

**EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA RESISTENCIA A *FUSARIUM SPP.* EN  
MAÍZ (*Zea mays* L).**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino,.....

**EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA RESISTENCIA A *FUSARIUM SPP.* EN  
MAÍZ (*Zea mays L.*)**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**PAULINA TROIA**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador**

(Nombre y Apellido)  
**Co-Director**

(Nombre y Apellido)  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director Daniel Presello y co-director Antonio Díaz Paleo, por haber compartido sus conocimientos conmigo, su paciencia, su buena predisposición ante cualquier duda que se presentara y sus buenos tratos siempre.

A las chicas del Laboratorio de Biotecnología de INTA, Vivi, Dani y Agos. Por su calidez al recibirme y por haberme brindado su ayuda en todo momento, siempre con una sonrisa.

A mis profesores de la Universidad, de quienes aprendí mucho. Sobre todo a aquellos que con las anécdotas de su día a día laboral, incitaron a que siguiera la carrera hasta el final sin bajar los brazos.

A mis amigos y mis compañeros, por hacer que todo sea más ameno y haber transitado conmigo esta hermosa carrera.

A mi maravillosa familia. Mis padres, Fernando y Mónica. Mi hermano Tomás, mi cuñada y su amoroso hijo, mi ahijado Lorenzo. Mi novio, Guido. Por haber creído en mí siempre, por ayudarme a cumplir mis sueños, por no haberme dejado sola en ningún momento, por compartir tanto las alegrías como los momentos no tan felices durante toda esta etapa, por alentarme... y simplemente por ser mi FAMILIA.

¡GRACIAS!

## ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	i
<b>Resumen</b> .....	ii
<b>Palabras clave</b> .....	iii
<b>Introducción</b> .....	1
- Maíz.....	1
- Enfermedades.....	3
- Mecanismos de resistencia a podredumbres de espiga.....	7
- Genes <i>PAL</i> .....	8
- PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	10
<b>Hipótesis</b> .....	12
<b>Objetivos</b> .....	12
- Objetivo general.....	12
- Objetivos específicos.....	12
<b>Materiales y métodos</b> .....	13
- Material vegetal.....	13
- Expresión génica.....	13
<i>Diseño experimental</i> .....	13
<i>Muestreo</i> .....	14
<i>Extracción de RNA</i> .....	15
<i>Transcripción reversa</i> .....	15
<i>Real Time-qPCR</i> .....	16
- Análisis de datos.....	16
<b>Resultados</b> .....	18
<b>Discusión</b> .....	22
<b>Bibliografía</b> .....	25
<b>Anexos</b> .....	31

## RESUMEN

*Fusarium verticillioides* es un fitopatógeno que causa podredumbre de espiga en maíz y produce micotoxinas que contaminan el grano. Investigaciones locales identificaron un QTL (*quantitative trait loci* «loci de carácter cuantitativo») en el cromosoma 2 de maíz, en la población de mapeo LP4637 x L4674 relacionados con la resistencia a *Fusarium*, que mapea de forma superpuesta con otros relacionados con el espesor de pericarpio y concentración de ácido t-ferúlico. En dicha región se encuentran los genes *pal2* y *pal6* codificadores de la enzima *fenilalanina amonio liasa* (PAL) que es la primera en actuar en el metabolismo de los fenilpropanoides como respuesta a la infección por patógenos y participa en la síntesis del ácido t-ferúlico, precursor de lignina y flavonoides, entre otros. Además, estudios previos revelaron un mayor nivel de expresión de *pal2* en la línea moderadamente resistente LP4637, en comparación al de la línea susceptible L4674, 24 horas posteriores a la inoculación con el patógeno en estigmas.

En el presente trabajo se propuso evaluar cómo la expresión de los genes *PAL* es afectada por el genotipo y la ontogenia, por lo cual se estudiaron ambas líneas parentales y el genotipo SPF051. Se realizó la cuantificación de los transcritos en tejidos de estigmas y granos, luego de haber simulado diferentes condiciones de infección, mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La expresión génica en L4674 fue relativamente baja en todos los tratamientos, lo que es consistente con estudios previos que revelan la alta susceptibilidad de este material. En el caso de LP4637, se observó una mayor expresión 72 horas luego de la inoculación con agua, que se podría asociar con tolerancia al estrés debido al daño mecánico. Sin embargo, no se observó la misma respuesta luego de la inoculación con el hongo. En SPF051, la expresión en estigmas inoculados tanto con el hongo como con agua, 48 horas después, fue elevada, resultando significativa la debida al efecto del patógeno. En los granos en desarrollo, no se observaron diferencias de expresión en ninguno de los tratamientos.

Estos resultados indican que la enzima PAL podría estar contribuyendo a la resistencia a *F. verticillioides* en tejidos de estigmas de SPF051 como una respuesta tanto al estrés, causado por la inoculación, como por la reacción al patógeno. Mientras que en LP4637 y L4674 no se observaron diferencias de expresión en las condiciones ambientales y tiempos de muestreo planteados.

**PALABRAS CLAVE:** *Fusarium*- maíz- podredumbre de espiga- fenilalanina amonio liasa (PAL)- Real Time qPCR.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Maíz**

