



**MAÍZIFICANDO
CONCIENCIA**
XII CONGRESO NACIONAL DE MAÍZ

Eje

Protección del cultivo

8, 9 y 10 de Noviembre
Pergamino, BA
UNNOBA



Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Ministerio de Economía
Argentina

20
22





EFECTOS DE PRIMING SOBRE LA MODULACIÓN HORMONAL ASOCIADA A LA INFECCIÓN DEL MAÍZ POR FUSARIUM VERTICILLIOIDES

Velez P A (1,2); Mary V S (1,2); Theumer M G (1,2).

(1) Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBIC). Haya de la Torre y Medina Allende, sin número, Ciudad Universitaria, Córdoba Capital, Córdoba, Argentina.

(2) Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica Clínica. Haya de la Torre y Medina Allende, sin número, Ciudad Universitaria, Córdoba Capital, Córdoba, Argentina.

pilar.velez@unc.edu.ar

EFFECTS OF PRIMING IN THE HORMONAL MODULATION ASSOCIATED WITH FUSARIUM VERTICILLIOIDES INFECTION OF MAIZE

Abstract

Fusarium verticillioides is one of the most common pathogens associated with corn. Currently, the induction of systemic acquired resistance (RSA) could be a strategy to minimize losses caused to infections in cultures. Salicylic acid (SA) induces RSA by a process called sensitization or "priming". In this work, the responses of maize plants in which RSA was induced against experimental infections with *F. verticillioides* were studied, and the modulatory effects of maize priming with AS were analyzed on the biochemical defense pathways mediated by SA and jasmonic acid (JA). The maize hybrids P3115 (HS) and P1780Y (HR) are considered susceptible and resistant to infection by *F. verticillioides*. Seed sensitization (overnight incubation) with 1 μ M AS solution was performed for both hybrids. Subsequently the seeds were transferred to pots, infected and harvested at 5, 7, 17 and 46 days post sowing (dps). Phytohormone levels were determined in both hybrids, in aerial part and root. The results suggest that the hormonal responses to priming and infection are differential in HS and HR. On the other hand, the priming effect would be more effective in the HR.

Palabras claves

Fitohormonas. Resistencia sistémica. Ácido salicílico

Keywords

Phytohormones. Systemic acquired resistance. Salicylic acid



Introducción

Una gran cantidad de hongos pueden atacar e invadir mazorcas y granos de maíz en desarrollo, causando numerosas enfermedades clasificadas como pudriciones de la mazorca. Muchos producen micotoxinas, que pueden afectar la calidad y comerciabilidad de los granos. Uno de los patógenos de mayor relevancia es *F. verticillioides*, debido a las numerosas pérdidas económicas que puede ocasionar y la capacidad que posee este microorganismo para genera micotoxinas.

El maíz, al igual que el resto de las plantas, interactúa constantemente con patógenos (virus, bacterias, hongos) y plagas (insectos herbívoros, nemátodos) por lo que ha desarrollado mecanismos que le permiten defenderse de éstos mediante un complejo sistema que incluye múltiples niveles de protección. Esta protección puede ser física o química y constitutiva o inducida.

La resistencia inducida está relacionada con el aumento en la expresión de los genes relacionados con la defensa. Este proceso está regulado por moléculas de señalización como el Etileno (ET), el ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico (AJ). Generalmente, el AS es requerido para la resistencia a patógenos biotrofos y hemibiotrofos, mientras que el AJ y el ET median la resistencia a patógenos necrotróficos y a la mayoría de insectos herbívoros. La mayor parte de dicha comunicación consiste en represión mutua entre el AS y el AJ; sin embargo, algunos genes pueden ser inducidos similarmente por los dos ácidos.

La resistencia puede ser estimulada o inducida por un proceso denominado sensibilización o priming, que induce una respuesta inmune adaptativa y conduce a una defensa más rápida y más fuerte ante la infección por herbívoros o patógenos. Se han identificado muchos compuestos naturales y sintéticos para estimular la resistencia de las plantas, incluidas las fitohormonas AS, AJ y ácido abscísico (ABA) (Aranega-Bou y col, 2014)

El proceso de priming tiene lugar desde la estimulación inicial hasta la exposición a un estrés desafiante. Incluye todos los cambios que ocurren en la planta después de la percepción de un estímulo y prepara a la planta para una mayor capacidad de respuesta cuando ocurre un desafío. Estos cambios pueden tener lugar a nivel fisiológico, molecular y epigenético; pueden ocurrir segundos u horas después de la estimulación, pueden ser transitorios o mantenerse a lo largo de la vida de una planta, e incluso pueden ser heredados por generaciones posteriores. Diferentes estímulos pueden causar cambios similares, así como específicos.

