquellos biomarcadores con mayor capacidad de segregar las condiciones ensayadas, mediante un análisis discriminante (método hacia adelante). Para esto, se utilizó el Software Statistica versión 8.0.360.0. La significancia del análisis discriminante se comprobó considerando los valores de Wilk's Lambda. Debido que para el cálculo del RIB se recomienda utilizar como máximo 9 biomarcadores para cada condición experimental, pero el software estadístico RStudio sólo permite analizar hasta 7 biomarcadores, en los casos donde la cantidad de biomarcadores seleccionados por el AD supera este valor, la selección se realizó en base a los valores de lambda (λ) parcial arrojados en el AD, ya que un menor valor de λ parcial representa una mayor contribución del biomarcador al momento de segregar los grupos.

El RIB se calculó de acuerdo a Devin y cols. (2014). Brevemente, se calculó el valor medio (X_i), la media general (m_i) y la desviación estándar (SD_i) para cada biomarcador de cada híbrido, con cada riego con FB1, tanto de raíz como de parte aérea. El valor X_i luego se estandarizó para obtener Y_i , donde $Y_i = (X_i - m_i)/SD_i$. Posteriormente, se computó $Z_i = -Y_i$ o $Z_i = Y_i$ de acuerdo al efecto biológico de inhibición o activación, respectivamente. El valor mínimo ($mini$) de Z_i de cada biomarcador se obtuvo para cada condición. Finalmente, el *score* S se calculó como $S_i = Z_i + |mini|$, donde $|mini|$ es el valor absoluto. El RIB se calculó para cada condición mediante la siguiente fórmula:

$$IBR = S_1 * \frac{S_2}{2} + S_2 * \frac{S_3}{2} + \dots + S_{n-1} * \frac{S_n}{2} + S_n * \frac{S_1}{2}$$

Donde el valor obtenido para cada biomarcador (S_{n-1}) es multiplicado por el valor obtenido para el biomarcador sucesivo (S_n), ordenados y dividiendo cada cálculo por 2 y sumando la totalidad de los valores obtenidos.

Los cálculos se realizaron mediante el Software R Studio Versión 0.99.902 y adaptando códigos de programación suministrados por el Dr. Simón Devin (Universidad de Lorraine Metz, Francia). Con un mismo conjunto de datos se obtuvieron varios RIBs, mediante permutaciones sucesivas que fueron intercambiando el orden de los biomarcadores. Se obtuvo una matriz con $(k-1)!$ valores de RIB a partir de los cuales se pudo calcular una mediana. El número de permutaciones varió de acuerdo con la cantidad de biomarcadores empleados, obteniéndose una matriz de 6 valores de RIB al utilizar 4 biomarcadores, una de 24 valores con 5 biomarcadores y una de 120 valores con 6 de ellos.

6- REFERENCIAS

- Abbas H.K., Tanaka T., Duke S.O., Porter J.K., Wray E.M., Hodges L., Sessions A.E., Wang E., Merrill A.H., Jr., and Riley R.T. **1994**. Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* 106, 1085-1093.
- Abbas H.K., Paul R.N., Riley R.T., Tanaka T., and Shier W.T. **1998**. Ultrastructural effects of AAL-toxin TA from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon* 36, 1821-1832.
- Abbas H.K., Accinelli C., Zablotowicz R.M., Abel C.A., Bruns H.A., Dong Y., and Shier W.T. **2008**. Dynamics of mycotoxin and *Aspergillus flavus* levels in aging Bt and non-Bt corn residues under mississippi no-till conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7578-7585.
- Aiassa V., Barnes A.I., and Albesa I. **2010**. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic proteus mirabilis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 84-88.
- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., and Karanov E. **2001**. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment* 24, 1337-1344.
- Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., and Pedreño M.A. **2008**. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60, 377-390.
- Alvarez M.A.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A., and Lamb C. **1998**. Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Arias S.L., Theumer M.G., Mary V.S., and Rubinstein H.R. **2012**. Fumonisin: probable role as effectors in the complex interaction of susceptible and resistant maize hybrids and *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 5667-5675.
- Arias S.L., Mary V.S., Otaiza S.N., Wunderlin D.A., Rubinstein H.R., and Theumer M.G. **2016**. Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B1-watered maize seedlings. *Phytochemistry* 125, 54-64.
- Asada K. **1999**. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 601-639.
- Asai T., Stone J.M., Heard J.E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J., and Ausubel F.M. **2000**. Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823-1836.
- Bari R., and Jones J.D.G. **2009**. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473-488.
- Bartoli C.G., Casalongué C.A., Simontacchi M., Marquez-Garcia B., and Foyer C.H. **2013**. Interactions between hormone and redox signalling pathways in the control of growth and cross tolerance to stress. *Environmental and Experimental Botany* 94, 73-88.