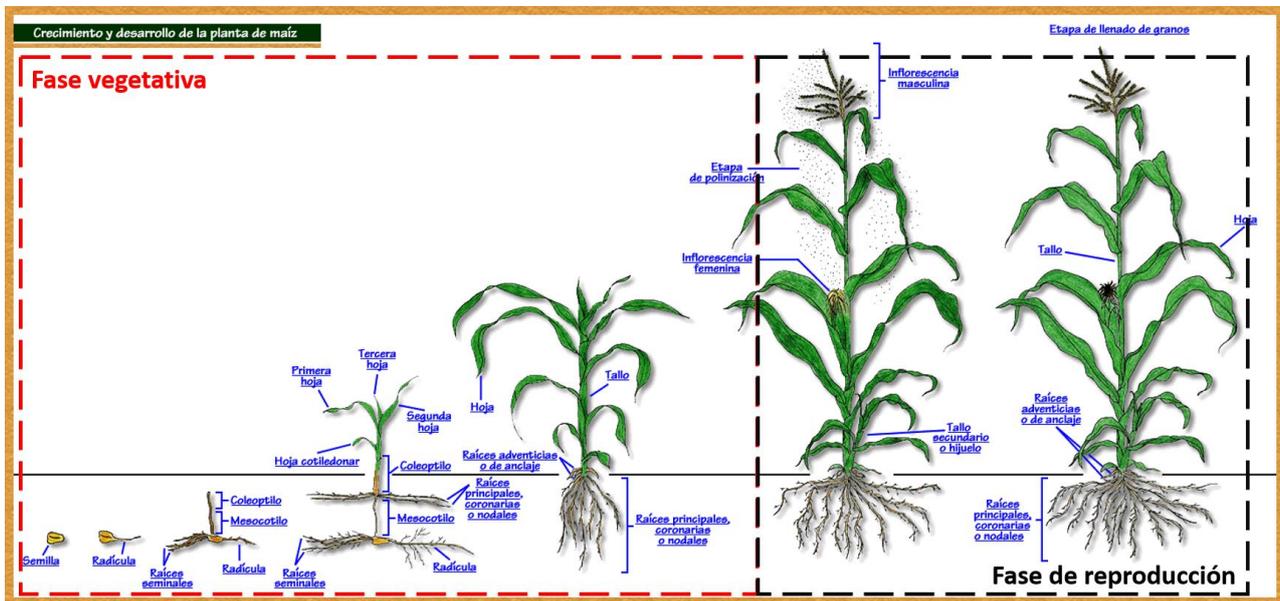
El maíz (*Zea mays* L.) es una gramínea anual que forma parte de la familia de las *Poáceas*. En cuanto a su origen, se conoce que ocurrió en México y que fue introducido en Europa durante el siglo XVI, primeramente, en los lugares de clima cálido y luego en la región septentrional (Paliwal *et al.*, 2001). Actualmente es uno de los cereales de mayor producción en el mundo junto con el trigo (*Triticum aestivum*) y el arroz (*Oryza sativa*), y el principal grano forrajero de la Argentina. Su uso está destinado principalmente a la nutrición de los animales domésticos y los seres humanos (FAO, 2006). Sus granos, tallos, hojas y flores también son una materia prima indispensable en la fabricación de productos farmacéuticos, aceites, almidón, edulcorantes, antibióticos, bebidas y papel, entre otros.

Se trata de una especie diploide con diez pares de cromosomas ( $2n = 20$ ). A nivel morfológico, presenta un tallo alto y recto que alcanza alrededor de los 2- 2,5 metros de altura. Posee varios entrenudos largos donde se insertan sus hojas. Es una planta diclino monoica con dos inflorescencias bien distinguibles: las masculinas terminales compuestas por un eje central y ramas laterales donde se forman las espiguillas que contienen los estambres, sitio de formación del polen; y las femeninas (mazorcas) ubicadas en las yemas axilares de las hojas (Valla, 1979). En la mazorca la cantidad de grano producido está determinado por el número de granos por hilera y de hileras por mazorca. Debido a la disposición de los órganos donde se generan las gametas masculinas y femeninas, la forma de reproducción en el maíz se da a través de fecundación cruzada (especie alógama) dependiendo mayoritariamente del movimiento del polen ocasionado por el viento.

El desarrollo de la planta se divide en dos fases fisiológicas (Tanaka *et al.*, 1972):

- *fase vegetativa*: donde se desarrollan y diferencian los distintos tejidos hasta la aparición de las estructuras florales. Esta fase incluye la formación de las primeras hojas (desarrollo ascendente) y de los órganos reproductores.

- *fase de reproducción*: se da la fertilización de las estructuras femeninas, las cuales se diferenciarán posteriormente en espigas y granos. (Fig. 1)



**Figura 1:** Crecimiento y desarrollo de la planta de maíz. *Fuente:* [http://www7.uc.cl/sw\\_educ/cultivos/cereales/maiz.htm](http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/maiz.htm)

El maíz se cultiva en zonas templadas, subtropicales y tropicales en las cuales ocurren condiciones de lluvias suficientes para reducir a niveles adecuados los riesgos de pérdidas de cosecha. Actualmente, su siembra está difundida a lo largo de todo el mundo (FAO, 2006). Es un cultivo que se siembra en ambos hemisferios dependiendo del período de precipitaciones y heladas. En el hemisferio sur la época de siembra es desde septiembre hasta enero y se cosecha entre marzo y agosto. En cambio, en el hemisferio norte, se siembra entre abril y mayo, y se cosecha entre septiembre y octubre. En Argentina, la producción está concentrada principalmente en lo que se conoce como “zona núcleo”, formada por las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. Las condiciones climáticas en la región maicera templada argentina favorecen el ataque de granos y espiga por especies fúngicas, la mayoría de ellas productoras potenciales de micotoxinas (Sancho *et al.*, 2018).

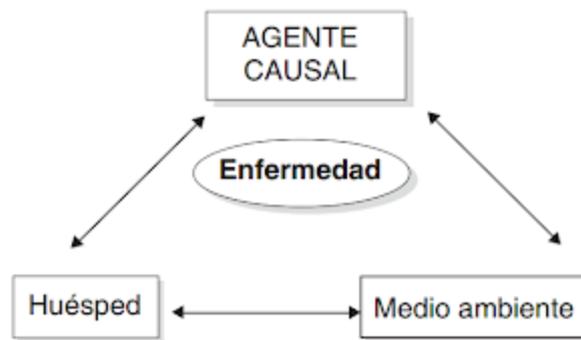
El rendimiento del cultivo de maíz ha crecido de manera sostenida en el tiempo debido al progreso genético y a la mejora de las técnicas de cultivo, caracteres que fueron desarrollados en base en numerosos estudios genéticos y de biología del desarrollo. A su

vez, ha resultado de gran utilidad como sistema modelo para investigaciones que han permitido comprender diversos fenómenos, incluidos la heterosis, la transposición, y la diversidad alélica (Bennetzen y Hake, 2009). Se han logrado importantes mejoras a nivel genético (enfermedades, vuelco, tolerancia a estrés) en conjunto con buenas prácticas de manejo (herbicidas, fertilización, mecanización, épocas de siembra, labranzas, etc.). No obstante, los rendimientos medios alcanzados en la actualidad distan de los rendimientos máximos potenciales de acuerdo a las condiciones agroclimáticas (Cassman *et al.*, 2003).