El proceso de sensibilización en plantas permite no solamente comprender de mejor manera los mecanismos de defensa en plantas, sino también inferir sobre potenciales moléculas que podrían funcionar como compuestos exógenos que puedan aplicarse para combatir enfermedades y que resulten amigables con el medioambiente.

La prohibición de la mayoría de los fungicidas químicos por parte de la UE (Directiva 91/414/CEE) debido a los efectos adversos de su uso en el medio ambiente y la salud humana, su toxicidad, o porque los patógenos se han vuelto resistentes a sus sustancias activas, ha promovido la investigación en el campo de los inductores de resistencia vegetal como alternativa eficaz y sostenible.



Materiales y métodos

Se acondicionaron las semillas de los híbridos P3115 y P1780H (DuPont Pioneer), caracterizados como híbrido susceptible (HS) y resistente (HR) a la infección por *F. verticillioides*, respectivamente. Posteriormente se realizó el priming de semilla con una solución de AS 1 (μM). Para esto las semillas se dejaron overnight en la solución de AS o en agua para los controles. Luego de una pre-germinación en placa, las semillas fueron pasadas a macetas de 24 cm de diámetro, y fueron sembradas en tierra a 2-3 cm de profundidad. Posteriormente se realizó una infección en hoja con una suspensión de conidias de la cepa de *F. verticillioides* 2024 de turbidez 0,1 DO determinada en espectrofotómetro a 600 nm. Las plantas se cosecharon a los 5, 7, 17 y 46 días post siembra (dps). Las macetas se colocaron en el invernadero del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC), y se mantuvieron bajo condiciones controladas tanto hídricas como de temperatura y ciclos de luz/oscuridad de 14/10 horas durante todo el período experimental.

Se cuantificaron los niveles de AS, AJ, en la porción aérea y las raíces de las plantas. La extracción se realizó pesando 50-100 mg de tejido previamente pulverizado con N_2 líquido, posteriormente se homogeneizó con 500 μL de 1-propanol/ H_2O / HCl (2:1:0,002; v/v/v) y se agitó durante 30 minutos a 4 °C. Luego se aplicó 1 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), se agitó por 30 min a 4 °C y se centrifugó a 13.000 g por 5 min. La fase orgánica se evaporó y el extracto se re suspendió con 0,25 mL de metanol al 50 % con CH_2O_2 al 0,1 % y agua al 50 % con CH_2O_2 al 0,1 %. Para la detección se utilizó el equipo UPLC-MS Waters Xevo TQs Micro (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y una columna de fase reversa (C18 Waters BEH 1,7 μm , 2,1 x 50 mm, Waters). Se utilizó como sistema solvente móvil compuesto por agua con 0,1% CH_2O_2 (A) y MeOH con 0,1% CH_2O_2 (B). Para fines de identificación y cuantificación se utilizó un espectrómetro de masas Xevo TQ-S micro de Waters (Milford, MA, USA) acoplado al mencionado UPLC (LC-MS/MS). La relación masa/carga (m/z) para cada metabolito fue: AS: 137,0>93,0 y 137,0>65,0; AJ 209,1>165.1 y 209.1>59. La cuantificación de las hormonas se realizó siguiendo las curvas de calibración con el ajuste lineal, obteniendo los resultados en nanogramo de fitohormona/miligramo de tejido (peso fresco).

Resultados

Las consecuencias de la sensibilización y de la infección fúngica sobre las cinéticas de producción de las fitohormonas fueron diferentes en los dos híbridos de maíz analizados.

En el HR el priming incrementó los niveles AS en las raíces de las plántulas a los 5 dps, pero en las partes aéreas no hubo diferencias con respecto al control. Los efectos de la infección fueron más evidentes en las partes aéreas, donde se produjo un aumento transitorio de AS, disminuyendo a los 46 dps en forma significativa con respecto al control. Sin embargo, este cambio producido por la infección fue prevenido por el priming. En el HS la sensibilización aumentó los niveles de AS a los 5 dps tanto en partes aéreas como raíces, y fueron disminuyendo hasta niveles comparables a los controles a partir de los 17 dps (Figura 1).

Las concentraciones de AS en las partes aéreas y raíces de las plantas infectadas (I y ASI) fueron similares a las de sus respectivos controles (C y AS, respectivamente), y desde los 17 dps en adelante no hubo diferencias entre los grupos.