- Bergmeyer H.U. **1983**. Methods of Enzymatic Analysis, vol. I. *VCH, Weinheim, Germany*. 1.
- Berthiller F., Schuhmacher R., Adam G., and Krska R. **2009**. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1243-1252.
- Berthiller F., Crews C., Dall'Asta C., Saeger S.D., Haesaert G., Karlovsky P., Oswald I.P., Seefelder W., Speijers G., and Stroka J. **2013**. Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research* 57, 165-186.
- Bradford M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brain R.A., and Cedergreen N. **2009**. Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility. In: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY, pp. 49-109.
- Carmona M., Reis E.M., and Trezzi Casa R. **2008**. Manual para la identificación y manejo de las enfermedades del maíz. Available: www.maizar.org.ar/documentos/321_pudricionesderaisytallocalcarmonareis.doc Accessed: December 18, 2016.
- Castellari C.C., Cendoya M.G., Marcos Valle F.J., Barrera V., and Pacin A.M. **2015**. Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 47, 350-359.
- Clements M.J., Maragos C.M., Pataky J.K., and White D.G. **2004**. Sources of resistance to fumonisin accumulation in grain and fusarium ear and kernel rot of corn. *Phytopathology* 94, 251-260.
- Código alimentario argentino. Available: <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa> Accessed December 10, 2016.
- Coleman J., Blake-Kalff M., and Davies E. **1997**. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science* 2, 144-151.
- Chu F.S., and Li G.Y. **1994**. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 847-852.
- Dantzer W.R., Pometto A.L., 3rd, and Murphy P.A. **1996**. Fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* strain M5991 in a modified Myro liquid medium. *Natural Toxins* 4, 168-173.
- Dauphinee A.N., and Gunawardena A.N. **2015**. An Overview of Programmed Cell Death Research: From Canonical to Emerging Model Species. In: Gunawardena, A.N. and McCabe, P.F. (Eds.), Plant Programmed Cell Death. Springer International Publishing, Cham, pp. 1-31.

- de la Torre-Hernandez M.E., Rivas-San Vicente M., Greaves-Fernandez N., Cruz-Ortega R., and Plasencia J. **2010**. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74, 337-345.
- Desjardins A., and Proctor R. **2007**. Molecular biology of Fusarium mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119, 47-50.
- Desjardins A.E., Plattner R.D., and Proctor R.H. **1996**. Linkage among genes responsible for fumonisin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2571-2576.
- Devin S., Burgeot T., Giambérini L., Minguéz L., and Pain-Devin S. **2014**. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2448-2454.
- Dietrich C.R., Han G., Chen M., Berg R.H., Dunn T.M., and Cahoon E.B. **2008**. Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. *The Plant Journal* 54, 284-298.
- Ding L., Xu H., Yi H., Yang L., Kong Z., Zhang L., Xue S., Jia H., and Ma Z. **2011**. Resistance to hemi-biotrophic *F. graminearum* infection is associated with coordinated and ordered expression of diverse defense signaling pathways. *PLoS One* 6, e19008.
- Doko M.B., and Visconti A. **1994**. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives & Contaminants* 11, 433-439.
- Foyer C.H., and Noctor G. **2008**. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 861-905.
- Foyer C.H., and Noctor G. **2011**. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155, 2-18.
- Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vlegaar R., and Kriek N.P. **1988**. Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1806-1811.
- Glazebrook J. **2005**. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.
- Goss J.A. **1968**. Development, physiology, and biochemistry of corn and wheat pollen. *Botanical Review* 34, 333-358.
- Grant M.R., and Jones J.D.G. **2009**. Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324, 750-752.