## **Enfermedades**

Las enfermedades en los cultivos son diversas y el surgimiento de estas suele venir acompañado de condiciones ambientales que favorecen su ocurrencia. Todas las partes de la planta pueden contraer numerosas enfermedades que reducen las cosechas en cantidad y calidad (White, 1999). Estas enfermedades se pueden clasificar en parasitarias (infecciosas) o no parasitarias (no infecciosas). Las primeras se deben a hongos, bacterias, virus, micoplasmas, nematodos y plantas parásitas. Las no parasitarias resultan de condiciones de crecimiento desfavorables.

La magnitud y gravedad de las enfermedades parasitarias del maíz dependen de la presencia de un patógeno virulento, de la susceptibilidad del huésped (maíz) y de condiciones ambientales predisponentes (White, 1999). Estos factores deben estar presentes y “en equilibrio” para que se pueda desarrollar la enfermedad (Fig. 2). Algunas enfermedades, de tipo bacteriano, viral o micoplásmico, también requieren la presencia de insectos u otros vectores para su propagación.



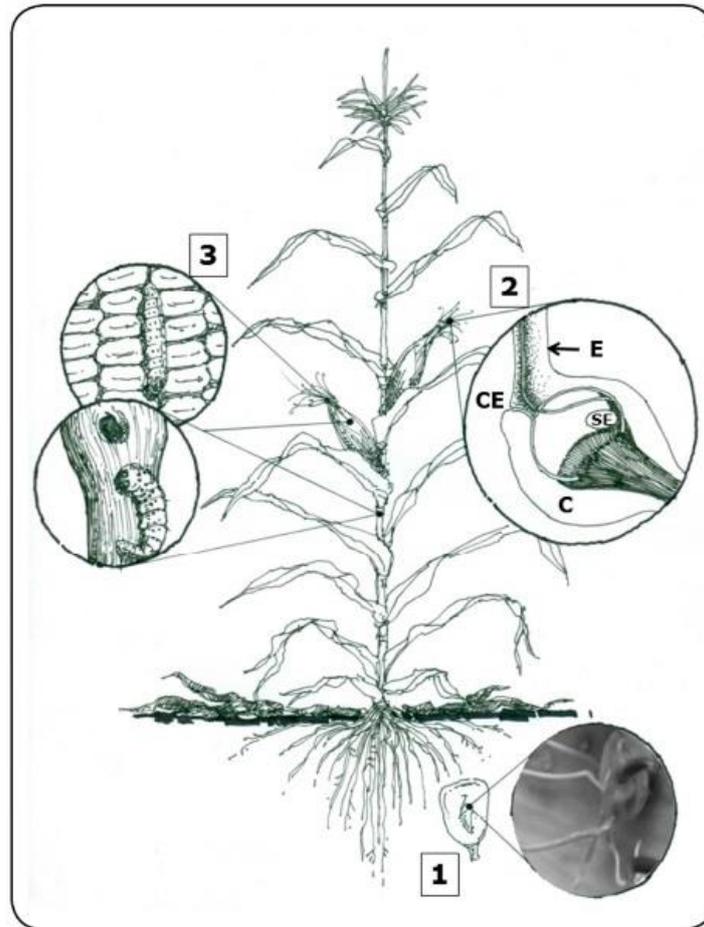
**Figura 2:** Tríada ecológica de la enfermedad. Fuente: <https://www.lifeder.com/triada-ecologica/>

El manejo de las enfermedades del maíz se centra en alterar la combinación de los factores necesarios para el desarrollo de las mismas. Esto se basa en el conocimiento de los patógenos, sus ciclos de enfermedad, partes vegetales involucradas, diseminación o propagación de los organismos causales, etc. En general, para el manejo de la mayoría de las enfermedades se requiere la aplicación de diversas medidas, incluyendo el uso integral de los factores ambientales, genéticos y químicos (White, 1999). Los cultivares suelen presentar distintos grados de reacción a las enfermedades, debido a que poseen genes de resistencia o tolerancia y el uso de materiales menos susceptibles constituye una de las prácticas más efectivas para reducir los efectos adversos de estos factores bióticos (Agrios, 2005).

Entre las enfermedades más importantes del maíz se encuentran las producidas por los hongos, que son organismos simples, filamentosos y sin clorofila. Es característico que perduren luego de la época de cultivo sobre hospedantes alternativos o sobre restos de materia vegetal, se reproduzcan y diseminen mediante esporas que germinan bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, produciendo filamentos ramificados denominados hifas. Un agregado de hifas conforma el cuerpo del hongo o micelio (White, 1999). Las especies fúngicas del género *Fusarium* causan importantes enfermedades en plántulas, raíz, tallo y espiga de maíz. *Fusarium verticillioides* es ampliamente distribuido en la naturaleza afectando a la planta en todas las etapas del desarrollo (Nirenberg y O'Donnell, 1998). Tiene capacidad de crecer como necrótrofo luego de causar la muerte del tejido hospedador y sobrevivir como saprófito en el rastrojo. A su vez, durante los

períodos tempranos de infección puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo sin causar daños visibles. Entre las enfermedades producidas por este patógeno, la podredumbre de espiga es una de las de mayor relevancia tanto por su prevalencia en la región maicera templada como por sus efectos sobre el rendimiento (Presello *et al.*, 2008) y la calidad del grano.

