

TRABAJO FIN DE GRADO

**Búsqueda de compuestos de defensa en el
maíz frente al hongo *Fusarium verticillioides***

Searching for defense compounds in maize against the
fungus *Fusarium verticillioides*



Noemi Gesteiro Portas

Curso 2017/18

RESUMEN

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal con mayor producción a nivel mundial pero está expuesto a daños por parte de una larga lista de géneros fúngicos. En España, destaca *Fusarium verticillioides* que provoca la podredumbre de la mazorca y la contaminación del grano con micotoxinas. La infección de este hongo se produce fundamentalmente a través de las sedas (inflorescencia femenina) expuestas del maíz. Es de especial interés el estudio de compuestos que, de forma constitutiva en las sedas, puedan tener un papel en la defensa de la planta. Los objetivos de este estudio consistieron en (i) evaluar cambios en los compuestos solubles o de la pared celular a lo largo del desarrollo de las sedas y (ii) relacionar dicha composición con la resistencia a la infección por *F. verticillioides*. Los resultados obtenidos indican ciertas variaciones de composición a lo largo del desarrollo y envejecimiento de las sedas; sin embargo, los compuestos relacionados con la pared no parecen tener efecto en la resistencia, al menos a nivel constitutivo en sedas. Al contrario, es posible que la fracción soluble sea la que tenga mayor intervención en este tejido; siendo los flavonoides la familia de compuestos con mayor importancia en la resistencia.

Palabras clave: maíz, sedas, resistencia, *F. verticillioides*, compuestos fenólicos.

RESUMO

O millo (*Zea mays* L.) é o cereal con maior produción a nivel mundial pero está exposto a danos por parte dunha longa lista de xéneros fúngicos. En España, destaca *Fusarium verticillioides* que provoca a podremia da mazorca e a contaminación do gran con micotoxinas. A infección deste fungo prodúcese fundamentalmente a través das sedas (inflorescencia feminina) expostas do millo. É de especial interese o estudio de compostos que, de forma constitutiva nas sedas, poidan ter un papel na defensa da planta. Os obxectivos deste estudio consistiron en (i) avaliar cambios nos compoñentes solubles ou da parede celular o longo do desenvolvemento das sedas e (ii) relacionar dita composición coa resistencia a infección por *F. verticillioides*. Os resultados obtidos indican certas variacións de composición o longo do desenvolvemento e envellecemento das sedas; sen embargo, os compostos relacionados coa parede non parecen ter efecto na resistencia, polo menos a nivel constitutivo nas sedas. Ao contrario, é posible ca fracción soluble sexa a que teña maior intervención neste tecido; sendo os flavonoides a familia de compostos con maior importancia na resistencia.

Palabras clave: millo, sedas, resistencia, *F. verticillioides*, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is the cereal with the highest production worldwide, however it's exposed to damage by a long list of fungal species. *Fusarium verticillioides* is especially important in Spain, causing kernel rot and mycotoxins contamination. The infection and colonization of this fungus occurs, mainly, through the exposed silks (female inflorescence). For this reason, it is especially interesting to study silks compounds that can constitutively play an important role in the plant defense. The objectives of this study consisted of (i) evaluating changes in soluble and cell wall compounds throughout the aging of the silks and (ii) correlate this composition with the resistance to infection by *F. verticillioides*. The obtained results indicate variations along the development and aging of the silks; however, the compounds included in the cell wall do not seem to have an effect on the resistance, at least constitutively in the silks. On the opposite way, it is possible that in this tissue the soluble fraction has the most important role, being the flavonoids the family of compounds with higher significance in resistance.

Keywords: corn, silks, resistance, *F. verticillioides*, phenolic compounds.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. El cultivo de maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	1
1.2. Infección del maíz por <i>Fusarium verticillioides</i>	1
1.3. Compuestos fenólicos y carbohidratos implicados en la defensa del maíz frente a hongos ...	3
1.3.1. Fenoles y azúcares solubles.....	3
1.3.2. Polisacáridos y fenoles de la pared celular.....	4
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1. Material vegetal y diseño experimental.....	7
3.2. Valoración de la resistencia a la podredumbre de la mazorca causada por <i>F. verticillioides</i> .	7
3.3. Determinaciones bioquímicas	8
3.3.1. Determinación del contenido de azúcares solubles	8
3.3.2. Determinación del contenido de fenoles totales	8
3.3.3. Determinación del contenido de flavonoides	8
3.3.4. Determinación del contenido de antocianos	9
3.3.5. Obtención de paredes celulares	9
3.3.6. Determinación de la fracción hemicelulósica de la pared celular: azúcares neutros y ácidos urónicos	9
3.3.7. Determinación de la fracción celulósica.....	9
3.3.8. Derivatización de azúcares de pared celular y análisis por GC.....	10
3.3.9. Determinación del contenido de lignina.....	10
3.3.10. Extracción de fenoles en la pared celular	10
3.3.11. Fraccionamiento de la pared celular con KOH	11
3.4. Análisis estadístico	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1. Evaluación de resistencia frente a <i>F. verticillioides</i>	12
4.2. Compuestos solubles y resistencia frente a <i>Fusarium</i>	12
4.3. Componentes de la pared celular y resistencia frente a <i>Fusarium</i>	15
4.3.1. Polisacáridos: hemicelulosa y celulosa	15
4.3.2. Fenoles de la pared: lignina e hidroxycinamatos	18
5. CONCLUSIONES.....	22
6. REFERENCIAS	23
7. ANEXO.....	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo de maíz (*Zea mays* L.)

El maíz (*Zea mays* L.) es una monocotiledónea que pertenece a la familia Poaceae. Se cultiva desde hace unos 7000 años de antigüedad, principalmente por las zonas de México y América central, hasta que fue introducida en España en el siglo XVI (MAPAMA, en línea). Hoy en día su cultivo está muy extendido, en 2016, según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), se posicionó como el cereal con mayor producción a nivel mundial, y el segundo de la totalidad de cultivos, por detrás de la caña de azúcar. La domesticación del maíz se produjo en el sur de México hace unos 10.000 años a partir del teosinte Balsas (*Zea mays* ssp. *Parviglumis*) y dio lugar a un grupo de variedades locales ancestrales adaptadas a las diferentes condiciones climáticas y geográficas. Con el tiempo, el maíz se extendió por todo el mundo ejerciéndose sobre él una selección genética dirigida a mejorar su adaptación a las condiciones de cada región (Matsuoka, 2005; Mendoza-López *et al.*, 2018). En la actualidad, el 96% del maíz cultivado es obtenido con técnicas de mejora genética (MAPAMA, 2017). La mejora genética y la selección de nuevas variedades no solo busca conseguir una mayor adaptabilidad local sino también mejorar la resistencia a factores bióticos que pueden reducir su calidad y rendimiento, como hongos, insectos o malas hierbas (Cao, 2013).

Los hongos son los causantes de la mayoría de enfermedades que afectan a las plantas. El maíz está expuesto a una larga lista de géneros fúngicos a lo largo de su ciclo vital, entre los que destacan *Fusarium*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Ustilago*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. Algunas de estas especies producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas, las cuales representan un elevado riesgo para la salud humana y la de los animales que las consumen. De hecho, el maíz puede contener los cinco tipos de micotoxinas más importantes, aunque las que mayor interés despiertan debido a su frecuencia son las contaminaciones por aflatoxinas, fumonisinas o tricotecenos producidas por *A. flavus*, *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Cao, 2013). *F. graminearum* y *F. verticillioides* son los hongos patógenos que más afectan al grano de maíz en regiones templadas, entre las que se incluye Europa. El hongo *F. graminearum* produce deoxinivalenol (DON), una micotoxina que causa vómitos y diarrea, inmunosupresión y es responsable del síndrome de rechazo de la alimentación del ganado; *F. verticillioides* produce fumonisinas (FB) que causan leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, reducción del crecimiento en aves de corral y trastornos hepáticos e inmunitarios en el ganado (Butrón *et al.*, 2015). Además, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer ha clasificado las fumonisinas como posibles carcinogénicas (IARC, 2002). El desarrollo de una u otra especie está determinado por las condiciones climáticas y geográficas. En regiones más frías predomina *F. graminearum*, mientras que en regiones más cálidas y secas, como España, predomina *F. verticillioides* (Butrón *et al.*, 2015).

1.2. Infección del maíz por *Fusarium verticillioides*

El hongo *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg (Nirenberg *et al.*, 1998) es una de las especies fúngicas más prevalente en el maíz y una de las que más interés despierta debido a la preocupación por los metabolitos secundarios tóxicos que produce. Esta preocupación deriva del hecho de que el maíz es un componente significativo en la cadena de alimentos humanos, lo que pone de manifiesto la necesidad de comprender la biología de la interacción huésped-patógeno (Duncan *et al.*, 2010).

F. verticillioides puede desarrollarse, durante el cultivo en campo, en todas las partes de la planta y actúa colonizando la planta de forma asintomática o como patógeno generando

síntomas de daño, en especial en la mazorca. Las causas del paso de un estado al otro no son del todo claras aunque se relacionarán con las condiciones ambientales bióticas y abióticas y con las características fisiológicas y genéticas de la planta. Los síntomas típicos que se observan en el grano de maíz son el desarrollo de un patrón de rayas blancas en el pericarpio (Fig. 1.A); y si la infección es severa aparece un micelio algodonoso de color blanco rodeando (Fig. 1.B), en primer lugar, a los granos del ápice y que luego se extiende por toda la mazorca, pudiendo afectar a las brácteas, que se adhieren a los granos. Esta podredumbre de la mazorca es conocida como fusariosis rosa, típica de hongos como *F. verticillioides* (Duncan *et* Howard, 2010; Cao, 2013).

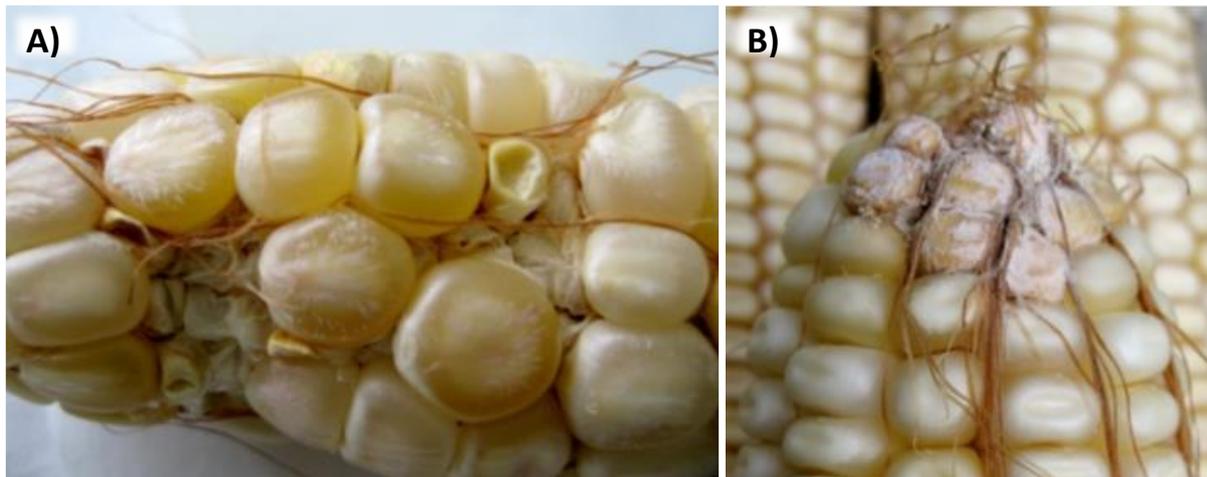


Figura 1. Detalle del crecimiento de *F. verticillioides* (A) dentro del pericarpio, con la aparición de las características líneas blancas radiales y, (B) sobre los granos, formando un micelio algodonoso blanco (modificado de Cao, 2013).