- Harrison L.R., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E., and Cole J.R. **1990**. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2, 217-221.
- Heath R.L., and Packer L. **1968**. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. II. Role of electron transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 850-857.
- IARC. **1993**. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Aflatoxins, vol. 56. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 249-395.
- IPCS-WHO. **2000**. Fumonisin B1. Environmental Health Criteria 219. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva. Available: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm> Accessed October 28, 2016.
- Ischebeck T. **2016**. Lipids in pollen — They are different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1861, 1315-1328.
- Jiménez C., Capasso J.M., Edelstein C.L., Rivard C.J., Lucia S., Breusegem S., Berl T., and Segovia M. **2009**. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase. *Journal of Experimental Botany* 60, 815-828.
- Jing-Hua Y., Yuan G., Yan-Man L., Xiao-Hua Q., and Zhang M.-F. **2008**. Salicylic acid-induced enhancement of cold tolerance through activation of antioxidative capacity in watermelon. *Scientia Horticulturae* 118, 200-205.
- Jones H.C., Chancey J.C., Morton W.A., Dashek W.V., and Llewellyn G.C. **1980**. Toxic responses of germinating pollen and soybeans to aflatoxins. *Mycopathologia* 72, 67-73.
- Kamoun S. **2006**. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review Phytopathology* 44, 41–60.
- Kimberlin A.N., Majumder S., Han G., Chen M., Cahoon R.E., Stone J.M., Dunn T.M., and Cahoon E.B. **2013**. Arabidopsis 56–amino acid serine palmitoyltransferase-interacting proteins stimulate sphingolipid synthesis, are essential, and affect mycotoxin sensitivity. *The Plant Cell* 25, 4627-4639.
- Kloek A.P., Verbsky M.L., Sharma S.B., Schoelz J.E., Vogel J., Klessig D.F., and Kunkel B.N. **2001**. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *The Plant Journal* 26, 509-522.
- Koornneef A., and Pieterse C.M.J. **2008**. Cross Talk in Defense Signaling. *Plant Physiology* 146, 839-844.

- Kuroyanagi M., Yamada K., Hatsugai N., Kondo M., Nishimura M., and Hara-Nishimura I. **2005**. Vacuolar Processing Enzyme Is Essential for Mycotoxin-induced Cell Death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 32914-32920.
- Kwak J.M., Nguyen V., and Schroeder J.I. **2006**. The Role of Reactive Oxygen Species in Hormonal Responses. *Plant Physiology* 141, 323-329.
- Laguna I.G., Conci L., Conforto C., g. E., Giménez Pecci M.D.P., González M., Guzmán F.I.M., Lenardon S., Marino de Remes Lenicov A.M., Pérez B.A., D. P., Rodríguez Pardina P.S.M., Sillon M., Truol G., Copia P., and Botta G. **2010**. Enfermedades de Zea mays L. (maíz). *Atlas Fitopatológico* 3.
- Lanubile A., Pasini L., Lo Pinto M., Battilani P., Prandini A., and Marocco A. **2011**. Evaluation of broad spectrum sources of resistance to *Fusarium verticillioides* and advanced maize breeding lines. *World Mycotoxin Journal* 4, 43-51.
- Lanubile A., Logrieco A., Battilani P., Proctor R.H., and Marocco A. **2013**. Transcriptional changes in developing maize kernels in response to fumonisin-producing and nonproducing strains of *Fusarium verticillioides*. *Plant Science* 210, 183-192.
- Leslie J.F. **1995**. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany* 73, 282-291.
- Luttgeharm Kyle D., Cahoon Edgar B., and Markham Jonathan E. **2016**. Substrate specificity, kinetic properties and inhibition by fumonisin B1 of ceramide synthase isoforms from *Arabidopsis*. *Biochemical Journal* 473, 593-603.
- Marasas W.F., Kellerman T.S., Gelderblom W.C., Coetzer J.A., Thiel P.G., and van der Lugt J.J. **1988**. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 197-203.
- Marasas W.F., Riley R.T., Hendricks K.A., Stevens V.L., Sadler T.W., Gelineau-van Waes J., Missmer S.A., Cabrera J., Torres O., and Gelderblom W.C. **2004**. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *The Journal of Nutrition* 134, 711-716.
- Marasas W.F.O. **1995**. Fumonisins: Their implications for human and animal health. *Natural Toxins* 3, 193-198.
- Maschietto V., Marocco A., Malachova A., and Lanubile A. **2015**. Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. *Journal of Plant Physiology* 188, 9-18.
- Maschietto V., Lanubile A., Leonardis S.D., Marocco A., and Paciolla C. **2016**. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins and antioxidant enzyme activities triggers maize resistance towards *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Physiology* 200, 53-61.