Los síntomas y signos de la podredumbre de espiga causada por *F. verticillioides* incluyen la presencia de estrías blancas sobre el grano, producto del crecimiento de las hifas por debajo del pericarpio, y el desarrollo de una masa algodonosa blanca distinguible a simple vista (CIMMYT, 2004). Entre los factores predisponentes, se pueden mencionar la alta humedad relativa, los insectos barrenadores, las aves, el vuelco, deficiencias nutricionales y el genotipo (Varón de Agudelo y Sarria Villa, 2006). El hongo se caracteriza por utilizar múltiples rutas de entrada a la planta (De la Torre - Hernández *et al.*, 2014) para colonizar distintos tejidos (Fig. 3). La vía más común por la cual *F. verticillioides* infecta a la espiga es a través del estigma cuando el inóculo aéreo y los conidios transportados por el agua de lluvia se depositan en él. Por otra parte, los insectos que se alimentan del maíz, principalmente Lepidópteros, y ciertas aves horadan las espigas y los tallos de la planta, realizando el daño mecánico que funciona también como vía de acceso para el hongo. Otra condición que suele relacionarse con la infección (Munkvold y Desjardins, 1997) es el vuelco de las plantas, lo cual hace que las espigas, las hojas y los tallos tomen contacto con el suelo y se vea favorecida la interacción con el patógeno. La enfermedad está presente todos los años, pero con intensidades variables, por lo que para su estudio se recurre a prácticas de inoculación, como la inyección de suspensiones conidiales en el canal de los estigmas (Reid *et al.*, 1996, Presello *et al.*, 2006), que simula las condiciones de una infección natural y ha demostrado ser efectiva para caracterizar la variabilidad para resistencia a la enfermedad en ambientes variables.



**Figura 3:** Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz (De la Torre - Hernández *et al.*, 2014).

El mayor efecto de la podredumbre de espiga se da sobre la calidad de la producción ya que causa deterioro físico y contaminación del grano con micotoxinas, que son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por el hongo. Las especies toxicogénicas más prevalentes pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*, y generalmente presentan un alto riesgo micotoxicológico a nivel de precosecha o en productos recién cosechados en el secado, así como también en alimentos almacenados (Tsitsigianni *et al.*, 2012). En otras palabras, estas sustancias pueden proliferar en todas las etapas del proceso de producción de alimento a partir de granos, y la contaminación a campo es sumamente relevante (Garrido *et al.*, 2012). La razón de la producción de micotoxinas aún no se conoce, ya que no parecen ser necesarias para el crecimiento ni para el desarrollo de los hongos (Jinyi Yang *et al.*, 2014). El género *Fusarium* incluye un gran número de especies descritas y produce tres

de las clases más importantes de micotoxinas, tricotecenos (TCT), fumonisinas (FB), zearalenonas (ZEA). *Fusarium verticillioides* produce tres tipos de fumonisinas: FB1, FB2 y FB3 (Chulze *et al.*, 1998, Shephard *et al.*, 1990). Se ha demostrado que la exposición a las mismas, aun en bajas concentraciones, generan riesgos graves e importantes para la salud animal y humana como por ejemplo, cáncer de esófago en humanos (Rheeder *et al.*, 1992, Sydenham *et al.*, 1993, Doko y Visconti 1994), edema pulmonar en cerdos (Colvin y Harrison 1992), entre otros.

Investigaciones previas (Presello *et al.*, 2007) indican una estrecha correlación entre la severidad de síntomas y la concentración de fumonisinas cuando se expone a hospedadores que tienen un rango de resistencia genética a infecciones inducidas por el patógeno, indicando que el desarrollo de resistencia a la enfermedad también tendrá efecto sobre la reducción del contenido de la toxina en grano.

### **Mecanismos de resistencia a podredumbres de espiga**

Las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos para aminorar o contrarrestar la infección por patógenos, ya que no cuentan con un sistema inmune de defensa como otros seres vivos. De manera que, la resistencia a la podredumbre de espiga se puede asociar a dos situaciones principales (Munkvold y Desjardins, 1997). La primera involucra la penetración inicial del hongo, donde la habilidad para entrar a través de los estigmas depende del estado de los mismos, ocurriendo la máxima susceptibilidad cuando ya han sido polinizados y comienzan a marchitarse. Una vez ocurrida la senescencia, los estigmas abortan en su base impidiendo las infecciones por esa vía; cuanto mayor es la velocidad de senescencia de estigmas, mayor será la probabilidad de que la planta escape a la infección por esta vía (García *et al.*, 2014). Cabe mencionar que también suelen presentarse algunas barreras físicas en los estigmas como es la formación de capas cerosas sobre ellos y/o la presencia de sustancias químicas con efectos sobre el crecimiento fúngico, incluyendo algunos compuestos fenólicos (Reid *et al.*, 1992). La segunda situación se relaciona con la resistencia a la colonización de los tejidos del grano. Entre las condiciones más frecuentes se puede nombrar el desarrollo de un pericarpio con mayor espesor en ciertas variedades resistentes en comparación con

variedades susceptibles, el tipo de endosperma, la síntesis de compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, entre otras (Giomi, 2015).