La infección y colonización de las partes superiores de la planta de maíz por *F. verticillioides* se produce a través de heridas provocadas por insectos, pájaros u otros y, sobre todo, a través de las sedas expuestas. Las sedas son los estilos de las flores femeninas (espiga) que sobresalen por la parte superior de las brácteas en el momento de la floración (Fig. 2.A). El hecho de que no estén protegidas por las brácteas como sí lo están los granos, las dispone como un primer punto de contacto, considerándose una vía principal de entrada para plagas de hongos e insectos (Miller *et al.*, 2003). De este modo, la floración femenina se considera un momento clave en la infección de *F.*

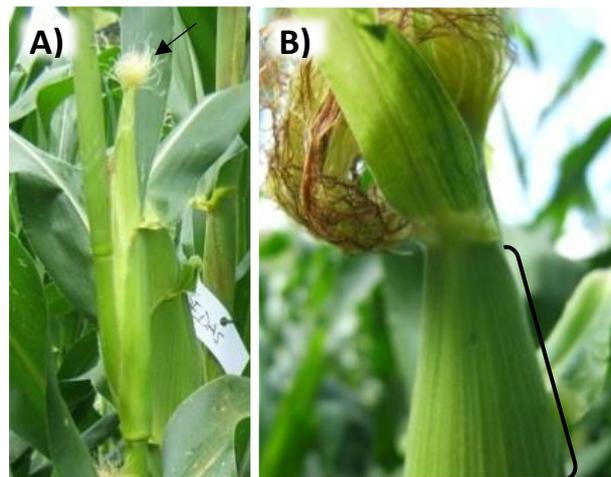


Figura 2. (A) Mazorca en floración con las sedas expuestas (flecha) y (B) detalle del canal de las sedas (corchete) (modificado de Cao, 2011).

verticillioides; no obstante, las sedas del maíz envejecen rápidamente después de la polinización y, este cambio fisiológico podría alterar la idoneidad de la seda para el crecimiento del hongo (Reid *et al.*, 2009). Durante la floración, las microconidias del hongo son depositadas sobre las sedas por el viento, salpicaduras de agua o insectos. En las sedas germinan, se desarrolla el micelio y se producen más esporas, sobre todo en sedas polinizadas. Luego, *F. verticillioides* utiliza el canal de las sedas (formado por las brácteas y que comprende desde la abertura de las brácteas donde las sedas están expuestas hasta la punta de la mazorca bajo la superficie de las brácteas) (Fig. 2.B) para entrar en las mazorcas y colonizar los granos (Duncan *et* Howard, 2010).

Existen algunos estudios, como el de Miller *et al.* (2007), que han investigado en detalle el proceso de infección de *F. graminearum* en sedas de maíz, el cual tiene un modo de infección similar a *F. verticillioides*. Estos autores demostraron que la germinación de conidios se produce 4-6h después de la inoculación del hongo en el canal de las sedas, pero que podría tardar hasta 12-24h. Luego se produce un periodo variable de crecimiento, donde apenas hay crecimiento en sedas hasta pasadas las 24h después de la inoculación. A las 48h, probablemente después de que los nutrientes disponibles en el sitio de inoculación hayan sido agotados, alguna de las hifas crece en líneas más o menos rectas, tanto en la superficie como penetrando en las células epidérmicas de las sedas, hacia la mazorca, y finalmente infectan los granos en desarrollo. Además, observaron claras diferencias después de la germinación entre genotipos catalogados como susceptibles y resistentes a la infección por el hongo. El crecimiento del hongo trascurridas 48h desde la inoculación estaba invariablemente más avanzado en los genotipos susceptibles. Asimismo, el acceso a la mazorca ocurrió en 7-9 días en genotipos susceptibles (14-16 días después de la polinización hecha cuando las sedas sobresalían de las brácteas aproximadamente 2 cm), mientras que en los resistentes tardó en torno a 12-15 días (19-22 días después de la polinización). También observaron que la entrada del hongo al grano se produjo, en ambos genotipos, directamente a través del punto de unión de la seda o, cuando la seda crece sobre otros granos, el hongo puede pasar de la seda a la superficie de un grano o granos que se encuentren debajo de ella. En el caso de la infección por *F. verticillioides*, Duncan y Howard (2010) sugieren que el movimiento sobre las sedas es a nivel superficial, sin embargo, hay que destacar que en este estudio la inoculación artificial de las sedas se realizó mediante el uso de spray, no mediante inyección artificial en el canal de las sedas. La herida producida con una aguja en estos tejidos puede favorecer la infección por el interior de las sedas de forma similar a lo ya descrito para *F. graminearum*. Estos antecedentes hacen que sea de sumo interés estudiar la evolución de ciertos compuestos descritos como barreras o antibióticos frente a hongos a lo largo del proceso de desarrollo de las sedas, especialmente en los primeros 21 días después de que las sedas sean receptivas.

1.3. Compuestos fenólicos y carbohidratos implicados en la defensa del maíz frente a hongos

La vía de los fenilpropanoides conduce a la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos fenólicos que se han visto implicados en procesos biológicos de resistencia a hongos (Sekhom *et al.*, 2006). Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol, pero mayoritariamente se trata de polifenoles. Gran parte de los compuestos fenólicos forman parte de la pared celular bien por ser constituyentes básicos de la misma (lignina) o por estar ligados a ella (hidroxicinamatos), pero también existe una gran cantidad de estos compuestos en la fracción soluble, como flavonoides o antocianos (Anexo Fig. 1). El estudio del papel de los compuestos fenólicos ligados a la pared es conveniente hacerlo de forma conjunta con el estudio de los polisacáridos de la pared porque la resistencia vendrá condicionada por la interrelación entre lignina, ácidos hidroxicinámicos y polisacáridos (Santiago *et al.*, 2016).

1.3.1. Fenoles y azúcares solubles

Las defensas vegetales consisten en barreras físicas como la pared celular y sus modificaciones, pero a menudo están implicados productos del metabolismo secundario con efecto antibiótico sobre el hongo, entre estos últimos, destacarían los compuestos fenólicos como los flavonoides y los antocianos (Santiago *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos solubles inhiben el crecimiento *in vitro* de varios géneros fúngicos, y en especial, se observaron efectos inhibitorios significativos para las

especies de *Fusarium* (McKeehen *et al.*, 1999). Otros estudios como el de Bakan *et al.* (2003) señalaron que los compuestos fenólicos también tienen un papel importante en la inhibición de la producción de micotoxinas *in vitro* y, trabajan en identificar y aislar los inhibidores más activos en los extractos fenólicos solubles. Sekhom *et al.* (2006) demostraron que la acumulación de flavonoides y antocianos inducidos también proporciona resistencia contra hongos del género *Fusarium*.

En cuanto a los azúcares solubles, pueden intervenir como fuente de carbono fácilmente disponible para el desarrollo fúngico evitando la necesidad de utilizar enzimas de degradación fúngica o; como moléculas señal formando parte de los patrones de daño asociados a patógenos (DAMPs) que activarán la respuesta innata inmune en la planta cuando son liberados por dichas enzimas fúngicas (Moghaddam *et Ende*, 2012).

1.3.2. Polisacáridos y fenoles de la pared celular

La pared celular está considerada como una importante barrera física frente a patógenos y plagas y está formada fundamentalmente por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz de hemicelulosas, pectinas, proteínas y compuestos fenólicos en una solución ligeramente ácida a la que se incorpora la lignina, convirtiéndose en un constituyente significativo. Fundamentalmente, la pared da forma y tamaño a las células, pero también les confiere cierta capacidad de resistencia mecánica y de defensa (Azcón-Bieto *et Tazón*, 2008). Varios de sus componentes tienen un papel importante en la resistencia a plagas y enfermedades; aunque, los mecanismos de defensa son muy complejos y varían entre plantas de la misma especie, diferentes tejidos o incluso el mismo tejido en diferentes etapas de desarrollo. Por lo tanto, comprender el papel de estos constituyentes en la resistencia de la pared a estreses bióticos puede permitir modificar los cultivos para aumentar su resistencia (Santiago *et al.*, 2013).

En cuanto a la fracción de polisacáridos de la pared celular tenemos la celulosa, que es el componente principal de la pared, representando un 35-50% del peso seco. Es sintetizada por los complejos proteicos de la membrana plasmática y se deposita directamente en la pared celular. Su estructura está constituida por una larga cadena lineal de moléculas de D-glucosa unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (Azcón-Bieto *et Talón*, 2008; Santiago *et al.*, 2013).

Los polisacáridos que forman la fracción hemicelulósica, son sintetizados en el aparato de Golgi y secretados en vesículas a la pared celular. En el caso concreto del maíz, los polisacáridos no celulósicos más abundantes son los β -glucanos mixtos y los glucuronoarabinosilanos (GAX). La estructura básica de los β -glucanos es una cadena lineal de restos de β -D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow3)$, en una relación aproximada de 2:3 (Fig. 3.A). Mientras que la estructura de los GAX es una cadena principal $\beta(1\rightarrow4)$ -D-xylan con sustituciones de arabinosa y ácidos urónicos principalmente. Los residuos de arabinosa se unen en la posición O-3 de la xilosa, y los urónicos en la posición O-2 (Fig. 3.B). La hemicelulosa entrelaza las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno; en cambio, solo una parte puede enlazarse directamente a la celulosa, quedando el resto en los espacios entre microfibrillas (Azcón-Bieto *et Talón*, 2008; Santiago *et al.*, 2013).

La intervención de estos componentes frente a enfermedades fúngicas ha sido poco estudiada y se refiere fundamentalmente a contenidos de fibra alimentaria donde los azúcares de la fracción de celulosa y hemicelulosa son importantes. Mideros *et al.*, (2012) encontraron correlaciones negativas significativas del contenido de aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* Link con fibra y carbohidratos estructurales. Asimismo, se han encontrado mayores contenidos de fibra ácida y neutro detergente en las hojas de una línea pura de maíz resistente a la roya *Puccinia polysora* Underw (Ji *et Yamakawa*, 2011).

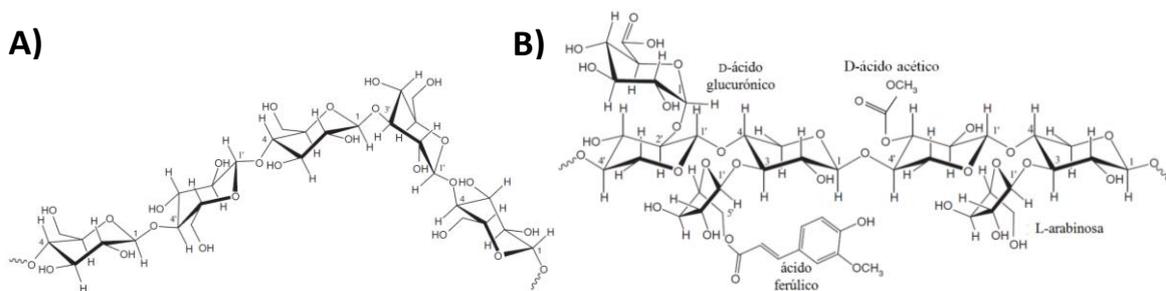


Figura 3. Estructura básica de (A) los β -glucanos mixtos y (B) de glucuronoarabinoxilanos (tomado de Barros-Ríos, 2012).

La lignina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza y, en las plantas, tiene una función principal de soporte estructural y de resistencia. La lignina es un producto de la ruta metabólica de los fenilpropanoides y está constituida por tres monolignoles [alcohol *p*-coumaryl (H), alcohol coniferílico (G) y alcohol sinapílico (S)] unidos entre sí por enlaces éster o carbono-carbono (Azcón-Bieto *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2013). Los productos intermedios de la ruta de biosíntesis de los monolignoles sirven como precursores de los ácidos hidroxicinámicos y otros compuestos fenólicos. Las unidades H son las que primero se depositan, seguidas de las G y, por último, las unidades S. En el maíz, la proporción S/G es de 1,02 y 1,61 para el tallo y 0,2 y 0,55 para las hojas. Esta proporción aumenta a medida que la planta madura creando una lignina más condensada (Santiago *et al.*, 2013).

La lignificación puede obstaculizar el crecimiento de hongos a través del tejido vegetal. En 1980, ya se demostró que aumentando la lignificación de la pared celular, ésta se vuelve más resistente a la disolución por enzimas fúngicas (Ride, 1980). De igual modo, la lignificación limita la difusión de sustancias entre el hongo y la planta, de forma que las toxinas no puedan penetrar en la célula vegetal y el hongo no se pueda nutrir de la planta (Siranidou *et al.*, 2002). No obstante, los precursores fenólicos de la lignina y los radicales libres producidos durante la polimerización también pueden aumentar la resistencia al inactivar las membranas, enzimas, toxinas y desencadenantes fúngicos, de modo que no solo un mayor contenido de lignina es sinónimo de mayor resistencia (Funnell *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2013).