- Mateo A., Funck D., Mühlenbock P., Kular B., Mullineaux P.M., and Karpinski S. **2006**. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 57, 1795-1807.
- Metcalfe J.S., Barakate A., and Codd G.A. **2004**. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters* 235, 125-129.
- Mobio T.A., Anane R., Baudrimont I., Carratu M.R., Shier T.W., Dano S.D., Ueno Y., and Creppy E.E. **2000**. Epigenetic properties of fumonisin B(1): cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164, 91-96.
- Monferrán M.V., Sánchez Agudo J.A., Pignata M.L., and Wunderlin D.A. **2009**. Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton puzosii*. *Environmental Pollution* 157, 2570-2576.
- Mullineaux P.K.S. **2002**. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 43-48.
- Mullineaux P.M., and Baker N.R. **2010**. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiology* 154, 521-525.
- Munkvold G.P. **2003**. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* 41, 99-116.
- Mur L.A.J., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., and Prats E. **2007**. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59, 501-520.
- Musser S.M. **1996**. Quantitation and identification of fumonisins by liquid chromatography/mass spectrometry. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392, 65-74.
- Nankam C., and Pataky J. **1996**. Resistance to kernel infection by *Fusarium moniliforme* in the sweet corn inbred IL 125 b. *Plant Disease* 80, 593-598.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., and Marasas W.F.O. **1983**. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, PA.
- Overmyer K., Brosché M., and Kangasjärvi J. **2003**. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* 8, 335-342.
- Pan X., Welti R., and Wang X. **2008**. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69, 1773-1781.
- Pavet V., Olmos E., Kiddle G., Mowla S., Kumar S., Antoniw J., Alvarez M.E., and Foyer C.H. **2005**. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 1291-1303.

- Pinelli E., Poux N., Garren L., Pipy B., Castegnaro M., Miller D.J., and Pfohl-Leszkowicz A. **1999**. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B(1) stimulates cPLA(2) phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis* 20, 1683-1688.
- Pitt J.I. **2000**. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56, 184-192.
- Presello D., Iglesias J., Botta G., Reid L., Lori G., and Eyhérabide G. **2006**. Stability of maize resistance to the ear rots caused by &Fusarium graminearum and F. verticillioides in Argentinian and Canadian environments. *Euphytica* 147, 403-407.
- Presello D., Iglesias J., Fernández M., Fauguel C., Eyhérabide G., and Lorea R. **2009**. Reacción de cultivares a hongos productores de micotoxinas en maíz Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Available: http://www.inta.gov.ar/PERGAMINO/info/documentos//t_maiz/09/artic73.htm Accessed 07/04/2016.
- Proctor R.H., Desjardins A.E., Plattner R.D., and Hohn T.M. **1999**. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genetics and Biology* 27, 100-112.
- Pujol I., Guarro J., Llop C., Soler L., and Fernandez-Ballart J. **1996**. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 2106-2110.
- Rheeder J.P., Marasas W.F., and Vismer H.F. **2002**. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2101-2105.
- Richard J.L. **2007**. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J.E., Rodermel S., Inzé D., and Mittler R. **2002**. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal* 32, 329-342.
- Sagi M., Davydov O., Orazova S., Yesbergenova Z., Ophir R., Stratmann J.W., and Fluhr R. **2004**. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell* 16, 616-628.
- Saucedo-Garcia M., Guevara-Garcia A., Gonzalez-Solis A., Cruz-Garcia F., Vazquez-Santana S., Markham J.E., Lozano-Rosas M.G., Dietrich C.R., Ramos-Vega M., Cahoon E.B., and Gavilanes-Ruiz M. **2011a**. MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 191, 943-957.