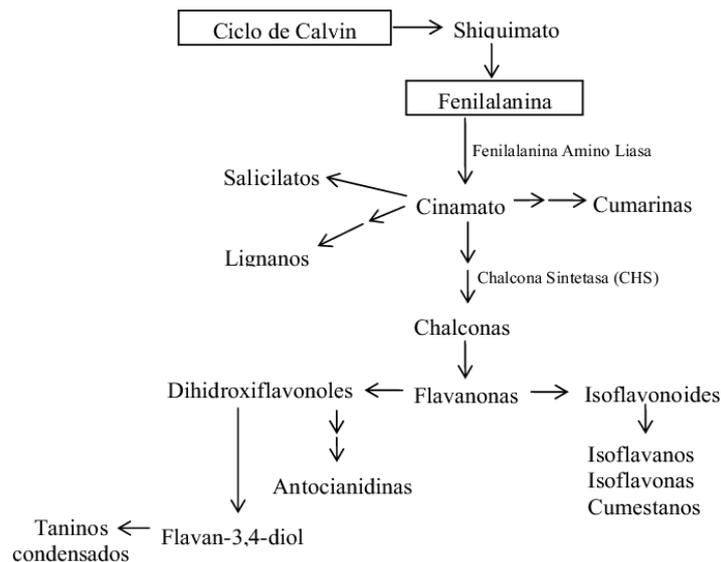
### **Genes *PAL***

La reciente secuenciación del maíz (Schnable *et al.*, 2009) ha proporcionado un marco para la identificación y caracterización funcional de genes y redes génicas, tanto para el mejoramiento de los cultivos como para la investigación básica. Investigaciones locales han reportado la identificación de QTL (*quantitative trait loci* «loci de carácter cuantitativo») en la población de mapeo LP4637 x L4674 relacionados con la resistencia a podredumbres de espiga causadas por *Fusarium* (Giomi *et al.*, 2016). Uno de los QTL de mayor relevancia en este estudio mapea en el cromosoma 2 (*bin 2.03*). Dentro de esta región cromosómica, en el intervalo comprendido entre los marcadores SSR (*simple sequence repeats*) *bnlg381* y *probebcd1086d*, se encuentran los genes *pal2* y *pal6* codificadores de la enzima *fenilalanina amonio liasa* (PAL) de este cromosoma.

Los *loci* están anotados como GRMZM2G441347 (*pal2*) y GRMZM2G118345 (*pal6*) en la base de datos MaizeGDB (*Maize Gene Data Base* <http://www.maizegdb.org/>) basado en el mapa de referencia de B73 en la versión 3. El locus GRMZM2G441347 (*pal2*) se ubica en la posición 28745557-28748871 del cromosoma 2 del genoma de maíz, con un total de 3315 pares de base (pb) y codifica 2 transcritos por *splicing* alternativo, GRMZM2G441347\_T01 (XP\_008668474) que posee 2394 pb y una proteína de 798 aminoácidos (aa) y GRMZM2G441347\_T02 (XM\_008670252) con un total de 1671 pb que codifica una proteína de 557 aa. El locus GRMZM2G118345 (*pal6*) se ubica en la posición 28677557-28680339 del cromosoma 2 de maíz y se encuentra adyacente al gen *pal2*, contiene 2783 pb y posee un solo transcrito GRMZM2G118345\_T01 (NM\_001153961) con 2145 pb, el cual codifica una proteína de 715 aa.

Específicamente el gen *pal2* se expresa significativamente durante el desarrollo del ovario (Penning *et al.*, 2009), y entre los 6 y 12 días posteriores a la polinización (Sekhon *et al.*, 2011). El crecimiento de los vegetales superiores se encuentra directamente relacionado con la composición de sus paredes celulares y PAL participa activamente en los procesos que ocurren en la pared celular. Es la primer enzima en actuar en la vía de los

fenilpropanoides (Cui *et al.*, 2014), una familia diversa de compuestos orgánicos que son sintetizados por las plantas y tienen diversas funciones biológicas, encargándose de catalizar la formación de ácido cinámico (Fig. 4) por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina (Leyva *et al.*, 2011). Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Pérez-Urria Carril y García, 2009).



**Figura 4:** Ruta de síntesis de fenilpropanoides (Leyva *et al.* 2011).

El QTL informado por Giomi *et al.*, (2016) en el cromosoma 2, mapea de manera superpuesta con un QTL relacionado con el espesor del pericarpio y con otro para concentración de ácido trans ferúlico en el mismo tejido (Giomi, 2015). Estudios previos indicaron evidencias de que hay aumento en la actividad de PAL en respuesta a los estreses bióticos y abióticos (Mac Donald y D' Cunha, 2007), en otros genotipos y condiciones experimentales. Por lo que se propuso estudiar a los genes *PAL* como candidatos de los resultados observados en la población de mapeo LP4937xL4674 y se realizaron experimentos cuyos resultados preliminares indican un mayor nivel de

expresión de *pal2* en la línea LP4637 (moderadamente resistente) en relación a la de L4674, 24 horas posteriores a la inoculación en estigmas (Nápoli *et al.*, 2017).

### **PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que fue desarrollada a mediados de los años 80 (Saiki *et al.*, 1998). A finales de la década de 1990, la PCR fue aplicada a la amplificación de cDNA y cuantificación en forma sencilla de los transcritos de RNA correspondientes, siempre en valores relativos (no absolutos) respecto a los transcritos de un gen de expresión conocida (gen de referencia).

La técnica se basa en la detección en forma acumulativa en tiempo real de la amplificación de cDNA blanco (*target*) de interés. Esta cuantificación de la amplificación se lleva adelante a través del relevamiento de la fluorescencia emitida en el transcurso de la PCR. Existen distintas versiones de qPCR según las moléculas fluorescentes involucradas. La más extendida en el uso se basa la detección de la fluorescencia del fluoroforo Sybr Green que se intercala en las moléculas de doble cadena generadas.

Para llevarla a cabo, se utilizan los componentes básicos de una PCR tradicional como ADN, *primers*, dNTPs, *buffer*, la enzima *Taq* polimerasa, MgCl<sub>2</sub> (cofactor de la enzima), agua, y el compuesto fluorescente Sybr Green.

La cuantificación relativa correcta requiere el diseño de cebadores (*primers*) con niveles similares de eficiencia de amplificación, y se basa en la determinación del número de ciclos necesarios para alcanzar el valor umbral de fluorescencia de los distintos productos de amplificación. A mayor número de ciclos de PCR para alcanzar el umbral, menor será el contenido de cDNA (transcritos de RNA). El valor umbral se establece a partir de la fluorescencia del fondo (emisión basal) de cada reacción de PCR y equivale a 10 veces la desviación estándar de la línea basal de emisión. Los equipos de medición *Real Time* calculan a través de sus programas ese valor umbral y establecen el número de ciclos requeridos para traspasarlo en cada reacción de PCR. El valor recibe el nombre de CT (*crossing threshold*), o CP (*crossing point*, en castellano *punto de cruce*). La cuantificación se reduce entonces a comparar los valores de CP de cada reacción (Pfaffl, 2001).

Para establecer una relación de expresión basada en la eficiencia de la PCR en tiempo real y la desviación del CP de una muestra desconocida versus un control se ha desarrollado una herramienta de software denominada REST<sup>®</sup> (del inglés: *Relative*

*Expression Software Tool*) que compara dos grupos con hasta 16 datos en una muestra y 16 en un grupo control (Pfaffl *et al.*, 2002).