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran generalmente en pequeña cantidad en las paredes celulares vegetales (1-8%), siendo los más abundantes en el maíz el ácido ferúlico (FA) y el ácido *p*-cumárico (pCA) (Cao, 2011). En el caso concreto de las sedas, varios autores señalan que estos compuestos posiblemente se acumulen en mayor concentración que en otras partes de la planta (Mendoza-López *et al.*, 2018). El FA se esterifica a los residuos de arabinosa de las cadenas de xilano, concretamente entre el grupo carboxilo del FA y el grupo hidroxilo del C₅ de la arabinosa (Fig. 3.B). El FA esterificado puede dimerizarse mediante reacciones de oxidación por peroxidasas, dando lugar a diferúlicos (DFAT) que entrecruzan la pared celular. De igual forma, los arabinoxilanos ferulados pueden unirse a unidades G de ligninas mediante enlaces éter, actuando como un puente de unión entre la lignina y la hemicelulosa (Santiago *et al.*, 2013).

Por otro lado, el pCA en las paredes celulares parece estar asociado con la lignificación. Pequeñas cantidades pueden estar esterificadas a las cadenas de arabinoxilanos, pero generalmente se incorpora esterificado a monolignoles, principalmente al alcohol sinapílico (S). No funciona como un agente de entrecruzamiento entre polímeros de la matriz de la pared celular, de modo que se ha sugerido que puede tener una función de transferencia de radicales en el proceso de polimerización de la lignina (Santiago *et al.*, 2013).

El FA, los DFAT y el pCA se han relacionado con la resistencia de la pared celular a patógenos. Se ha observado que la concentración de estos compuestos varían entre cultivares

resistentes y susceptibles, y que tras el ataque de hongos tienden a aumentar. Hay varios estudios sobre los efectos de la infección de *F. graminearum* en la concentración de hidroxycinamatos en el grano de maíz (Bily *et al.*, 2003; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012); pero más recientemente se estudiaron los efectos de la infección por *F. verticillioides* (Sampietro *et al.*, 2013). Los genotipos más resistentes exhibieron altos niveles de hidroxycinamatos, 3 veces mayores que los genotipos susceptibles. Los altos niveles de hidroxycinamatos son un rasgo asociado a una menor gravedad de la enfermedad y a una limitada acumulación de fumonisinas.

Otros estudios hablan del papel de estos compuestos en relación a la resistencia de *Fusarium* en tejidos de médula de maíz (Santiago *et al.*, 2007), y en concreto, el de Cao *et al.* (2011) estudió las sedas del maíz. Ese ensayo solo se centró en fenoles de pared y en su evolución tras inocular artificialmente las líneas. En el mismo se sugirió como hipótesis que la cantidad de hemicelulosa y su constitución podría interferir en la resistencia. Por todo ello, en el presente estudio se evalúa el contenido de compuestos solubles y los componentes principales de las paredes celulares a lo largo del desarrollo de las sedas en busca de posibles componentes de defensa.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Este trabajo se desarrolla con el fin de avanzar en el estudio de los mecanismos de defensa presentes de modo natural en la planta frente a la infección por *Fusarium*.

De acuerdo al estado químico en el que se encuentran los componentes analizados, este trabajo presenta dos sub-objetivos:

1. Evaluar la concentración de los fenoles y azúcares solubles presentes en las sedas de maíz a lo largo del envejecimiento de las mismas. Relacionar dicha evaluación con la resistencia a la infección fúngica ocasionada por *F. verticillioides*.
2. Evaluar la concentración de los componentes principales de las paredes celulares presentes en las sedas de maíz a lo largo del envejecimiento de las mismas. Relacionar dicha evaluación con la resistencia a la infección fúngica ocasionada por *F. verticillioides*.

El plan de trabajo desarrollado ha seguido las siguientes etapas:

1. Siembra de ensayo en campo con los genotipos seleccionados y recogida de muestras (Junio-Agosto, 2017)¹.
2. Procesado de muestras en el laboratorio -secado y molienda de los tejidos (Enero, 2018).
3. Análisis de muestras siguiendo diferentes protocolos de análisis [espectrofotometría, gravimetría, cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (GC)] (Febrero-Mayo, 2018)
4. Análisis estadístico de resultados y revisión de artículos para discusión (Abril-Junio, 2018).
5. Redacción de la memoria del trabajo fin de grado (Mayo-Junio, 2018).

¹ Trabajo realizado por personas ajenas a la elaboración de esta memoria.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal y diseño experimental

El material evaluado consistió en la evaluación de la composición de las sedas de las líneas puras de maíz CO266 y CO441 previamente descritas (Reid *et al.*, 1992; Reid *et al.*, 2003). Se realizaron ensayos siguiendo un diseño en parcelas divididas con 3 repeticiones. La parcela elemental consistió de 6 surcos de 21 plantas con una densidad de 70.000 plantas/ha.

En cada parcela experimental se recogieron muestras de sedas siguiendo los siguientes tiempos de recogida (2 días, 6 días, 14 días y 21 días tras floración femenina). Tiempos teniendo en cuenta la emergencia de las sedas a través del canal de las sedas.

En cada toma, se recogieron entre 5 y 7 mazorcas por subparcela. Se dividió la mazorca en tres tercios y se eliminó el de la zona basal en contacto con el pedúnculo. Se eliminaron las brácteas y se desprendieron y recogieron las sedas correspondientes a los dos tercios superiores de la mazorca incluyendo las sedas expuestas. El material se conservó a -20 C hasta su procesado para análisis.

3.2. Valoración de la resistencia a la podredumbre de la mazorca causada por *F. verticillioides*

Para la evaluar la resistencia, las plantas fueron ensayadas en condiciones de inoculación artificial. La inoculación de las plantas con *F. verticillioides* se realizó entre 7 y 14 días después de la fecha de floración femenina de cada genotipo. El inóculo de *F. verticillioides* se inyectó en el canal de las sedas de la mazorca, empleando una jeringa y una aguja hipodérmica para la inyección (Fig. 4.A). Se inyectó un volumen de 2 ml de la suspensión de esporas, en 7-10 plantas de cada parcela. Las plantas inoculadas fueron elegidas al azar del mismo ensayo que las plantas utilizadas para el análisis de sedas naturales.

El inóculo se preparó a partir de un aislado local de *F. verticillioides* mantenido en la Misión Biológica de Galicia y caracterizado como toxigénico (Cao *et al.*, 2014). Para la preparación se siguió el protocolo establecido por Reid *et al.* (1996) empleando una forma modificada del medio líquido de Bilay. Entre 6-10 fragmentos de 1 cm² del cultivo en agar papa dextrosa (PDA) con micelio se añadieron al medio líquido esterilizado (aproximadamente 600 ml). El cultivo en medio líquido se mantuvo en crecimiento en condiciones de luz natural suplementada con luz artificial, y sometido a periodos de agitación de una hora cada cuatro horas de reposo, para evitar el crecimiento excesivo del micelio y la formación de agregados. Al cabo de unos 5-7 días, el medio se filtró a través de gasas para eliminar el micelio y los restos de agar y se realizó el recuento de esporas. Se utilizó una concentración de inóculo de 500.000 esporas/ml.

En cosecha (70 días aproximadamente después de la floración) se recogieron las mazorcas inoculadas. Se eliminaron las brácteas y se evaluó visualmente la infección producida por *F. verticillioides* en los granos, utilizando una escala de 1 a 7 en función del porcentaje de granos infectados, correspondiendo el 1 a la no presencia de síntomas visibles de infección y el 7 a más del 75% de los granos de la mazorca con síntomas de infección (Fig. 4.B y 4.C).

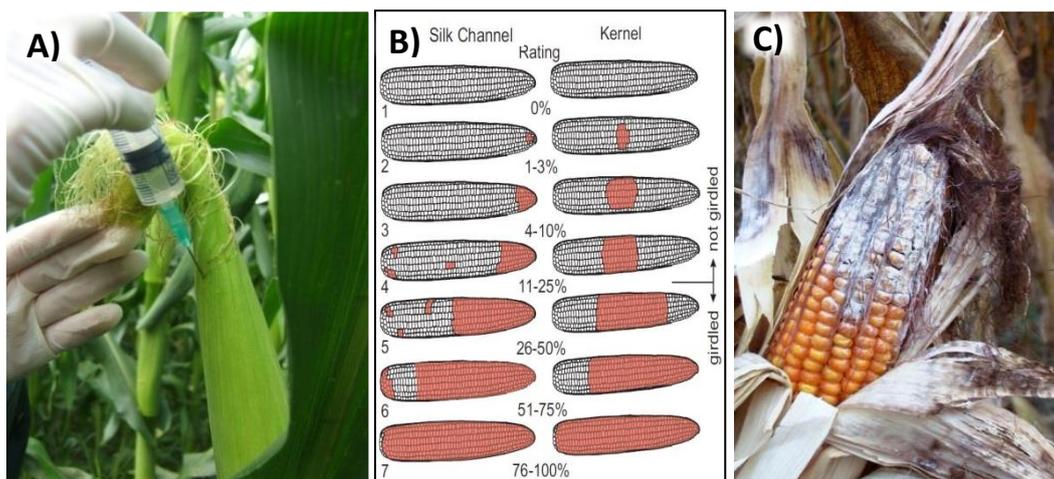


Figura 4. (A) Inoculación en el canal de las sedas, (B) escala visual de daño en grano (tomado de Reid *et al.*, 1996) y (C) daño de la mazorca en campo tras inoculación con *Fusarium*.

3.3. Determinaciones bioquímicas²

3.3.1. Determinación del contenido de azúcares solubles

Para la valoración del contenido de azúcares solubles fueron necesarios una serie de lavados previos con EtOH (70%). A 50 mg de muestra molida se le hicieron dos lavados de 24h con 1 ml de EtOH (70%). El EtOH fue recuperado, en ambos casos, en un mismo tubo *falcon*. El *pellet* fue de nuevo lavado dos veces con 1 ml de EtOH (70%) sin esperas. Todos los sobrenadantes se recuperaron en un único tubo. Luego se evaporó el contenido en un concentrador de muestras *Speed Vac* y se redisolvió el residuo en 4 ml de H₂O.

Sobre la fracción acuosa se realiza el método del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956). Se añadió 0,4 ml de fenol (5%) y 2 ml de H₂SO₄ (97%) a 0,4 ml de muestra diluida 1/100, en base a la concentración de saturación de respuesta del espectrofotómetro en relación a los azúcares de las muestras. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando glucosa como estándar.

3.3.2. Determinación del contenido de fenoles totales

El total de fenoles solubles fue determinado mediante una variación del método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* (Singleton *et al.*, 1965). Se añadió 1,5 ml de EtOH (80%) a 50 mg de muestra molida y se incubó durante 2h en oscuridad y rotación. Luego se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 4000 rpm para poder extraer una alícuota de 0,1 ml a un tubo de ensayo. Se le añadió 0,9 ml de H₂O, 0,125 ml de reactivo *Folin-Ciocalteu reagent* diluido en H₂O (1:1) y 0,5 ml de una disolución de Na₂CO₃ (20%). Se incubó en baño de agua a 45 °C durante 15 min y se leyó la absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando ácido gálico como estándar.

3.3.3. Determinación del contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se valoró mediante una variación del método de Chang *et al.*, (2002). Se añadió 1,5 ml de EtOH (80%) a 50 mg de muestra molida y se incubó durante 2h en oscuridad y rotación. Luego se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 4000 rpm para poder extraer una alícuota de 0,1 ml a un tubo de ensayo. Se le añadió 0,19 ml de MeOH (100%), 0,1 ml de AlCl₃ (10%), 0,1 ml de CH₃CO₂K (1M) y 2,8 ml de H₂O. Se incubó 30 min a temperatura

² Los reactivos de laboratorio fueron adquiridos a Sigma Aldrich/Merck, España.

ambiente y se leyó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando rutina en EtOH (70%) como estándar.

3.3.4. Determinación del contenido de antocianos

Los antocianos fueron cuantificados por el método de Laitinen *et al.* (2008). Se añadió 1,5 ml de una disolución MeOH:H₂O:HCl (7:2:1) a 50 mg de muestra molida y se incubó 24h a 4 °C en rotador. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 4000 rpm y se leyó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando una solución de cianidina en MeOH:H₂O:HCl (7:2:1) como estándar.

3.3.5. Obtención de paredes celulares

La obtención de paredes se realizó mediante modificaciones del método de Encima *et al.*, (2002). Consistió en someter a 1 g de tejido molido a dos extracciones de 24h con 10 ml de EtOH (70 %). Al residuo obtenido, denominado residuo insoluble en alcohol (AIR), se le realizaron primero 2 extracciones de 5 y 24h con 10 ml de DMSO y 2 lavados consecutivos con 10 ml de tampón fosfato (0,1M, pH: 7) y, a continuación, 2 nuevas extracciones de 24h con 10 ml de α -amilasa [2,5 U/ml en 0,01M tampón fosfato (0,1 M, pH: 7)] y dos lavados consecutivos con 10 ml de EtOH (70%). Como resultado se obtuvo un residuo insoluble en alcohol dealmidonado (AIR-d). Este residuo fue sometido a dos extracciones de 5 y 24h con 7 ml de PAW (fenol-acético-agua) y luego se le realizaron 3 lavados consecutivos con 10 ml de EtOH (70%) y 3 lavados con 10 ml de acetona (100%). Por último, el residuo se secó en la estufa a 50 °C durante 2 días.