- Saucedo-García M., Gonzalez-Solis A., Rodriguez-Mejia P., Olivera-Flores Tde J., Vazquez-Santana S., Cahoon E.B., and Gavilanes-Ruiz M. **2011b**. Reactive oxygen species as transducers of sphinganine-mediated cell death pathway. *Plant Signaling and Behavior* 6, 1616-1619.
- Shabir H. Wani, Varsha Shriram, Saroj Kumar Sah. **2016**. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* 4, 162–176.
- Sheldon J.L. **1904**. A corn mold (*Fusarium moniliforme* n. sp.). *Annual Report of the Nebraska Agricultural Experimental Station* 17, 23-32.
- Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G., and Gelderblom W.C.A. **1990**. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13, 2077-2087.
- Shi L., Bielawski J., Mu J., Dong H., Teng C., Zhang J., Yang X., Tomishige N., Hanada K., Hannun Y.A., and Zuo J. **2007**. Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in Arabidopsis. *Cell Research* 17, 1030-1040.
- Sorenson W.G. **1993**. Mycotoxins. Toxic Metabolites of fungi. In: Juneann W. Murphy, H.F.a.M.B. (Ed.), Fungal infections and Immune responses. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 469-491.
- Stone J.M., Heard J.E., Asai T., and Ausubel F.M. **2000**. Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) Arabidopsis mutants. *The Plant Cell* 12, 1811-1822.
- Sydenham E.W., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Shepard G.S., Van Schalkwyk D.J., and Koch K.R. **1990**. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1900-1903.
- Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S., Snijman P.W., and Van Schalkwyk D.J. **1996**. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2, and B3 in corn: AOAC-IUPAC Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 79, 688-696.
- Teng C., Dong H., Shi L., Deng Y., Mu J., Zhang J., Yang X., and Zuo J. **2008**. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme for de novo synthesis of sphingolipids, is essential for male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146, 1322-1332.
- Ternes P., Feussner K., Werner S., Lerche J., Iven T., Heilmann I., Riezman H., and Feussner I. **2011**. Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* 192, 841-854.
- Theumer M.G., Lopez A.G., Masih D.T., Chulze S.N., and Rubinstein H.R. **2002**. Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 149-155.

- Trusov Y., Chakravorty D., and Botella J.R. 2013. Fusarium oxysporum infection assays in Arabidopsis. In: Running, M.P. (Ed.), *G Protein-Coupled Receptor Signaling in Plants: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 67-72.
- Van Camp W., Van Montagu M., and Inzé D. **1998**. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3, 330-334.
- van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliany M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., and Bozhkov P.V. **2011**. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 18, 1241-1246.
- Waśkiewicz A., Bocianowski J., Perczak A., and Goliński P. **2015**. Occurrence of fungal metabolites — fumonisins at the ng/L level in aqueous environmental samples. *Science of the Total Environment* 524–525, 394-399.
- Wilson T., Ross, P., Owens, D., Rice, L., Green, S., Jenkins, S., and Nelson, H. **1992**. Experimental reproduction of ELEM. *Mycopathologia* 117, 115-120.
- Williams L.D., Glenn A.E., Zimeri A.M., Bacon C.W., Smith M.A., and Riley R.T. **2007**. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and Fusarium verticillioides-induced seedling disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2937-2946.
- Wintermans J., and De Mots A. **1965**. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their phenophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis* 109, 448-453.
- Xing F., Li Z., Sun A., and Xing D. **2013**. Reactive oxygen species promote chloroplast dysfunction and salicylic acid accumulation in fumonisin B1-induced cell death. *FEBS Letters* 587, 2164-2172.
- Zhang X., Wu Q., Cui S., Ren J., Qian W., Yang Y., He S., Chu J., Sun X., Yan C., Yu X., and An C. **2015**. Hijacking of the jasmonate pathway by the mycotoxin fumonisin B1 (FB1) to initiate programmed cell death in Arabidopsis is modulated by RGLG3 and RGLG4. *Journal of Experimental Botany* 66, 2709-2721.
- Zheng X.-y., Spivey N.W., Zeng W., Liu P.-P., Fu Z.Q., Klessig D.F., He S.Y., and Dong X. **2012**. Coronatine promotes Pseudomonas syringae virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell Host & Microbe* 11, 587-596.
- Zörb C., Geilfus C.-M., Mühling K.H., and Ludwig-Müller J. **2013**. The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. *Journal of Plant Physiology* 170, 220-224.

7- ANEXOS

ANEXO I: DISCRIMINANTES Y MATRIZ DE CLASIFICACIÓN DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE DEL MODELO DE FITOTOXICIDAD CRÓNICA CON FB1.

a) Resumen de análisis de funciones discriminantes.