El modelo utilizado se formula matemáticamente como:

$$ratio = \frac{E_{Blanco}^{\Delta CP_{blanco}(control-muestra)}}{E_{Referencia}^{\Delta CP_{referencia}(control-muestra)}}$$

**Ecuación 1:** Proporción de expresión relativa de un gen blanco versus el gen de referencia (Pfaffl *et al.*, 2002).

Este modelo, permite determinar la cuantificación relativa de un gen blanco en comparación a un gen de referencia. La proporción de expresión relativa ( $R= Ratio$ ) de un gen blanco, es calculada en base a los valores de  $E$  (Eficiencia de Amplificación) y la desviación de CP de una muestra desconocida versus un control, y la expresión en comparación a un gen de referencia.

- ◆  $E_{blanco}$ : es la eficiencia del transcripto correspondiente al gen blanco en la RT-PCR.
- ◆  $E_{Referencia}$ : es la eficiencia del transcripto correspondiente al gen de referencia en la RT-PCR.
- ◆  $\Delta CP_{blanco}$ : es la diferencia de CP entre los transcriptos de la secuencia blanco en los tratamientos, considerando a uno de ellos el control
- ◆  $\Delta CP_{Referencia}$ : es la diferencia de CP entre los transcriptos de la secuencia del gen de referencia en los tratamientos, considerando a uno de ellos el control.

Para el cálculo de  $R$  deben ser conocidos los valores individuales de las eficiencias de amplificación y de las desviaciones ( $\Delta CP$ ) de los transcriptos investigados. Los valores de  $E$  son calculados en función de la concentración de cDNA y de cantidad de ciclos correspondientes al umbral de detección (CP).

La eficiencia de amplificación depende de muchas variables: el tamaño del amplicón, diseño de los *primers*, concentración de los reactivos, condiciones de termociclado, calidad del templado de cDNA, calidad de la extracción y preparación de la reacción.

El modelo contempla variaciones en las eficiencias de amplificación y cambios en los niveles de expresión del gen de referencia, sin embargo, la estimación será más exacta en la medida que las eficiencias sean altas e iguales, y las variaciones en el nivel de expresión del gen de referencia no existan.

El programa REST determina la probabilidad de las diferencias en expresión en base a la población de contrastes posibles en procedimientos de permutación. Alternativamente los valores de CP pueden compararse mediante ANOVA o T de *Student* cuando se satisfacen los supuestos estadísticos y las condiciones de experimentación.

Mucho se discutió (Lin *et al.*, 2014) sobre la aptitud de distintos genes para ser utilizados como genes de referencia. En general corresponden a genes que forman parte del metabolismo básico de las células o también de mantenimiento (*housekeeping*) celular. Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes al momento de realizar una PCR en tiempo real, es la calidad del material de partida.

En este trabajo se propuso profundizar y continuar los estudios de expresión diferencial de genes *PAL* a través de PCR cuantitativa en tiempo real, en tres genotipos que en estudios previos habían presentado altos niveles de compuestos fenólicos en sus tejidos y elevado espesor de pericarpio, características asociadas a las enzimas PAL.

## **HIPÓTESIS**

La expresión de los genes *PAL* es afectada por el genotipo, el nivel de inoculación y la ontogenia de los tejidos de estigma y grano.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Estudiar la expresión diferencial de genes que codifican a las enzimas PAL ubicados en el cromosoma 2 en genotipos de maíz resistentes y susceptibles a *Fusarium verticillioides*.

### **Objetivos específicos:**

1. Estudiar la expresión transcripcional de los genes GRMZM2G441347 (*pa2*) y GRMZ2MG118345 (*pa6*) en tejidos de estigma y grano de tres genotipos de maíz.
2. Cuantificar los niveles de expresión de los genes *pa2* y *pa6* en relación a los efectos de la inoculación con agua y suspensiones conidiales de *F. verticillioides* sobre la expresión génica.
3. Estudiar la evolución en el tiempo de la expresión, durante el período en que el estigma es susceptible a *Fusarium* y en estadios tempranos del desarrollo de grano.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Material vegetal**

Se trabajó con las líneas de maíz LP4637 (moderadamente resistente), L4674 (susceptible) y SPF051, que es una población de base genética amplia desarrollada mediante selección por resistencia a *Fusarium*. LP4637 y L4674 se caracterizan por su polimorfismo para los marcadores del QTL en el bin 2.03 mapeado por Giomi *et al.*, (2015 y 2016). SPF051 presenta un elevado nivel de resistencia a la enfermedad de acuerdo a evaluaciones en experimentos inoculados en múltiples años y localidades (Presello *et al.*, 2006) que probablemente esté asociada a altos concentraciones de compuestos fenólicos en sus tejidos y un alto espesor de pericarpio (Fauguel *et al.*, 2011, Sampietro *et al.*, 2012).

### **2. Expresión génica**

#### **Diseño experimental**

Se realizó un ensayo a campo en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA Pergamino, INTA, Bs. As.). Los materiales genéticos se sembraron el día 3 de octubre de 2017 de acuerdo con el diagrama de un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) con tres repeticiones. Cada parcela consistió en 8 surcos de 5 metros, separados a 0,70 metros y sembrados a una densidad de 5 semillas por metro.

En cada parcela, se marcó la fecha en que cada planta presentaba los estigmas expandidos (aproximadamente un día luego de la emergencia) y dicho momento se consideró el tiempo cero (T0) para el muestreo. En el T0, se inocularon 12 plantas por repetición con agua destilada estéril, 12 con suspensiones conidiales de *F. verticillioides* y se dejaron 15 plantas bajo infección natural. La inoculación se realizó en el canal de los estigmas inyectando 2 ml de una suspensión conidial de un aislamiento monospórico P364 de *F. verticillioides* de agresividad media y productor de fumonisinas (Iglesias *et al.*, 2010) siguiendo los protocolos de Reid *et al.*, (1996). El tratamiento inoculado con agua destilada estéril se realizó con los mismos protocolos, pero con una jeringa diferente y esterilizada con alcohol al 70%.