3.3.6. Determinación de la fracción hemicelulósica de la pared celular: azúcares neutros y ácidos urónicos

Para el análisis de hemicelulosa se realizó un paso previo siguiendo una modificación del método de Albersheim *et al.* (1967). Este paso consistió en realizar la hidrólisis de 5 mg de paredes añadiéndole 2 ml de TFA (2M) e incubando a 121 °C durante 1h en *termoblock*.

A continuación, el contenido de azúcares neutros se determinó por el método del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956). Se añadieron 0,4 ml de fenol (5%) y 2 ml de H₂SO₄ (97%) a 0,4 ml de muestra hidrolizada con una dilución 1/25, en base a la concentración de saturación de respuesta del espectrofotómetro en relación a los azúcares de las muestras. Se agitó en *vortex* y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizó la lectura de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando glucosa como estándar.

El contenido de ácidos urónicos se valoró por el método colorimétrico de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973). En baño de hielo, se añadieron 2,4 ml de tetraborato (0,0125M) en H₂SO₄ a 0,4 ml de muestra hidrolizada, se agitó en *vortex* y se incubó 5 min en baño de agua hirviendo. Se dejó enfriar para añadirle 40 μ l de m-hidroxibifenil 0,15% (1,5 mg/ml) en NaOH (0,5%) e incubar de nuevo 5 min en baño de ultrasonidos. Por último, se midió la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando como ácido glucurónico estándar.

3.3.7. Determinación de la fracción celulósica

Para determinar el contenido de celulosa se siguió el método de Updegraff (1969), con las condiciones hidrolíticas descritas por Seaman *et al.* (1963). Se resuspendieron 5 mg de paredes celulares en 3 ml de C₂H₄O₂/HNO₃/H₂O (8:1:2 v/v) y se realizó la hidrólisis en un baño de agua hirviendo durante 30 min. Se dejó enfriar y se centrifugó a 4000 rpm 15 min. Al *pellet* se

le realizaron dos lavados, uno con 5 ml de H₂O y otro con 3 ml de acetona. El residuo restante se dejó secar en una estufa a 60 °C hasta obtener un peso constante. Se redisolvió en 0,2 ml de H₂SO₄ (72 %, 13,51 M) durante 3h a temperatura ambiente. Luego se ajustó la concentración del H₂SO₄ a 1M añadiendo 2,2 ml de H₂O y se hidrolizó la muestra a 110 °C durante 2,5h en *termoblock*.

Los azúcares liberados se valoran por el método de la antrona de Dische (1962). A 0,5 ml de muestra hidrolizada se le añadió 1 ml de antrona (0,2 %) en H₂SO₄ concentrado y se agitó en *vortex*. Luego se incubó en baño de agua hirviendo durante 5 min y, una vez frío, se leyó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Spectronic GENESYS 10 BIO*) utilizando como glucosa estándar.

3.3.8. Derivatización de azúcares de pared celular y análisis por GC

Para el análisis de los azúcares neutros de la pared celular se siguió el método de Fornalé *et al.* (2015). Primero se realizó una hidrólisis de 500 mg de paredes añadiendo 1 ml de TFA (2M) e incubando durante 1h a 121 °C en un *termoblock*. Luego se centrifugó para recuperar el sobrenadante que fue evaporado en *Speed Vac*. El residuo obtenido se redisolvió en 0,5 ml de NaBH₄ (20 mg/ml en NH₄OH 1N) y se incubó 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se le añadió 3-4 gotas de C₂H₄O₂ glacial para parar la reacción y se evaporó en *Speed Vac*. Para eliminar el C₂H₄O₂ por completo, el residuo se reconstituyó en 1 ml de MeOH y se volvió a evaporar, y esto se repitió 4 veces.

Por último, se añadió 1 ml de Ac₂O al residuo y se incubó a 121 °C durante 3h. Tras centrifugar se recuperó el sobrenadante y se evaporó en *Speed Vac*. El residuo se resuspendió con 1 ml de CH₂Cl₂ y se filtró a un vial de 2 ml. Se añadieron unas gotas de H₂O para evitar la evaporación y se mantuvo la muestra a -20 °C hasta el análisis por CG. El análisis se realizó en una columna capilar SP-2380 (30 MX 0,25 mm i.d., Supelco) usando un Perkin Elmer Autosystem. El programa de temperatura aumentó de 180 °C a 230 °C a una velocidad de 1,5 °C/min.

3.3.9. Determinación del contenido de lignina

El contenido de lignina se obtuvo mediante una modificación del protocolo de cuantificación de Lignina Klason de Dence (1992). Se añadieron 2 ml de H₂SO₄ (72%) a 50 mg de muestra molida en un bote *Pirex* y se incubó en un baño a 30 °C durante 1h. Después se diluyó el H₂SO₄ a 2,48% añadiéndole 56 ml de H₂O y se autoclavó a 115 °C durante 3h. Una vez que se enfrió la muestra, se filtró con filtros de fibra de vidrio previamente pesados y el residuo recogido se dejó secar en la estufa a 60 °C durante un día. Finalmente se pesaron los filtros con residuo, y tras restarle el peso del filtro, se obtuvo el peso residual.

3.3.10. Extracción de fenoles en la pared celular

Para la extracción de fenoles esterificados se siguió el método descrito por Santiago *et al.* (2006). A 1 g de tejido molido se le añadieron 30 ml de MeOH (80%) y la mezcla se agitó en oscuridad durante 1h. Pasado el tiempo de agitación, se desechó el sobrenadante tras previa centrifugación de 10 min a 4000 rpm. Al *pellet* se le añadieron 20 ml de NaOH (2M) y se creó una atmósfera de N en las muestras. A continuación, se agitó 4h en oscuridad. Trascorridas ese tiempo, se ajustó el pH a 2 utilizando NHCl (6M) y/o NaOH (6M) y se centrifugó 10 min a 4000 rpm. Posteriormente se realizaron dos lavados del *pellet* con 10 ml de H₂O y se recogieron los sobrenadantes en un mismo tubo. Este último fue centrifugado 15 min a 4000 rpm. Luego se realizaron dos extracciones líquido-líquido en embudos de decantación con 50 y 30 ml de EtAc y se dejó secar en *Speed Vac* durante 8h. Por último, se resuspendió la muestra

seca en 1,5 ml de MeOH de HPLC y se filtró (filtros PTFE de 20 μm) a viales de 2 ml para hacer el análisis final mediante la técnica de HPLC. La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard ChemStation series 1100, con una columna Waters YMC ODS-AM (100 x 2 mm, 3 μm). La fase móvil que se utilizó fue una solución de acetonitrilo (solvente A) y trifluoroacético (0,05%) en H₂O (pH 3,4) (solvente B). El flujo de fase móvil fue de 0,3 ml/min, y el tiempo total del análisis fue de 21 min. El volumen de muestra inyectado fue 4 μl . Se cuantificaron los monómeros FA y pCA y se calculó la concentración final de DFAT en base a la suma de cuatro isómeros identificados (5-5, 8-o-4, 8-5l y 8-5b).

3.3.11. Fraccionamiento de la pared celular con KOH

La fracciones de la pared se obtuvieron tratando consecutivamente los residuos de la pared celular con soluciones de KOH según Mérida *et al.* (2009). Se pesaron 100 mg de paredes, se les añadió 15 ml de KOH 0,1M + 20 mM NaBH₄ y se dejó en agitación durante 24h. Luego se centrifugó 10 min a 4000 rpm y, mientras la fracción soluble se recuperó a un tubo *falcon*, el residuo se lavó con 10 ml de H₂O. El lavado se recuperó al mismo tubo *falcon* que la fracción soluble. A su vez, al residuo obtenido se le añadieron 15 ml de KOH 0,4M + 20 mM NaBH₄ y se dejó nuevamente en agitación durante 24h. Trascurrido el día, se extrajo la fracción soluble y se lavó con H₂O de igual forma que anteriormente. Los extractos se acidificaron a pH 5 con C₂H₄O₂ y se valoró el contenido de azúcares neutros por el método del fenol-sulfúrico de Dubois *et al.* (1956).

3.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza correspondiente a un diseño completamente aleatorio en el que las fuentes de variación fueron el genotipo y el periodo de recogida. Ambas fueron consideradas fuentes de variación fijas. Los análisis se realizaron mediante el procedimiento GLM (General linear Model) de SAS (SAS, 2007). Debido a que la varianza de la interacción genotipo x periodo de recogida fue significativa para varios caracteres se llevaron a cabo análisis particulares por genotipo y por periodo de recogida. Las medias se compararon utilizando la mínima diferencia significativa (MDS) protegida de Fisher.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de resistencia frente a *F. verticillioides*

En relación a la evaluación de la severidad de los daños en la mazorca en una escala del 1 al 7 de las dos líneas puras de maíz (CO226 y CO441) bajo inoculación con *F. verticillioides* en el canal de las sedas, se observó que en la línea CO441 el daño fue de un valor promedio de 1,2, mientras que en la línea CO226 fue de 2,6 (ver escala Fig. 4.B). Aunque los daños fueron escasos la diferencia entre ambos genotipos fue significativa ($p \leq 0,01$).

En estudios previos, la línea pura CO441 fue seleccionada por presentar una mayor resistencia a la infección por *F. graminearum* a través del canal de las sedas, con un promedio de daño de 2,8 utilizando la misma escala del 1 al 7 (Reid *et al.*, 2003). Por el contrario, para la línea más sensible, CO266, el daño fue evaluado con valores en daño en torno a 6, utilizando la misma escala y procedimiento de inoculación (Reid *et al.*, 1992). En 2011, estudiando la severidad del daño causado por *F. graminearum* en 4 líneas puras de maíz, se volvieron a evaluar los genotipos CO266 y CO441, y el daño causado en la mazorca mostró un valor promedio de 6,15 y 2,77, respectivamente (Cao *et al.*, 2011).

Las diferencias en la severidad del daño causado por *F. verticillioides* y *F. graminearum*, puedan estar influenciadas por las condiciones ambientales, aunque se conoce que *F. graminearum* es mucho más agresivo que *F. verticillioides* en el proceso de infección (Santiago *et al.*, 2007). No obstante, nuestros resultados permiten observar que la línea catalogada como resistente a *F. graminearum* también lo es para *F. verticillioides*.

Ahora bien, estas diferencias genotípicas en cuanto a resistencia a *Fusarium* pueden deberse a la existencia de varios mecanismos en diferentes tejidos, en el caso concreto de las sedas, pueden intervenir factores morfológicos, como la longitud de la seda y la abundancia de estas, factores fisiológicos, como el tiempo de floración y la edad de la seda, y/o factores bioquímicos, como el contenido de azúcares o fenoles que comentamos a continuación.

4.2. Compuestos solubles y resistencia frente a *Fusarium*

En cuanto a la variación de composición a lo largo del crecimiento y envejecimiento de las sedas, el contenido de azúcares solubles disminuyó, detectándose una reducción muy significativa entre los 6 y 14 días después de la floración para ambos genotipos (Tabla 1). Asimismo, se observó un contenido de azúcares significativamente mayor en la línea pura CO441, aunque solo en el periodo de 2 días desde la floración (596,69 mg/g vs 517,0 mg/g). A medida que las sedas envejecieron las diferencias entre genotipos se suavizaron (Tabla 1).

Para el contenido de fenoles solubles se encontraron diferencias significativas en función del periodo de recogida de las sedas, no obstante, en el genotipo susceptible CO266 no hubo una clara tendencia a aumentar o a disminuir. Por el contrario, en el genotipo resistente CO441 se observó una clara disminución con el envejecimiento de las sedas (Tabla 1). A los 21 días desde la floración, el genotipo resistente disminuye tanto su contenido en fenoles solubles que muestra una evidente diferencia respecto al genotipo susceptible (5,82 mg/g vs 7,26 mg/g).

Para los flavonoides también disminuye su concentración con el envejecimiento de las sedas en ambos genotipos. En la línea CO266 disminuye considerablemente entre los 6 y 14 días desde la floración, mientras que en la línea CO441 ya se registra una disminución significativa entre los 2 y 6 días, y luego sigue disminuyendo de forma considerable hasta los 21 días (Tabla 1). Entre genotipos solo se encuentran diferencias a los 14 días cuando el contenido en el genotipo CO441 es mayor que en el CO266 (3,24 mg/g vs 2,66 mg/g).