HR

7 dps
Step 7, N of vars in model: 7; Grouping: Trat (3 grps)
Wilks' Lambda: ,00059 approx. F (14,36)=103,33 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
TBARS raíz	0,000885	0,666002	4,51348	0,025780
H ₂ O ₂ raíz	0,001079	0,546262	7,47560	0,004331
GPOX p. aérea	0,001307	0,451068	10,95264	0,000773
GPOX raíz	0,000857	0,688276	4,07615	0,034663
TBARS p. aérea	0,000835	0,706373	3,74114	0,043783
CE	0,000959	0,615000	5,63415	0,012586
H ₂ O ₂ p. aérea	0,000711	0,829001	1,85644	0,184925

14 dps
Step 7, N of vars in model: 7; Grouping: Trat (3 grps)
Wilks' Lambda: ,00039 approx. F (14,36)=126,94 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
Clorofilas	0,001630	0,241826	28,21689	0,000003
TBARS p. aérea	0,001310	0,300949	20,90537	0,000020
H ₂ O ₂ raíz	0,000458	0,861086	1,45192	0,260266
CE	0,000580	0,679606	4,24296	0,030925
TBARS raíz	0,000564	0,698996	3,87561	0,039836
SOD raíz	0,000483	0,816031	2,02899	0,160458
H ₂ O ₂ p. aérea	0,000464	0,850145	1,58643	0,231974

21 dps
Step 6, N of vars in model: 6; Grouping: Trat (3 grps)
Wilks' Lambda: ,00012 approx. F (12,38)=283,24 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
Clorofilas	0,000846	0,144415	56,28255	0,000000
H ₂ O ₂ p. aérea	0,001170	0,104473	81,43283	0,000000
H ₂ O ₂ raíz	0,000618	0,197776	38,53408	0,000000
TBARS raíz	0,000165	0,739621	3,34441	0,056963
TBARS p. aérea	0,000159	0,766917	2,88726	0,080373
GPOX p. aérea	0,000137	0,892749	1,14129	0,340352

HS

7 dps

Step 7, N of vars in model: 7; Grouping: Trat (3 grps)
 Wilks' Lambda: ,00012 approx. F (14,36)=230,04 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
H ₂ O ₂ raíz	0,001026	0,119105	66,5639	0,000000
Clorofilas	0,000145	0,841787	1,6915	0,212237
TBARS raíz	0,001649	0,074094	112,4681	0,000000
TBARS p. aérea	0,000302	0,404607	13,2438	0,000291
H ₂ O ₂ p. aérea	0,000224	0,544817	7,5193	0,004229
CE	0,000184	0,663963	4,5550	0,025078
GPOX raíz	0,000141	0,863800	1,4191	0,267743

14 dps

Step 5, N of vars in model: 5; Grouping: Trat (3 grps)
 Wilks' Lambda: ,00129 approx. F (10,40)=107,29 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
Clorofilas	0,012864	0,100418	89,58337	0,000000
H ₂ O ₂ raíz	0,004212	0,306699	22,60526	0,000007
TBARS p. aérea	0,003377	0,382493	16,14428	0,000067
TBARS raíz	0,001781	0,725490	3,78380	0,040393
CE	0,001486	0,869109	1,50603	0,245892

21 dps

Step 5, N of vars in model: 5; Grouping: Trat (3 grps)
 Wilks' Lambda: ,00218 approx. F (10,40)=81,733 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
TBARS raíz	0,011201	0,194345	41,45495	0,000000
TBARS p. aérea	0,005470	0,397937	15,12960	0,000100
SOD p. aérea	0,004750	0,458277	11,82085	0,000409
Clorofilas	0,003931	0,553825	8,05624	0,002715
H ₂ O ₂ raíz	0,002830	0,769077	3,00259	0,072394

b) Matriz de clasificación.

HR

7 dps				
Filas: Clasificaciones observadas				
Columnas: Clasificaciones previstas				
	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100,0000	9	9	9

14 dps				
Filas: Clasificaciones observadas				
Columnas: Clasificaciones previstas				
	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

21 dps				
Filas: Clasificaciones observadas				
Columnas: Clasificaciones previstas				
	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

HS

7 dps

Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

14 dps

Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

21 dps

Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

ANEXO II: FUNCIONES DISCRIMINANTES Y MATRIZ DE CLASIFICACIÓN DEL ANÁLISIS DISCRIMINANTE DEL MODELO DE FITOTOXICIDAD AGUDA CON FB1.

a) Resumen de análisis de funciones discriminantes.