### **Muestreo**

En enero de 2018, se tomaron muestras de espigas provenientes de tres plantas al azar de cada genotipo, tratamiento y repetición correspondientes a los siguientes tiempos luego de emisión de estigmas:

T0 (un día luego de emergencia de estigmas, momento en que se llevó a cabo la inoculación con agua y *F. verticillioides*): muestras de estigmas

T1 (T0+24hs): muestras de estigmas

T2 (T0+48hs): muestras de estigmas

T3 (T0+72hs): muestras de estigmas

T4 (T0+8días): muestras de grano en desarrollo

Se tomó recaudo de mantener una distribución homogénea del muestreo de cada tratamiento a lo largo del tiempo a fin de comparar los niveles de expresión génica en tiempos similares. Las espigas tomadas dentro de cada genotipo, tratamiento, tiempo de muestreo y repetición se colocaron en una conservadora con gel

refrigerante y fueron llevadas inmediatamente al Laboratorio de Biotecnología (EEA Pergamino, INTA, Bs. As.). Allí, se extrajeron muestras de estigmas o granos en desarrollo que fueron envueltos con láminas de papel aluminio, etiquetadas y almacenadas a -80 °C. Las muestras de estigmas fueron extraídas del “canal de los estigmas” ubicado entre la punta del marlo y el final de las chalas. Los granos fueron extraídos con una espátula de la parte central de la espiga.

### **Extracción de RNA**

Una vez finalizado el muestreo, se formaron muestras compuestas a partir de estigmas y grano aislados de las tres plantas muestreadas por cada tratamiento. Así se formaron 13 muestras compuestas por repetición, 5 para el tratamiento en infección natural (T0, T1, T2, T3 y T4), 4 para los tratamientos inoculados con agua y 4 para los inoculados con suspensiones conidiales de *F. verticillioides* (T1, T2, T3 y T4).

La extracción de RNA se llevó a cabo con Quick-Zol (Kalium Technologies S.R.L.) de acuerdo con el protocolo detallado en el *Anexo 1*. Dicho reactivo permite extraer el RNA total a partir de células y tejidos. Asegura gran integridad y pureza, libre de contaminación de DNA y proteínas. Posteriormente la verificación de calidad e integridad se hizo a través de una electroforesis de RNA en gel de agarosa no desnaturizante con tinción de bromuro de etidio (*Anexo 2*).

### **Transcripción reversa**

El cDNA se obtuvo por la acción de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (PB- L Productos Bio-Lógicos) utilizando un oligonucleótido poli-T como cebador. El protocolo utilizado se detalla en el *Anexo 3*. M-MLV *transcripta* es una DNA polimerasa RNA dependiente de segunda generación, sin actividad DNAsa (endo y exonucleasas) y RNAsa, capaz de sintetizar cDNA a partir de moléculas de RNA. Posee alta sensibilidad, especificidad y es activa en el rango de temperatura 37- 65 °C.

La verificación de calidad y correcta síntesis de cDNA se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6 %. Se realizó PCR convencional del gen

*ef1 $\alpha$*  (factor de elongación 1 alfa) usando 1  $\mu$ l de suspensión de cDNA (*Anexo 4*). Se pudo observar que el total de las muestras amplificaron exitosamente.

### **Real Time- qPCR**

La PCR cuantitativa se ejecutó en un equipo ABI 7500 Real-Time (Applied Biosystems, USA) utilizando como medio de reacción Fast Start Universal Sybr Green Master Mix (ROCHE, Suiza).

Los cebadores específicos para los transcritos de los genes candidatos, previamente diseñados y ensayados (Nápoli *et al.*, 2017) se observan en la tabla siguiente:

Secuencia blanco	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Ubicación	Longitud de amplificación
pal2 T01	LB15F	TTCTTCTGCCACACCGCATC	2:29538383- 29538402	105
	LB15R	GCCTTGCCCCAGTTGAGC	2:29538470- 29538487	
pal2T02	LB16F	TCCATCTGTTCTATTCTCTGCGAC	2:29539396- 29539419	99
	LB16R	CACGCGAAACCTCGGACG	2:29539477- 29539494	
pal6T01	LB14F	ACGCTCACCACAAGTCCAC	2:29467875- 29467893	105
	LB14R	CGTTCTCGCACTCCATGTCTG	2:29467960- 29467979	

La secuencia de los cebadores del gen de referencia factor de elongación 1 alfa (*ef1 $\alpha$* ) se obtuvo del trabajo de Lin *et al.*, (2014):

Secuencia blanco	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Ubicación	Longitud de amplificación
ef1a	ef1aF	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	9:90424244- 90424267	134
	ef1aR	ACATACCCACGCTTCAGATCCT	9:90424357- 90424378	

En el *Anexo 5* se encuentra en detalle el protocolo llevado a cabo.

Es importante destacar que, debido a cierto grado de variabilidad biológica inevitable, se pueden perder muestras en los pasos previos a la PCR cuantitativa (extracción de RNA, síntesis de cDNA) o durante el proceso de amplificación. Por lo tanto, es de suma importancia partir de varias muestras para ganar potencia estadística al final sin sacrificar confiabilidad. Así como también, el hecho de muestrear un material de partida de buena calidad y la inmediata colocación en freezer a -80 °C, ya que el RNA se degrada rápidamente después del muestreo.

### **3. Análisis de datos.**

Los datos de amplificación de la qPCR se tomaron sobre dos repeticiones técnicas de cada una de las repeticiones biológicas. Los resultados de amplificación se analizaron siguiendo la metodología de Pfaffl (2001) con el programa REST: *Relative expression software tool* (Pfaffl *et al.*, 2002) basada en el modelo matemático de CP comparativo.

La cuantificación relativa requiere de la normalización de los datos para lo cual debe seleccionarse un gen de referencia cuya expresión sea similar en todas las muestras de estudio, estable en las variaciones experimentales, y que este en el mismo rango de cinética que el gen de interés. En este caso, se utilizó el factor de elongación 1 alfa (*ef1 $\alpha$* ) que participa en el proceso de síntesis de proteínas por parte de la célula (Lin *et al.*, 2014). Es de naturaleza proteica e imprescindible para que el ribosoma pueda realizar su función durante la traducción.