Por último, los antocianos solo mostraron diferencias entre periodos de recogida para el genotipo resistente CO441; entre los 2 y 6 días la concentración aumentó (0,12 mg/g vs 0,16 mg/g) y entre los 6 y 21 días disminuyó (0,16 mg/g vs 0,13 mg/g). Cuando el genotipo resistente mostró las concentraciones más bajas, a los 2 y 21 días, es cuando se observaron diferencias significativas con el genotipo susceptible CO266 (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de componentes solubles en las sedas de dos genotipos maíz (CO266 y CO441) recogidas en 4 periodos después de la floración (2 días, 6 días, 14 días y 21 días) en un ensayo experimental desarrollado en 2017. Los datos se expresan en mg/g de materia seca.

Carácter	Genotipo ^a	Periodo de recogida ^b				MDS ^c
		2d	6d	14d	21d	
Azúcares	CO266	517,00 ^A	499,87 ^A	377,90 ^B	339,13 ^B	82,04***
	CO441	596,69 ^A	545,95 ^A	347,52 ^B	399,82 ^B	87,24***
	MDS	76,50***	--	--	--	
Fenoles	CO266	6,21 ^C	7,78 ^{AB}	6,50 ^{BC}	7,26 ^{ABC}	1,32*
	CO441	7,95 ^A	7,50 ^{AB}	6,30 ^{BC}	5,82 ^C	2,73**
	MDS	--	--	--	1,18**	
Flavonoides	CO266	4,41 ^A	3,70 ^A	2,66 ^B	2,65 ^B	0,74***
	CO441	5,96 ^A	4,00 ^B	3,24 ^{BC}	2,67 ^C	0,78***
	MDS	--	--	0,71*	--	
Antocianos	CO266	0,18 ^A	0,18 ^A	0,21 ^A	0,19 ^A	--
	CO441	0,12 ^C	0,16 ^A	0,16 ^{AB}	0,13 ^{BC}	0,03**
	MDS	0***	--	--	0,06*	

^a Las diferencias significativas entre genotipos dentro del mismo periodo de recogida se indican con el valor MDS correspondiente.

^b Para periodos de recogida dentro de un mismo genotipo, letras diferentes indican diferencias significativas.

^c MDS= Mínima diferencia significativa. Se señala con *($p \leq 0,1$), **($p \leq 0,05$) y ***($p \leq 0,01$).

No hay estudios previos disponibles en maíz que investiguen sobre el posible efecto de los azúcares solubles en la resistencia a la infección por *F. verticillioides*. Sin embargo, hay un ensayo que asegura que los azúcares solubles (glucosa y sacarosa, principalmente) estimulan la germinación de las esporas y el crecimiento micelial de *F. oxysporum*; asimismo, determina que esa estimulación es dependiente de la concentración (Wang *et al.*, 2007). Aplicado a nuestros resultados podría decirse que si *F. verticillioides* se comporta de forma similar en sedas, la infección es más proclive en las fases tempranas de las sedas (hasta los 6 días después de la floración), donde la concentración de azúcares solubles es mucho mayor en ambos genotipos (Tabla 1). Aunque en cuanto al contenido de partida parece contradecirse al observar un mayor contenido de azúcares solubles en el genotipo resistente CO441 a los 2 días (596,69 mg/g vs 517,0 mg/g). Para poder comparar nuestros resultados con los obtenidos por Wang *et al.* (2007), deberíamos primero inocular el hongo y observar si esos azúcares están disponibles, ya que en nuestro caso los análisis se realizaron sobre sedas naturales, no infectadas. Por otro lado, Costa y Nahas (2012), a pesar de que muestran que *F. verticillioides* usa los carbohidratos para diferentes procesos metabólicos fúngicos, observa que la mayor disponibilidad de glucosa no parece tener efecto ni sobre el crecimiento micelial ni sobre la germinación de conidios.

Es importante conocer la composición de los tejidos para determinar las posibles actividades farmacológicas de sus extractos, en el caso concreto de las sedas se ha determinado que son ricas en compuestos fenólicos, en especial en flavonoides (Hasanudin *et al.*, 2012). En este tejido el contenido de flavonoides está en buena correlación con el contenido fenólico soluble (Liu *et al.*, 2011). No obstante, un estudio reciente informó que las sedas de maíz amarillo tienen un contenido fenólico de 1,26 mg/g y un contenido de flavonoides de 0,160 mg/g, lo que significa que los flavonoides no son mayoritarios en sedas pero sí otros compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, pCA y FA. Además, determinaron que la presencia de antocianos

fue muy pequeña en este tipo de maíz (8×10^{-4} mg/g) (Mendoza-López *et al.*, 2018). Esto se contradice con nuestros resultados, donde se observan unos niveles de flavonoides muy altos (Tabla 1), tal y como indicaba Liu *et al.* (2011); asimismo, la concentración de antocianos es mucho mayor en nuestro ensayo. Las principales diferencias pueden deberse entre otras causas a los diferentes genotipos utilizados [aunque trabajamos con líneas puras y no variedades como Liu *et al.*, (2011)], las condiciones climáticas, los diferentes procedimientos analíticos o que las sedas que utilizó Mendoza-López *et al.* (2018) hubiesen entrado en proceso de senescencia, a pesar de que el estudio no lo indica. Como se puede observar en la tabla 1, el contenido de flavonoides se reduce significativamente con el envejecimiento de estas.

Los ácidos fenólicos a menudo están implicados en la resistencia a plagas y enfermedades (Santiago *et al.*, 2010), y además se descubrió que tienen la capacidad de inhibir la producción de micotoxinas *in vitro* (Bakan *et al.*, 2003). Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre los fenoles solubles totales, aún a pesar de que esta fracción sea la que más probablemente intervenga en la resistencia a *Fusarium*, acumulándose en la zona de infección donde desencadenan la inactivación de enzimas fúngicas (Picot *et al.*, 2010). Santiago *et al.* (2007) estudió esta fracción en la médula del maíz, y observó que, en plantas infectadas con *Fusarium*, el pCA, un componente abundante del contenido fenólico soluble, era muy bajo al inicio y que luego aumentaba rápidamente con el tiempo. Atanasova-Penichon *et al.* (2012) también estudiaron los fenoles solubles durante las primeras semanas de desarrollo de los granos de maíz. Sus resultados corroboran que efectivamente la composición de fenoles solubles evoluciona con el tiempo, pero de forma similar en genotipos resistentes y susceptibles sin inocular. En las primeras etapas de desarrollo del grano los principales compuestos son el ácido clorogénico, FA y cafeico. Hay estudios que observan que el ácido cafeico inhibe el crecimiento de *F. verticillioides* y que, junto con el FA, reduce notablemente la producción de fumonisinas *in vitro*, aunque son necesarios estudios *in vivo* para conocer realmente su efectividad (Samapundo *et al.*, 2007; Boutigny *et al.*, 2009). En cuanto al ácido clorogénico, Atanasova-Penichon *et al.* (2012) proponen su posible implicación en la resistencia a *Fusarium* al observar que su contenido aumenta en granos infectados por *F. graminearum*. Por otro lado, observaron que el contenido de fenoles solubles alcanza un máximo absoluto a los 4 días, luego disminuye progresivamente hasta el último tiempo de cosecha tanto en muestras inoculadas con *Fusarium* como sin inocular. En comparación con nuestros resultados es posible que en sedas ocurra lo mismo, ya que en el genotipo resistente CO441 se observa como a los 2 días después de la floración presentó los mayores valores de fenoles solubles (7,95 mg/g), y que a partir del día 6 el contenido empezó a disminuir hasta el último periodo de recogida, a los 21 días (5,82 mg/g) (Tabla 1). Posiblemente se deba a que existe una co-evolución entre la planta y el hongo, y es normal que la planta acumule sustancias con posible efecto antibiótico cuando las condiciones para la infección son más idóneas, con las sedas receptivas y el canal estilar abierto facilitando el avance del hongo hasta el grano.

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides y antocianos juegan un papel importante en la resistencia de la planta contra los hongos del género *Fusarium*. En un estudio de Sekhom *et al.* (2006) se exploró la inducción en sedas y grano de estos compuestos por la infección con *F. verticillioides* y *F. graminearum*. En condiciones de no inoculación, observaron que la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de los flavonoides fue muy alta, pero limitada a las primeras etapas de desarrollo de las sedas tanto en el genotipo resistente como en el susceptible, lo que concordaría con el declive progresivo del contenido en flavonoides que observamos en nuestro estudio (Tabla 1). En cuanto a diferencias entre genotipos, el estudio de Sekhom *et al.* (2006) no es comparable con nuestro ensayo, aunque sí que pone en evidencia que las diferencias en el contenido de flavonoides pueden afectar al nivel de resistencia, pero, dependiendo del genotipo, puede haber otros factores de resistencia. En el caso de los

antocianos, parecen observar que antes de la inoculación con *F. verticillioides* los niveles más altos están en la línea más susceptible, sin embargo, tras la inoculación, observaron cierta inducción en la línea resistente, sugiriendo que el papel de estos compuestos en la resistencia a *F. verticillioides* no es a nivel constitutivo sino inducido.

En conjunto, los datos sugieren que la cantidad de flavonoides presentes en el tejido de las sedas no inoculadas podría tener relación con la resistencia del maíz a la pudrición de la mazorca por *F. verticillioides*. La tendencia es que la mayor concentración de flavonoides se encuentre en el genotipo resistente CO441, y las diferencias son significativas a los 14 días después de la floración, cuando se produce el periodo más crítico para la infección (entre los 6 y 14 días) (Reid *et al.*, 1996).

4.3. Componentes de la pared celular y resistencia frente a *Fusarium*

4.3.1. Polisacáridos: hemicelulosa y celulosa

De acuerdo a la composición de la pared celular comenzamos la descripción de resultados comentando los datos obtenidos en cuanto a polisacáridos (hemicelulosa y celulosa) para luego continuar con composición de lignina y compuestos fenólicos implicados en el entrecruzamiento (hidroxycinamatos pCA, FA y DFAT). La fracción hemicelulósica no mostró diferencias a lo largo del envejecimiento de las sedas, únicamente se redujo ligeramente de los 14 a los 21 días desde la floración en el genotipo susceptible CO266 (de 116,0 mg/g a 92,4 mg/g) (Tabla 2). En los periodos iniciales de desarrollo de las sedas (2 y 6 días), sí hubo diferencias entre genotipos, el genotipo resistente CO441 mostró el menor contenido de hemicelulosa (media de 85 mg/g vs 115 mg/g) (Tabla 2).

En cuanto a la composición de azúcares neutros pertenecientes a la fracción de la hemicelulosa se observaron mayores concentraciones de glucosa, xilosa y arabinosa en ambos genotipos en todos los periodos, aunque los porcentajes variaron según el periodo de recogida con ratios de 46:31:19 a los 2 días y 7:32:56 a los 21 días (Tabla 2; Fig. 5). En este caso podemos destacar que la glucosa que forma parte de la fracción hemicelulósica disminuyó drásticamente con el envejecimiento de las sedas en ambos genotipos pasando a componerse en su mayor parte de arabinoxilano a los 21 días (Fig. 5). En la línea CO266 empieza a disminuir de forma significativa a partir del día 6 después de la floración, mientras que en la CO441 disminuye desde el día 2 (Tabla 2). Entre genotipos también se observó una clara diferencia a los 6 y 14 días, siendo mayor en ambos casos en la línea CO266 (Tabla 2).

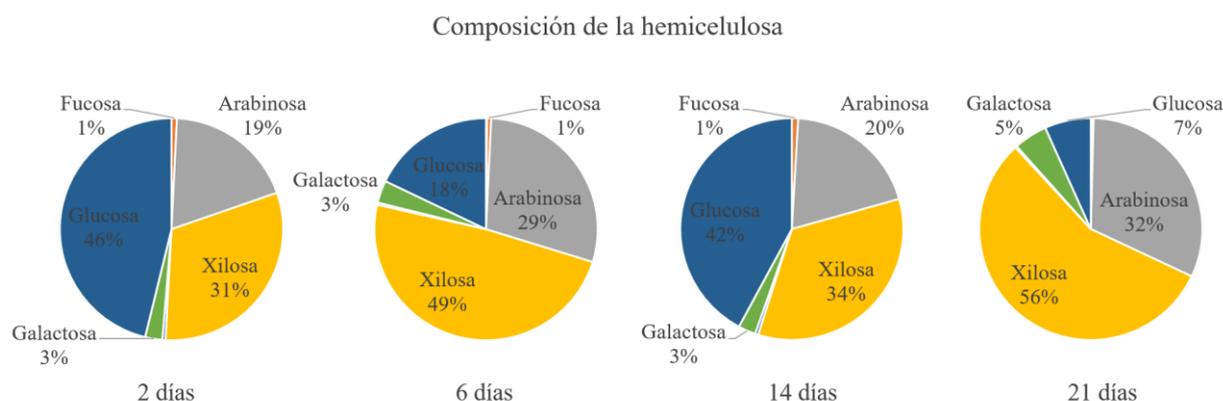


Figura 5. Composición de la fracción hemicelulósica de las sedas de maíz en función del periodo de recogida después de la floración (2 días, 6 días, 14 días y 21 días) en un ensayo experimental desarrollado en 2017. Se representan las medias incluyendo ambos genotipos (CO441 y CO266) evaluados.