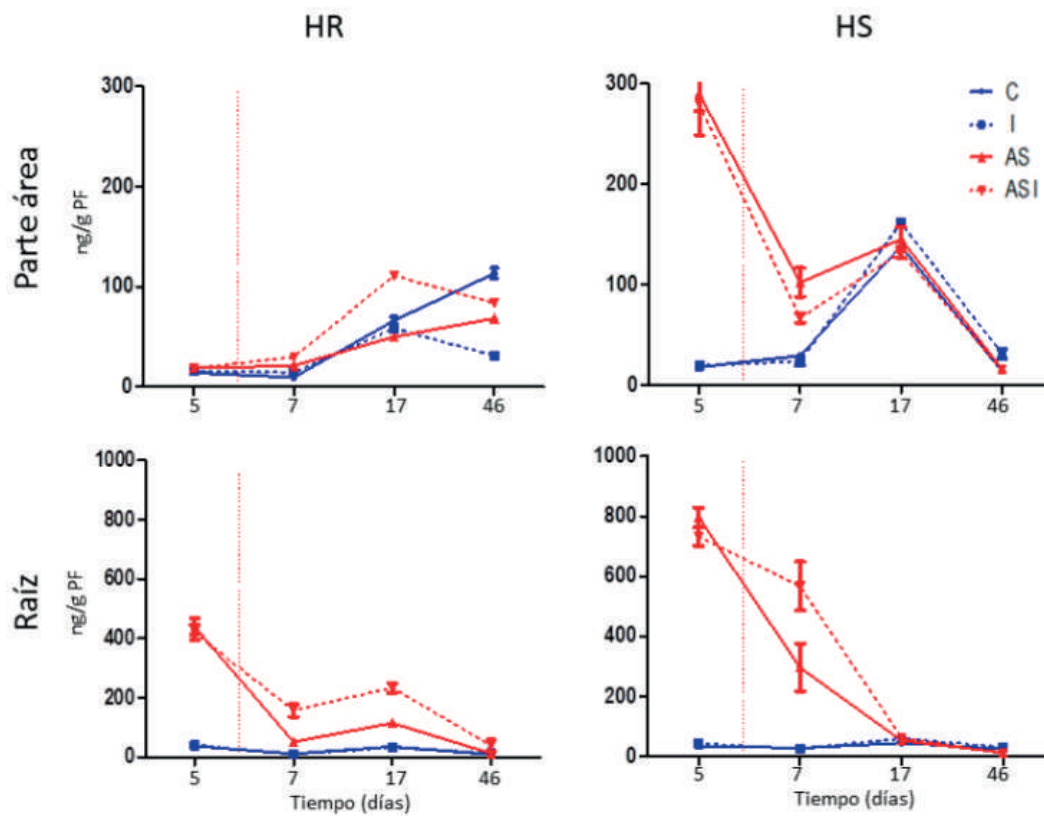


Figura 1: Efectos del priming sobre los desbalances de AS causadas por la infección del maíz con *F. verticillioides*.

Se muestran los Promedios \pm SEM de las concentraciones de AS en partes aéreas y raíces de las plántulas de ambos híbridos (HR y HS), en los grupos control, infectado con el hongo (I), sensibilizado (AS), y sensibilizado e infectado (AS I), a los 5, 7, 17 y 46 dps. Las líneas de puntos verticales marcan el día (6 dps) en el que se realizaron las infecciones (grupos I y AS I). (n=6)

En términos generales los efectos del priming sobre la producción de AJ en el HR fueron opuestos en las partes aéreas y raíces, disminuyéndola e incrementándola, respectivamente. La infección redujo los niveles de AJ en la parte aérea, pero a los 46 dps las concentraciones en las plantas sensibilizadas e infectadas se aproximaron a las del grupo control. Si bien las consecuencias de la infección fueron menos marcadas en las raíces, en las plantas sensibilizadas e infectadas los niveles de AJ aumentaron con el paso del tiempo, y a los 46 dps superaron a los encontrados en los controles (Figura 2).

En el HS, tanto el priming como la infección tuvieron pocos efectos sobre la cinética de producción de AJ en partes aéreas en todo el período estudiado, y en raíces hasta los 17 dps. Pero a los 46 dps, la infección de plantas sensibilizadas aumentó el AJ a concentraciones superiores a las de los controles.