HR

6 hpt

Step 9, N of vars in model: 9; Grouping: Tratamiento (3 grps)
Wilks' Lambda: ,00082 approx. F (18,32)=60,479 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
H ₂ O ₂ raíz	0,002868	0,284275	20,14173	0,000043
TBARS raíz	0,001777	0,458934	9,43171	0,001968
GPOX p. aérea	0,001999	0,407825	11,61624	0,000765
GPOX raíz	0,000945	0,862856	1,27154	0,307260
SOD raíz	0,001581	0,515903	7,50681	0,005018
AS p. aérea	0,001370	0,595117	5,44274	0,015733
H ₂ O ₂ p. aérea	0,001617	0,504322	7,86288	0,004185
TBARS p. aérea	0,001596	0,510990	7,65588	0,004648

24 hpt

Step 5, N of vars in model: 5; Grouping: Tratamiento (3 grps)
Wilks' Lambda: ,00006 approx. F (10,40)=514,29 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
H ₂ O ₂ raíz	0,000568	0,104830	85,3927	0,000000
GPOX p. aérea	0,000780	0,076404	120,8829	0,000000
AS raíz	0,000523	0,113852	77,8336	0,000000
AS p. aérea	0,000195	0,305820	22,6990	0,000007
H ₂ O ₂ p. aérea	0,000146	0,407078	14,5653	0,000125
H ₂ O ₂ raíz	0,000568	0,104830	85,3927	0,000000
GPOX p. aérea	0,000780	0,076404	120,8829	0,000000

HS

6 hpt

Step 8, N of vars in model: 8; Grouping: Tratamiento (3 grps)

Wilks' Lambda: ,00025 approx. F (16,34)=131,29 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
GPOX _{raíz}	0,000669	0,379384	13,90472	0,000264
CE	0,001294	0,196006	34,86605	0,000001
H ₂ O ₂ _{raíz}	0,000961	0,263856	23,71458	0,000012
AS _{p. aérea}	0,001001	0,253462	25,03555	0,000009
TBARS _{p. aérea}	0,000507	0,500757	8,47429	0,002798
SOD _{p. aérea}	0,000349	0,726668	3,19723	0,066276
GPOX _{p. aérea}	0,000329	0,771163	2,52232	0,109835

24 hpt

Step 10, N of vars in model: 10; Grouping: Tratamiento (3 grps)

Wilks' Lambda: ,00002 approx. F (20,30)=378,00 p<0,0000

Biomarcador	Wilks Lambda	Parcial Lambda	F-remove	p-level
TBARS _{raíz}	0,000180	0,086956	78,75043	0,000000
H ₂ O ₂ _{raíz}	0,000030	0,521042	6,89425	0,007526
GPOX _{p. aérea}	0,000060	0,262561	21,06474	0,000044
H ₂ O ₂ _{p. aérea}	0,000027	0,575934	5,52232	0,015951
AS _{raíz}	0,000044	0,353006	13,74611	0,000406
CE	0,000118	0,132788	48,98124	0,000000
TBARS _{p. aérea}	0,000084	0,186501	32,71417	0,000003
GPOX _{raíz}	0,000033	0,477061	8,22127	0,003884
AS _{p. aérea}	0,000020	0,765841	2,29316	0,135219
SOD _{p. aérea}	0,000019	0,802106	1,85038	0,191311

b) Matriz de clasificación.

HR

6 hpt

Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

24 hpt

Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

HS

6 hpt
Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

24 hpt
Filas: Clasificaciones observadas
Columnas: Clasificaciones previstas

	Porcentaje correcto	Control p=0,33333	1 ppm FB1 p=0,33333	20 ppm FB1 p=0,33333
Control	100	9	0	0
1 ppm FB1	100	0	9	0
20 ppm FB1	100	0	0	9
Total	100	9	9	9

8- PUBLICACIONES

ARTÍCULOS PUBLICADOS O EN PRENSA.

1. Arias SL, Mary VS, **Otaiza SN**, Wunderlin DA, Rubinstein HR, and Theumer MG. Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B1-watered maize seedlings. *Phytochemistry* **2016** May;125:54-64.
2. Mary VS, Arias SL, **Otaiza SN**, Velez PA, Rubinstein HR, and Theumer MG. The aflatoxin B1-fumonisin B1 toxicity in BRL-3A hepatocytes is associated to induction of cytochrome P450 activity and arachidonic acid metabolism. *Environmental Toxicology* **2017**. (En Prensa).

ARTÍCULOS ENVIADOS A PUBLICAR.