Tabla 2. Concentración de componentes polisacáridos de las paredes celulares en las sedas de dos genotipos de maíz (CO266 y CO441) recogidas en 4 periodos después de la floración (2 días, 6 días, 14 días y 21 días) en un ensayo experimental desarrollado en 2017. Los datos se expresan en mg/g de materia seca.

Carácter	Genotipo ^a	Periodo de recogida ^b				MDS ^c
		2d	6d	14d	21d	
Hemicelulosa	CO266	133,61 ^A	116,01 ^A	116,05 ^A	92,43 ^B	20,26**
	CO441	94,15 ^A	76,97 ^A	99,91 ^A	104,45 ^A	--
	MDS	7,97***	29,44**	--	--	
Ramnosa	CO266	0,00	0,00	0,13	0,11	--
	CO441	0,00 ^B	0,00 ^B	0,20 ^A	0,31 ^A	0,19**
	MDS	--	--	--	--	
Fucosa	CO266	1,28	1,06	0,67	0,13	--
	CO441	0,47	0,69	0,66	0,24	--
	MDS	--	--	--	--	
Arabinosa	CO266	22,85	18,84	30,95	30,03	--
	CO441	19,61	18,86	33,49	32,63	--
	MDS	--	--	--	--	
Xilosa	CO266	40,40	35,30	55,47	53,97	--
	CO441	29,66	30,23	52,77	57,34	--
	MDS	11,39*	--	--	--	
Manosa	CO266	0,50	0,82	0,31	0,21	--
	CO441	0,49	0,04	0,41	0,30	--
	MDS	--	0,68**	--	--	
Galactosa	CO266	3,33	2,00	3,13	4,54	--
	CO441	2,27	2,84	4,10	5,16	--
	MDS	--	--	--	--	
Glucosa	CO266	61,34 ^A	54,31 ^A	24,59 ^B	6,04 ^C	9,96**
	CO441	42,43 ^A	26,27 ^B	15,09 ^C	7,22 ^D	3,58***
	MDS	--	19,32**	12,67*	--	
Ratio Ara/Xil	CO266	0,57	0,54	0,56	0,57	--
	CO441	0,66	0,63	0,64	0,60	--
	MDS	0,09**	--	0,07**	--	
Urónicos	CO266	4,49 ^B	4,85 ^B	5,18 ^B	7,69 ^A	0,88***
	CO441	4,63 ^B	4,78 ^B	4,85 ^B	8,58 ^A	1,87***
	MDS	--	--	--	--	
Celulosa	CO266	37,19 ^B	43,98 ^B	46,39 ^B	67,48 ^A	10,49***
	CO441	37,94 ^C	37,47 ^C	46,50 ^B	65,20 ^A	8,09***
	MDS	--	--	--	--	

^a Las diferencias significativas entre genotipos dentro del mismo periodo de recogida se indican con el valor MDS correspondiente.

^b Para periodos de recogida dentro de un mismo genotipo, letras diferentes indican diferencias significativas.

^c MDS= Mínima diferencia significativa. Se señala con *($p \leq 0,1$), **($p \leq 0,05$) y ***($p \leq 0,01$).

La xilosa no mostró diferencias en función del periodo de recogida pero sí que hay diferencias entre genotipos a los 2 días después de la floración, siendo mayor la concentración en el genotipo CO266 (40,40 mg/g vs 29,7 mg/g). A partir de los 2 días esas diferencias ya no se aprecian. Por el contrario, la arabinosa no mostró diferencias entre periodos de recogida ni entre genotipos (Tabla 2).

El ratio Ara/Xil, que nos indica el grado de sustitución de los polímeros de xilano, no mostró diferencias con el envejecimiento de las sedas, pero sí hay una tendencia a ser mayor en el genotipo resistente CO441, con diferencias significativas solo a los 2 y 14 días (Tabla 2).

El resto de monómeros, además de tener unas concentraciones muy bajas (por debajo de 5 mg/g) no mostraron diferencias significativas entre periodos de recogida ni entre genotipos a excepción de la ramnosa y la manosa (Tabla 2). La ramnosa aumentó de forma significativa en el genotipo CO441 entre los 6 y 14 días (de 0,00 mg/g a 0,20 mg/g), mientras que la manosa mostró diferencias entre genotipos a los 6 días, siendo mayor la concentración en el genotipo CO266 (0,82 mg/g vs 0,04 mg/g). Por otro lado, los ácidos urónicos aumentan en sedas a los 21 días después de la floración en ambos genotipos; y no se encuentran diferencias entre genotipos (Tabla 2).

La celulosa, a diferencia de la fracción hemicelulósica, sí mostró un aumento significativo con el tiempo en ambos genotipos (Tabla 2). El aumento fue similar en ambas líneas, y no se apreciaron diferencias significativas entre genotipos (Tabla 2).

En la fracción de polisacáridos de la pared celular vegetal tipo, la celulosa suele ser el componente más importante, representando en torno al 35-50% del peso seco (Azcón-Bieto *et Tazón*, 2008). En cambio, en las sedas del maíz analizadas la celulosa llega a representar solo 1/3 en comparación con la hemicelulosa, sobre todo en las primeras etapas de desarrollo (Tabla 2).

En cuanto a la composición de la fracción hemicelulósica de las sedas de maíz ha sido caracterizada por varios autores. Sin embargo, esta composición depende en gran medida de la técnica de análisis, así como del genotipo o edad de las sedas. Por ejemplo, nuestros datos difieren muchos de los encontrados por Li *et al.* (2008), donde detectaron por HPLC una composición formada por glucosa, galactosa, arabinosa, ácido galacturónico, manosa y xilosa con una relación molar de 1: 0,89: 0,48: 0,39: 0,34: 0,26; o de los de Wang *et al.* (2009), que informaron de una composición de ramnosa, arabiosa y manosa, con una relación 1,50: 1,00; 1,12 obtenida por extracción asistida en microondas. En ambos casos no se define el material de análisis o la edad de las sedas.

Nuestros datos son comparables con el estudio de Tabuchi *et al.* (2011) donde existe coincidencia en la técnica analítica. En ese ensayo observaron que el monosacárido principal fue la xilosa (38%) seguido de ácido galacturónico (30%), arabinosa (26%) y glucosa (4%). Esta composición sugirió que el polisacárido dominante (65% aprox.) es un GAX altamente sustituido, con cantidades menores del ácido urónico galacturónico (30%) y glucanos de enlace mixto (4%). En nuestros resultados, debido al contenido de glucosa que tenemos en los análisis de sedas jóvenes, podría considerarse que tenemos una cantidad importante de β -glucanos; y que con el envejecimiento de las sedas se produce una bajada de los mismos hasta que acaban siendo inapreciables, momento en el que posiblemente se hiciesen los análisis de Tabuchi *et al.* (2011), que tampoco especifica la edad de las sedas analizadas. De esta forma, pensaríamos en una composición inicial de las sedas donde son abundantes los arabinoxilanos (49%) junto con los glucanos mixtos (46%) y una composición en sedas envejecidas (21 días) donde hay mayormente GAX (96%) (Tabla 2; Fig. 5). Esto también puede ser apoyado por la presencia de mayor contenido de glucanos mixtos en paredes primarias (Barros-Ríos, 2012). El grado de sustitución del xilano fue similar en ambos ensayos. Asimismo, en nuestros resultados se pudieron observar diferencias entre el genotipo resistente y susceptible; en el genotipo resistente CO441 el grado de sustitución es mayor, lo que a priori parece conferir una mayor oportunidad a que se esterifique FA y se dimerice, provocando que los polisacáridos estén menos disponibles a las enzimas de degradación fúngicas, sin embargo, como veremos a continuación existe un mayor entrecruzamiento dimérico en el genotipo susceptible CO266.

En general podemos advertir que el contenido de hemicelulosa no varía sustancialmente con el envejecimiento de las sedas, pero sí su composición. Así, parece haber una tendencia de la xilosa y la arabinosa a aumentar, mientras la glucosa hemicelulósica disminuye con el tiempo (Tabla 2; Fig. 5).

En la evaluación del contenido de azúcares liberados del componente hemicelulósico mediante extracciones sucesivas con KOH se obtuvieron los datos que se observan en la figura 6. Cuando se hizo una digestión suave (KOH 0,1M) se vio como aumentaba el contenido de azúcares neutros liberados entre los 14 y 21 días después de la floración en el genotipo CO441 (de 16,91 mg/g a 21,58 mg/g). Además también se encontraron diferencias entre genotipos a los 2 y 21 días desde la floración, siendo mayor el contenido en la línea CO266 a los 2 días (17,80 mg/g vs 13,64 mg/g) y, por el contrario, mayor en la línea CO441 a los 21 días (21,58 mg/g vs 19,47 mg/g). Cuando se llevó a cabo una digestión de las paredes más fuerte (KOH 4M), no se encontraron diferencias ni entre el periodo de recogida ni entre genotipos, con cantidades medias en torno a los 55 mg/g de azúcares liberados (Fig. 6).

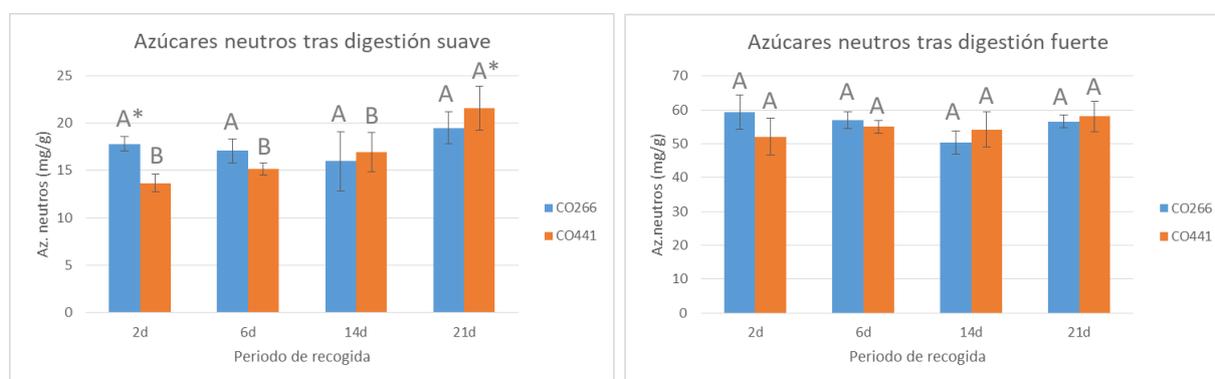


Figura 6. Concentración de azúcares de la hemicelulosa en las sedas de dos genotipos de maíz (CO266 y CO441) recogidas en 4 periodos después de la floración (2 días, 6 días, 14 días y 21 días) tras (A) una digestión suave con KOH 0,1M y (B) una digestión fuerte con KOH 4M, en un ensayo experimental desarrollado en 2017. Letras diferentes indican diferencias significativas entre periodos de recogida dentro de un mismo genotipo ($p \leq 0,05$). Un asterisco (*) indica diferencias significativas entre genotipos dentro de un mismo periodo de recogida ($p \leq 0,05$).

La posible menor disponibilidad de azúcares para el hongo a partir de la hemicelulosa en la línea resistente CO441 a los 2 días es limitada y podría condicionar el crecimiento fúngico, sin embargo, se vería compensada por un mayor contenido de azúcares solubles en esa misma línea en ese mismo periodo (Tabla 1). A los 21 días, aunque la hemicelulosa disminuye o se mantiene con el tiempo (Tabla 2), se observa un repunte en la liberación de azúcares de la hemicelulosa en ambos genotipos que podría tener que ver con que las sedas ya han entrado en senescencia (Fig. 6). En el caso del genotipo resistente CO441 éste repunte es significativo mientras que en el genotipo susceptible CO266 no lo es porque el contenido de hemicelulosa en esta línea disminuyó, y en consecuencia, la liberación de azúcares (Tabla 2; Fig. 6).