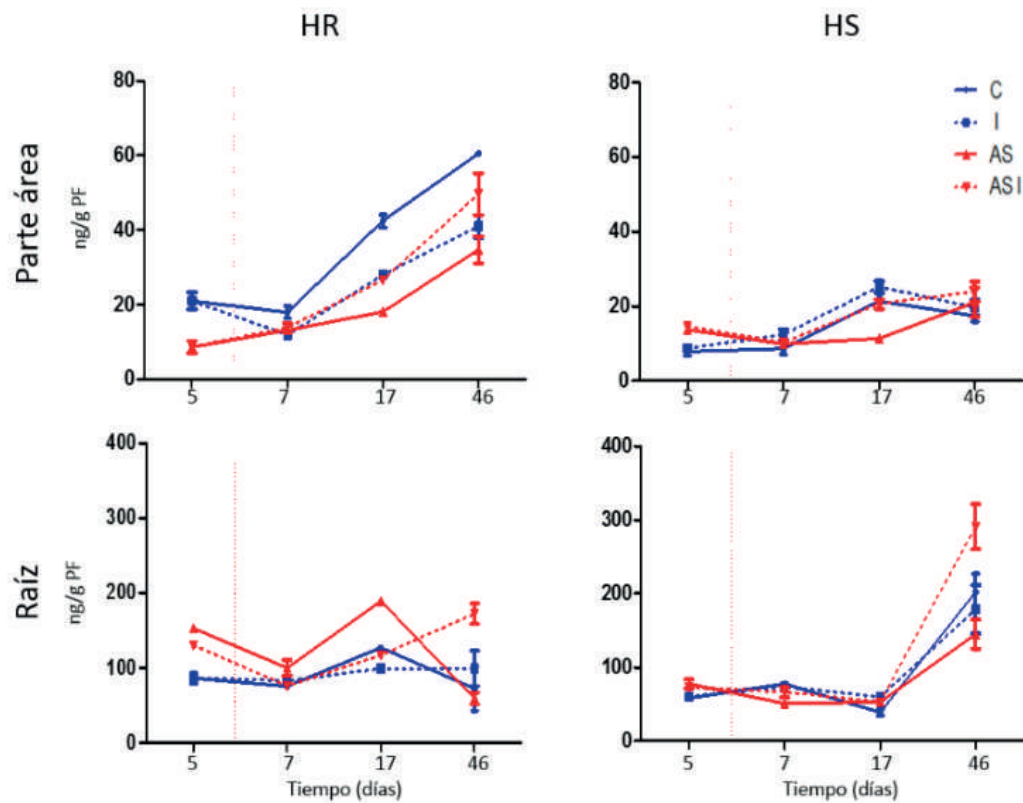


Figura 2: Efectos del priming sobre los desbalances de AJ causadas por la infección del maíz con *F. verticillioides*. Se muestran los Promedios \pm SEM de las concentraciones de AJ en partes aéreas y raíces de las plántulas de ambos híbridos (HR y HS), en los grupos control, infectado con el hongo (I), sensibilizado (AS), y sensibilizado e infectado (AS I), a los 5, 7, 17 y 46 dps. Las líneas de puntos verticales marcan el día (6 dps) en el que se realizaron las infecciones (grupos I y AS I). (n=6)

Conclusión

- El tratamiento con AS causó alteraciones de fitohormonas con respecto a las plantas control.
- Las respuestas hormonales frente al priming y a la infección son diferenciales en el HS y en el HR.
- En el HR, el efecto de priming resultaría más efectivo que en el HS.

Apoyo financiero

Este estudio fue financiado por SECyT-UNC (33620180101257CB y 34020190100081CB); ANPCyT (PICT-2020-SERIEA-03880, PICT-2021-CAT-I-00192, y PICT 2019-04329); y MINCyT-Cba (GRFT 2019). PAV es becaria de CONICET. VSM y MGT son investigadores de carrera (CIC-CONICET).



Referencias bibliográficas

- Arias SL, Mary VS, Otaiza SN, Wunderlin DA, Rubinstein HR, and Theumer MG. 2016. Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B1-watered maize seedlings. *Phytochemistry* 125: 54-64.
- Arias SL, Theumer MG, Mary VS, and Rubinstein HR. 2012. Fumonisin: probable role as effectors in the complex interaction of susceptible and resistant maize hybrids and *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food. Chem.* 60: 5667-5675
- Berens ML, Berry HM, Mine A, Argueso CT, Tsuda K. 2017. Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu Rev Phytopathol.* 55:401-425.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, and Gomez-Cadenas A. 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 8437-8442.
- Lanubile A, Pasini L, and Marocco A. 2010. Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *J. Plant Physiol.* 167: 1398-1406.
- Otaiza González SN. 2017. Bases bioquímicas de la muerte celular inducida por fumonisina B1 en plantas. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.
- Pan X, Welti R, and Wang X. 2008. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69: 1773-1781.
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, and Jones JD. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49, 317-343.
- Vargas WA, Martin JM, Rech GE, Rivera LP, Benito EP, Diaz-Minguez JM, Thon MR, and Sukno SA. 2012. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotricum graminicola* in maize. *Plant Physiol* 158: 1342-1358.