- **Otaiza SN**, Arias SL, Mary VS, Bertrand L, Velez PA, Rubinstein HR, and **Theumer MG**. Oxidative stress involvement in the phytotoxicity of fumonisin B1 in maize seedlings with different resistance to *Fusarium verticillioides* infection.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS.

1. Mary VS, **Otaiza SN**, Theumer MG, Rubinstein HR. *The AFB1-FB1 mixture enhances the hepatotoxic effects induced by the individual mycotoxins in rat hepatocytes*. IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los alimentos. Córdoba, Argentina, Noviembre 14-16, **2012**.
2. Arias SL, Mary VS, **Otaiza SN**, Rubinstein HR, Theumer MG. *Acumulación de bases esfingoides en respuesta de defensa de maíz a la infección de Fusarium verticillioides y a FB1*. VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Diciembre 3-6, **2013**.
3. Mary VS, **Otaiza SN**, Arias SL, Rubinstein HR, Theumer MG. *Participación del H₂O₂ en la inmunotoxicidad producida por aflatoxina B1 y fumonisina B1*. VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Diciembre 3-6, **2013**.
4. **Otaiza SN**, Arias SL, Mary VS, Rubinstein HR, Theumer MG. *Inducción de estrés oxidativo por fumonisina B1 en maíz: Relación con la susceptibilidad/resistencia a la infección por Fusarium verticillioides*. VII Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Río Cuarto, Córdoba, Argentina, Diciembre 3-6, **2013**.
5. Mary VS, Arias S, **Otaiza SN**, Rubinstein HR, y Theumer MG. *Evaluación toxicológica del consumo de maní infectado con el fitopatógeno Thecaphora frezii: Perfil bioquímico y hematológico*. III Congreso argentino de fitopatología. San Miguel de Tucumán, Argentina, Junio 4-6, **2014**.

6. Mary VS, Arias S, **Otaiza SN**, Rubinstein HR, y Theumer MG. *Evaluación toxicológica del consumo de maní infectado con el fitopatógeno Thecaphora frezii: Perfil nutricional e histológico*. III Congreso argentino de fitopatología. San Miguel de Tucumán, Argentina, Junio 4-6, **2014**.
7. **Otaiza SN**, Arias SL, Mary VS, Rubinstein HR, Theumer MG. *Fumonisina B1 como factor de patogenicidad en la interacción Fusarium verticilloides/maíz: diferencias en el estado oxidativo en fenotipos susceptibles y resistentes*. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Córdoba, Argentina, Noviembre 17-19, **2014**.
8. Arias SL, **Otaiza SN**, Mary VS, Rubinstein HR, Theumer MG. *Perfil de fitohormonas y muerte celular en maíz en respuesta a la infección con Fusarium verticillioides y a FB1*. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014). Córdoba, Argentina, Noviembre 17-19, **2014**.
9. Mary VS, Arias SL, **Otaiza SN**, Rubinstein HR, Theumer MG. Evaluación de la mutagenicidad de extractos de esporas del hongo *Thecaphora frezii*, mediante el test de Ames. XXX Jornada nacional del maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina, Setiembre 17, **2015**.
10. Mary VS, **Otaiza SN**, Arias SL, Rubinstein HR, Theumer MG. Evaluación de la toxicidad de extractos de esporas del hongo *Thecaphora frezii*, en cultivos de células eucariotas. XXX Jornada nacional del maní. General Cabrera, Córdoba, Argentina, Setiembre 17, **2015**.
11. **Otaiza SN**, Mary VS, Arias SL, Rubinstein HR, Theumer MG. Inducción de estrés oxidativo como mecanismo de fitopatogenicidad de fumonisina B1 en maíz. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA 2015), CABA, Buenos Aires, Argentina, Noviembre 25-27, **2015**.
12. **Otaiza SN**, Mary VS, Velez PA, Rubinstein HR, Theumer MG. Producción de maíz: Efectos tóxicos de fumonisina B1 sobre el polen. Primer congreso científico profesional de bioquímica 2016, Córdoba, Córdoba, Argentina. Octubre 5-8, **2016**.

PREMIOS

- **Otaiza SN**, Mary VS, Velez PA, Rubinstein HR, **Theumer MG**. Producción de maíz: Efectos tóxicos de fumonisina B1 sobre el polen. Primer congreso científico profesional de bioquímica 2016, Córdoba, Córdoba, Argentina. Octubre 5-8, **2016**. **(Mención especial)**.