En cualquier caso, no hay estudios previos que relacionen la resistencia a hongos con los contenidos en polisacáridos y tampoco se observaron diferencias a nivel constitutivo en polisacáridos que puedan ser causantes de las diferencias en resistencia a la infección por *Fusarium*.

4.3.2. Fenoles de la pared: lignina e hidroxicinamatos

Los compuestos fenólicos, además de tener efectos antibiótico, cumplen un papel importante en la pared celular, bien por ser constituyentes básicos de la misma, como la lignina, o por estar ligados a ella, como los ácidos hidroxicinámicos.

La lignina es uno de los componentes de la pared con mayor influencia sobre el grado de resistencia mecánica de la pared. El contenido de lignina klason mostró diferencias a lo largo del envejecimiento de las sedas en ambos genotipos. En la línea CO266 aumentó significativamente entre los 2 y 6 días después de la floración (213,96 mg/g a 424,67 mg/g), aunque a partir del día 6 disminuyó y a los 21 días tuvo un valor similar al registrado a los 2 días (299,74 mg/g vs 213,96 mg/g). En el caso de la línea CO441, el contenido de lignina aumentó algo más tarde, entre los 6 y 14 días (305,44 mg/g a 403,02 mg/g) y luego también mostró una disminución a los 21 días (de 403,02 mg/g a 286,90 mg/g). Entre genotipos también se encuentran diferencias, en especial a los 6 días después de la floración, cuando el genotipo CO266 tiene un contenido mucho mayor que el CO441 (424,67 mg/g vs 305,44 mg/g). Sin embargo, a los 21 días ambos genotipos mostraron valores similares de lignina, en torno a los 290 mg/g (Tabla 3).

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos decir que aumentaron con el envejecimiento de las sedas. El pCA aumentó de forma significativa en el genotipo CO266 entre los 6 y 14 días (de 0,183 mg/g a 0,244 mg/g), y siguió aumentando entre los 14 y 21 días (de 0,244 mg/g a 0,305 mg/g) (Tabla 3). En el CO441 empezó a aumentar ya entre los 2 y 6 días (0,096 mg/g a 0,160 mg/g), y siguió aumentando hasta los 14 días (0,262 mg/g), manteniéndose constante hasta los 21 días (0,258 mg/g). El FA aumentó de forma significativa a partir de los 2 días hasta los 21 días después de la floración para ambos genotipos (Tabla 3). Y los DFAT también aumentaron con el tiempo, pero a diferencia del FA, estos empezaron a aumentar de forma considerable a partir del día 6 después de la floración hasta los 21 días en los dos genotipos (Tabla 3).

También se observaron diferencias significativas entre genotipos. En relación al pCA hay diferencias a los 2 días y a los 21 días, y en ambos casos, es mayor el contenido en el genotipo susceptible CO266 (Tabla 3). El FA no mostró diferencias entre genotipos y, los DFAT mostraron diferencias a los 2, 14 y 21 días, siendo nuevamente mayor el contenido en el genotipo susceptible CO266 (Tabla 3). En el análisis de isómeros individuales los DFA más abundantes fueron el 8-5l y el 8-o-4, este último responsable de las diferencias que se encontraron entre genotipos a nivel de DFAT (Tabla 3).

En estudios previos, la lignificación es considerada una barrera física a la invasión de patógenos por la resistencia que le confiere a la pared, haciéndola menos degradable por enzimas; o por la menor difusión de sustancias entre la planta y el hongo (Siranidou *et al.*, 2002; Santiago *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay muchos estudios disponibles sobre el efecto de este compuesto en la resistencia a *Fusarium* en el maíz. En nuestros resultados podemos observar primero que, a diferencia de otros tejidos, en las sedas la lignina es el polímero más abundante. Por otro lado, que su contenido no aumenta o disminuye de forma continua con el tiempo, sino que hay un momento dado donde su contenido se dispara y luego vuelve a disminuir (Tabla 3). Es un efecto que puede estar relacionado con el periodo de senescencia de las sedas, que dependiendo del genotipo puede iniciarse a destiempo.

Independientemente de esta diferencia de tiempos, si nos fijamos en el máximo contenido de lignina de cada genotipo, éste es mayor en el genotipo susceptible CO226 (424,67 mg/g vs 403,02 mg/g). Podríamos considerar que los niveles constitutivos de lignina no tienen relación con la resistencia a *Fusarium*; en cambio, Funnell y Pedersen (2006), que estudiaron mutantes que afectan a la síntesis de lignina, comprobaron que las líneas con menor concentración de este compuesto no son más susceptibles a la infección por *Fusarium*, sino que incluso pueden ser más resistentes. Esto puede deberse a que los precursores fenólicos de la lignina y los radicales libres producidos durante la polimerización pueden inactivar enzimas, toxinas y desencadenantes fúngicos (Santiago *et al.*, 2013). No obstante, la relación entre resistencia y lignina es muy compleja porque la variación alélica entre genotipos, además de causar

diferencias en los niveles de lignina, también afecta a otros metabolitos de la vía fenilpropanoides y regula la muerte celular programada, la cual favorece el desarrollo de hongos necrotróficos, como *F. verticillioides* (Yang *et al.*, 2017).

Tabla 3. Concentración de lignina e hidroxicinamatos de las paredes celulares en las sedas de dos genotipos de maíz (CO266 y CO441) recogidas en 4 periodos después de la floración (2 días, 6 días, 14 días y 21 días) en un ensayo experimental desarrollado en 2017. Los datos se expresan en mg/g de materia seca.

Carácter	Genotipo ^a	Periodo de recogida ^b				MDS ^c
		2d	6d	14d	21d	
Lignina	CO266	213,96 ^C	424,67 ^A	330,05 ^B	299,74 ^{BC}	89,13 ^{***}
	CO441	255,91 ^B	305,44 ^B	403,02 ^A	286,90 ^B	86,06 ^{***}
	MDS	--	102,44 ^{**}	--	--	
pCA	CO266	0,170 ^C	0,183 ^C	0,244 ^B	0,305 ^A	0,032 ^{***}
	CO441	0,096 ^C	0,160 ^B	0,262 ^A	0,258 ^A	0,034 ^{***}
	MDS	0,050 ^{**}	--	--	0,024 ^{**}	
FA	CO266	2,075 ^D	2,796 ^C	3,680 ^B	4,228 ^A	0,291 ^{***}
	CO441	1,985 ^D	2,812 ^C	3,937 ^B	4,447 ^A	0,282 ^{***}
	MDS	--	--	--	--	
Dfa 8-51	CO266	0,060 ^C	0,068 ^C	0,143 ^B	0,166 ^A	0,020 ^{***}
	CO441	0,036 ^C	0,061 ^B	0,107 ^A	0,127 ^A	0,027 ^{***}
	MDS	--	--	--	--	
Dfa 5-5	CO266	0,006 ^C	0,012 ^{BC}	0,014 ^{AB}	0,017 ^A	0,006 ^{***}
	CO441	0,006 ^C	0,010 ^{BC}	0,020 ^A	0,023 ^A	0,005 ^{***}
	MDS	--	--	--	--	
Dfa 8-o-4	CO266	0,050 ^C	0,055 ^C	0,175 ^B	0,239 ^A	0,027 ^{***}
	CO441	0,021 ^C	0,045 ^C	0,087 ^B	0,120 ^A	0,029 ^{***}
	MDS	0,020 ^{**}	--	0,057 ^{**}	0,058 ^{**}	
Dfa 8-5b	CO266	0,009 ^C	0,009 ^C	0,022 ^B	0,027 ^A	0,004 ^{***}
	CO441	0,005 ^C	0,007 ^C	0,013 ^B	0,017 ^A	0,004 ^{***}
	MDS	0,004 [*]	--	0,009 ^{**}	0,004 ^{***}	
DFAT	CO266	0,124 ^C	0,145 ^C	0,355 ^B	0,450 ^A	0,043 ^{***}
	CO441	0,068 ^C	0,122 ^C	0,227 ^B	0,286 ^A	0,059 ^{***}
	MDS	0,068 [*]	--	0,138 [*]	0,145 ^{**}	

pCA, ácido *p*-cumárico; FA, ácido ferúlico; DFAT, dímeros de ácido ferúlico.

^a Las diferencias significativas entre genotipos dentro del mismo periodo de recogida se indican con el valor MDS correspondiente.

^b Para periodos de recogida dentro de un mismo genotipo, letras diferentes indican diferencias significativas.

^c MDS= Mínima diferencia significativa. Se señala con *($p \leq 0,1$), **($p \leq 0,05$) y ***($p \leq 0,01$).

Por otro lado, en maíz, los hidroxicinamatos también se han asociado con resistencia a hongos del género *Fusarium*, fundamentalmente en granos y en tejidos del tallo (Santiago *et al.*, 2007; Atanasova-Penichon *et al.*, 2012; Sampietro *et al.*, 2013); y en 2011 Cao *et al.* estudiaron su papel en sedas.

Los principales ácidos hidroxicinámicos ligados a la pared celular en el pericarpio del grano y en tejidos de médula fueron los monómeros de FA y pCA y los dímeros de FA (DFAT) (Santiago *et al.*, 2007; Sampietro *et al.* 2013). Asimismo, Cao *et al.* (2011) aseguraron que en sedas sucedía lo mismo. El FA fue el fenol más abundante en todos los tejidos, aunque en sedas las cantidades extraídas fueron mayores que en médula y, en algunos casos, que en el pericarpio del grano. En los tejidos de sedas inoculados con un control de agua el FA fue el fenol más prevalente en todos los tiempos de cosecha y, además su contenido aumentó con el tiempo. Cao *et al.* (2011) observaron que para los mismos tiempos de cosecha que en nuestro ensayo, el FA aumenta de 5,51 mg/g a 6,30 mg/g en CO266 y de 5,29 mg/g a 7,45 mg/g en CO441. Al igual que en nuestro caso aumenta con el envejecimiento de las sedas y no hay diferencias entre

genotipos, pero las cantidades determinadas prácticamente duplican las obtenidas en este ensayo (Tabla 3). Lo mismo ocurre con la dimerización de los monómeros de FA; aumentan con el envejecimiento de las sedas, pero en el ensayo de Cao *et al.* (2011) su contenido es el doble, siendo mayor que en tejido medular (Santiago *et al.*, 2007). Esto puede ser debido a las fuertes variaciones ambientales, nuestro ensayo fue realizado en Galicia (España) en 2017, mientras que el de Cao *et al.* (2011) se llevó a cabo en Ontario (Canadá) en dos años consecutivos, 2007 y 2008. También depende del tipo de tejido, en nuestro caso, analizamos una combinación de sedas expuestas y no expuestas (en el interior de las brácteas) no inoculadas, mientras que en su caso se usaron solo sedas expuestas que habían sido inoculadas con agua estilada, pudiendo haber asimismo interferencias por la herida de inoculación.

En cuanto al aumento de DFAT en las paredes celulares con el tiempo, éste podría producirse de forma natural a medida que cesa el crecimiento celular. De esta forma, al aumentar el entrecruzamiento de polisacáridos, aumenta la resistencia estructural. Sin embargo, el contenido de DFAT es mayor en el genotipo susceptible CO266, igual que ocurrió en el ensayo de Cao *et al.* (2011).

La abundancia de DFAT en la pared celular del grano de maíz hace que los polisacáridos estén menos disponibles para las enzimas fúngicas que degradan la pared celular, lo que limita la propagación de los hongos (Atanasova-Penichon *et al.*, 2012). En el presente informe, se encontraron diferencias entre genotipos, pero los niveles más altos de DFAT se encontraron en el genotipo susceptible CO266, a pesar de lo que cabría esperar (Tabla 3). Conjuntamente con los resultados de Cao *et al.* (2011), los DFAT siguen siendo más altos en el genotipo susceptible aunque exista inoculación de *Fusarium*. Puede que las sedas se diferencien de otros tejidos en los que el contenido en DFAT se asocia con la resistencia porque se ha comprobado que la propia polinización favorece la solubilización de los polisacáridos de la pared, especialmente los glucuarabinoxilanos ferouilados y los homogalacturanos (Tabuchi *et al.*, 2011).

Los niveles de pCA encontrados en sedas fueron similares a los encontrados por Cao *et al.* (2011), mucho más bajos que los niveles de FA, y aumentaron a medida que las sedas envejecieron. El pCA ligado a la pared celular está relacionado con el proceso de lignificación en tejidos de tallo (Santiago *et al.*, 2013). De acuerdo a las cantidades de lignina encontradas, y debido a que la concentración de pCA no se relaciona con las mismas podemos suponer que la mayor parte del pCA detectado se corresponde con pCA esterificado a la hemicelulosa (arabinoxilanos). Esto también podría indicar que la composición de la lignina en las sedas es particular y podría estar constituida por menos subunidades S de lo habitual, subunidades a las que se suele esterificar el pCA. Esta puede ser una razón de por qué el genotipo susceptible CO266 tiene mayor concentración de lignina (Tabla 3). Estudios futuros deben centrarse en caracterizar la composición de la lignina utilizando por ejemplo el método de tiacidólisis.

En definitiva, la composición fenólica de las sedas no parece tener relación con la resistencia constitutiva diferencial de los genotipos al ataque de *F. verticillioides*.

5. CONCLUSIONES

En relación a los objetivos propuestos podemos destacar las siguientes conclusiones del estudio:

1. Este estudio define por primera vez el patrón de cambio de distintos componentes de las sedas de maíz a lo largo del crecimiento y envejecimiento. En un intervalo entre 2 y 21 días tras la floración, se muestran variaciones dependientes del compuesto aunque con el mismo patrón de cambio para los dos genotipos evaluados: azúcares solubles, fenoles solubles y flavonoides disminuyen, mientras que el contenido de celulosa e hidroxicinamatos aumenta. Por otro lado, compuestos como los polisacáridos hemicelulósicos o los polímeros de lignina mostraron un patrón de variación diferencial entre genotipos. Todo ello confirma la existencia de variaciones de composición para diversas familias químicas a lo largo de la maduración de las sedas y, en algunos casos, que estas variaciones son genotipo dependientes.
2. En relación con la intervención de los compuestos analizados en la resistencia a *F. verticillioides* en las sedas: (i) concentraciones altas de fenoles y flavonoides solubles en etapas tempranas podrían contribuir a la resistencia en periodos iniciales de desarrollo de las sedas, y la evolución de los mismos puede condicionar la resistencia final de los genotipos. En este caso, son necesarios más estudios al respecto en cuanto a la concentración fenólica en grupos de líneas resistentes-susceptibles; (ii) ninguno de los componentes ligados a la pared parecen tener efecto relevante en la resistencia frente a *F. verticillioides* en las sedas. Sin embargo, la composición de la lignina es elevada en este tejido y futuros estudios caracterizando su composición podrían descubrir nuevas relaciones con la resistencia.

6. REFERENCIAS

- Albersheim, P., Nevins, P. D., English, P. D., Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5: 340-345.
- Atanasova-Penichon, V., Pons, S., Pinson-Gadais, L., Picot, A., Marchegay, G., Bonnin-Verdal, M.N., Ducos, C. *et al.* (2012). Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25: 1605-1616.
- Azcón-Bieto, J. *et* Talón, M. (2008). Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membranas y pared. In: Revilla, G. *et* Zarra, I. (Eds.). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana de España S. L., pp. 3-22.
- Bakan, B., Bily, A. C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogene, B. J. R., Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of tricho-thecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2826-2831.
- Barros-Ríos, J. (2012). Fortificación de la pared celular como mecanismo de defensa frente a la plaga del taladro en el maíz. Universidad de Vigo.
- Bily, A. C., Reid, L. M., Taylor, J. H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A. J., Bakan, B., *et al.* (2003). Dehydrodimers of ferulic acid in maize grain pericarp and aleurone: Resistance factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93: 712-719.
- Blumenkrantz, N. *et* Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489.
- Boutigny, A. L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M. N., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F. (2009). Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and Tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycol. Res.* 113: 746-753.
- Butrón, A., Reid, L. M., Santiago, R., Cao, A., Malvar, A. (2015). Inheritance of maize resistance to *Gibberella* and *Fusarium* ear rots and kernel contamination with deoxynivalenol and fumonisins. *Plant Pathol.* 64: 1053-1060.
- Cao, A. (2011). Papel de los ácidos hidroxicinámicos de las sedas del maíz en la resistencia a la infección por *Fusarium graminearum*. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- Cao, A., Reid, L. M., Butron, A., Malvar, R. A., Souto, X. C., Santiago, R. (2011). Role of hydroxycinnamic acids in the infection of maize silks by *Fusarium graminearum* Schwabe. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24: 1020-1026.
- Cao, A. (2013). Prevención de la contaminación con fumonisinas en el maíz. Universidad de Vigo-Misión Biológica de Galicia.
- Cao, A., Butrón, A., Ramos, A. J., Marín, S., Souto, C., Santiago, R. (2014). Assessing white maize resistance to fumonisin contamination. *Eur. J. Plant Pathol.* 138: 283-292.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- Costa, B. O. *et* Nahas, E. (2012). Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. *Braz. J. Microbiolog.* 43 (1): 332-340.
- Dence C. W. (1992). The determination of lignin. In: Lin, S.Y., Dence, C.W. (Eds.). *Methods in lignin chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer Series in Wood Science, pp. 33-61.
- Dische, Z. (1962). General color reactions of carbohydrates. *Methods Carbohydrate Chemistry* 1: 475- 514.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, D. A., Smith, F. (1965). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Duncan, K. E. *et* Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 6-16.
- Encina, J. A., Sevillano, J. M., Acebes, L., Alvarez, J. (2002). Cell wall modifications of bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil. *Physiol. plantarum* 114: 182-191.

- FAO (2016). Datos sobre Alimentación y Agricultura. Recuperado el 14 de junio de 2018 de <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Fornalé, S., Rencoret, J., García-Calvo, L., Capellades, M., Encina, A., Santiago, R., Rigau, J., *et al.* (2015). Cell wall modifications triggered by the down-regulation of Coumarate 3-hydroxylase-1 in maize. *Plant Sci.* 236: 272-282.
- Funnell, D. L., *et Pedersen*, J. F. (2006). Reaction of sorghum lines genetically modified for reduced lignin content to infection by *Fusarium* and *Alternaria* spp. *Plant Dis.* 90: 331-338.
- Hasanudin, K., Hashim, P., Mustafa, S. (2012). Corn silk (stigma maydis) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review. *Molecules* 17: 9697-9715.
- IARC (2002). Fumonisin B1. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. In: IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, pp. 301-306.
- Ji, H. C. *et Yamakawa*, T. (2011). Cell wall contents and estimation of genetic parameters for polysora rust resistance in tropical maize (*Zea mays* L.). *J. Fac. Agri. Kyushu U.* 56 (2): 231-236.
- Laitinen, R., Ainasoja, M., Broholm, S. K., Teeri, T. H., Elomaa, P. (2008). Identification of target genes for a MYB-type anthocyanin regulator in *Gerbera hybrida*. *J. Exp. Bot.* 59: 3691-3703.
- Li, B., Cui, Z. K., Zhao, Y. C. (2008). Study on the preparation and composition of polysaccharide in corn silk. *Academic Periodical of Farm Products Processing* 136: 34-36.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chem.* 126: 261-269.
- MAPAMA (en línea). Plataforma de conocimiento para el medio rural y pesquero. Material vegetal: Maíz dulce. Recuperado el 14 de junio de 2018 de <http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2201>
- MAPAMA (2017). Avance del Anuario del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (años 2016 y 2017). Recuperado el 14 de junio de 2018 de <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/>
- Matsuoka, Y. (2005). Origin matters: Lessons from the search for the wild ancestor of maize. *Breed. Sci.* 55: 383-390.
- McKeehen, J. D., Busch, R. H., Fulcher, R. G. (1999). Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1476-1482.
- Mélida, H., García-Angulo, P., Alonso-Simón, A., Encina, A., Alvarez, J., Acebes, J. L. (2009). Novel type II cell wall architecture in dichlobenil-habituated maize calluses. *Planta* 229: 617-631.
- Mendoza-López, M. L., Alvarado-Díaz, C. S., Pérez-Vega, S. B., Leal-Ramos, M. Y., Gutiérrez-Méndez, N. (2018). Compositional and free radical scavenging properties of *Zea mays* female inflorescences (maize silks) from Mexican maize landraces. *CyTA J. Food.* 16 (1): 96-104.
- Mideros, S. X., Windham, G. L., Williams, W. P., Nelson, R. J. (2012). Tissue-specific components of resistance to *Aspergillus* ear rot of maize. *Phytopathology* 102 (8): 787-793.
- Miller, S. S., Reid, L. M., Butler, G., Winter, S. P., McGoldrick, N. J. (2003). Long chain alkanes in silk extracts of maize genotypes with varying resistance to *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6702-6708.
- Miller, S. S., Reid L. M., Harris, L. J. (2007). Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. *Can. J. Bot.* 85 (4): 369-376.
- Moghaddam, B. *et Ende*, W. V. (2012). Sugars and plant innate immunity. *J. Exp. Bot.* 63 (11): 3989-3998.
- Nirenberg, H. I., *et O'Donnell*, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 434-458.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., Richard-Forget, F. (2010). Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol.* 36 (2): 221-231.

- Reid, L. M., Bolton, A. T., Hamilton, R. I., Woldemariam, T., Mather, D. E. (1992). Effect of silk age on resistance of maize to *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 14 (4): 293-298.
- Reid, L. M., Hamilton, R. I., Mather, D. E. (1996). Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Technical Bulletin. Publication 1996-5E.
- Reid, L. M., McDiarmid, G., Parker, A. J., Woldemariam, T. (2003). CO441 corn inbred line. *Can. J. Plant Sci.* 83: 79-80.
- Reid, L. M., Zhu, X., Parker, A., Yan, W. (2009). *Fusarium verticillioides* in maize inbred lines bred for *Fusarium graminearum* resistance. *Euphytica* 165: 567.
- Ride, J. P. (1980). The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 187-192.
- Seaman, J. F., Moore, W. E., Millett, M. A. (1963). Sugar Units Present. In: Cellulose, W.R.L., (Ed.). Hydrolysis and quantitative paper chromatography. New York: Academic Press, pp. 54-69.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Osei-Nimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007). Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? *Food Microbiol.* 24: 465-473.
- Sampietro, D. A., Fauguel, C. M., Vattuone, M. A., Presello, D. A., Catalán, C. A. N. (2013). Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Eur. J. Plant Pathol.* 135 (1): 105-113.
- Santiago, R., Butron, A., Arnason, J. T., Reid, L. M., Souto, X. C., Malvar, R. A. (2006). Putative role of pith cell wall phenylpropanoids in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2274-2279.
- Santiago, R., Reid, L. M., Arnason, J. T., Zhu, X. Y., Martinez, A., Malvar, R. A. (2007). Phenolics in maize genotypes differing in susceptibility to gibberella stalk rot (*Fusarium graminearum* Schwabe). *J. Agric. Food Chem.* 55: 5186-5193.
- Santiago, R., et Malvar, R. (2010). Role of dehydrodiferulates in maize resistance to pests and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 691-703.
- Santiago, R., Barros-Ríos, J., Malvar, A. R. (2013). Impact of cell wall composition on maize resistance to pest and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 6960-6980.
- Santiago, R., Malvar, R. A., Barros-Ríos, J., Samayoa, L. F., Butrón, A. (2016). Hydroxycinnamate synthesis and association with Mediterranean corn borer resistance. *J. Agric. Food Chem.* 64: 539-551.
- SAS (2007). SAS/STAT user guide, versión 6. North Carolina, EEUU: SAS Institute Inc.
- Sekhom, R. S., Kuldau, G., Mansfield, M., Chopra, S. (2006). Characterization of *Fusarium*-induced expression of flavonoids and PR genes in maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69: 109-117.
- Singleton, V. L. et Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- Siranidou, E., Kang, Z., Buchenauer, H. (2002). Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defencer responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. *J. Phytopathology* 150: 200-208.
- Tabuchi, A., Li, L. C., Cosgrove, D. J. (2011). Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant J.* 68 (3): 546-559.
- Updegraff, D. M. (1969). Semi-micro determination of cellulose in biological materials, *Anal. Biochem.* 32: 420-424.
- Wang, X. Wu, F., Han, X. (2007). Effects of sugars on germination and mycelium growth of *Fusarium Oxysporum*. *Allelopathy J.* 20 (2): 339-346
- Wang, L., Liu, X. F., Qiu, E. P., Cai, J. X., Xie, R. L. (2009). Extraction of corn silk polysaccharides by microwave-assisted technology. *J. Food Sci. Biotechnol.* 28: 72-75.
- Yang, Q., He, Y., Kabahuma, M., Chaya, T., Kelly, A., Borrego, E., Bian, Y., El Kasmi, F. et al. (2017). A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nat. Genet.* 49: 1364-1372.