Para probar que la expresión del gen de referencia no haya variado, independientemente del tiempo, tratamiento y genotipo, se realizaron las pruebas estadísticas *t* de Student apareadas en Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2016). Este tipo de prueba es útil para analizar un mismo conjunto de elementos que se midieron antes y después de un tratamiento o a través del tiempo. Para lo cual, se plantearon las siguientes hipótesis:

H0: la expresión del gen de referencia no se modifica a través del tiempo.

H1: la expresión del gen de referencia se modifica a través del tiempo.

Para un mismo genotipo, se compararon los mismos tratamientos (N: sin inocular, A: inoculado con agua, I: inoculado con *Fusarium verticillioides*) entre los distintos tiempos.

Luego, se analizaron en el programa REST los tres genotipos en los tiempos T1, T2, T3 y T4, comparando entre tratamientos, para determinar el efecto de estos. Se plantearon las siguientes hipótesis:

a) H0: los genotipos no expresan de manera diferencial los genes *target* a través del tiempo, debido al efecto de inoculación con agua o el hongo.

H1: los genotipos expresan de manera diferencial los genes *target* a través del tiempo, debido al efecto de inoculación con agua o el hongo.

b) H0: dentro de cada tiempo y nivel de inoculación no existen diferencias significativas en las expresiones génicas debido al efecto del genotipo.

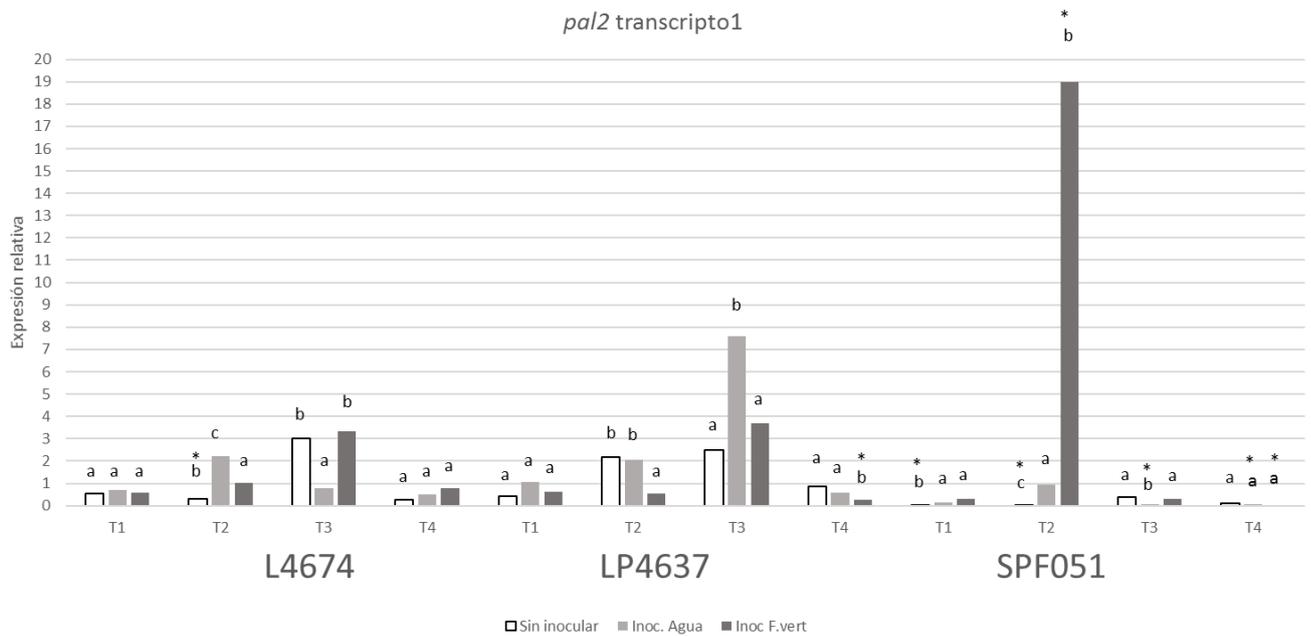
H1: dentro de cada tiempo y nivel de inoculación existen diferencias significativas en las expresiones génicas debido al efecto del genotipo.

Para todas las comparaciones tanto en el programa REST como en el análisis de Infostat, se consideró un nivel de significancia de  $\alpha=0,05$  por lo que un  $p\text{-value}>0,05$  no representan diferencias significativas.

## **RESULTADOS**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba *t* de Student, no se observaron diferencias en la expresión de *ef1 $\alpha$*  para ninguna de las combinaciones entre genotipos, tiempos de muestreos y niveles de inoculación (*Anexo 6*). Por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula (H0) y se asumió que la expresión fue homogénea a través de todos los tratamientos del experimento y en el tiempo.

Las muestras de plantas no inoculadas de cada genotipo tomadas en el día de la inoculación fueron consideradas como el tratamiento testigo (T0) para estudiar la evolución de la expresión de los genes *target* en el tiempo a través de la expresión relativa de los distintos tratamientos de inoculación (Figs. 5, 6 y 7). La expresión de los transcritos correspondientes al gen *PAL* en LP4637 y L4674 fue constante y baja, en cada uno de los tratamientos efectuados en el experimento. En SPF051, ambos transcritos presentaron un comportamiento similar al de los genotipos anteriores a excepción del T2, en el que se observaron altos niveles de expresión luego de la inoculación con *F. verticillioides* (Figs. 5 y 6). El gen *pal6* se comportó de manera muy similar al gen *pal2* a excepción del T2 en el genotipo LP4637 donde se observó un incremento en los niveles de expresión para el tratamiento de infección natural (Fig. 7). La línea LP4637 presentó una tendencia no significativa de mayores niveles de expresión para los tres transcritos en el tratamiento inoculado con agua en T3 (Figs. 5, 6 y 7).

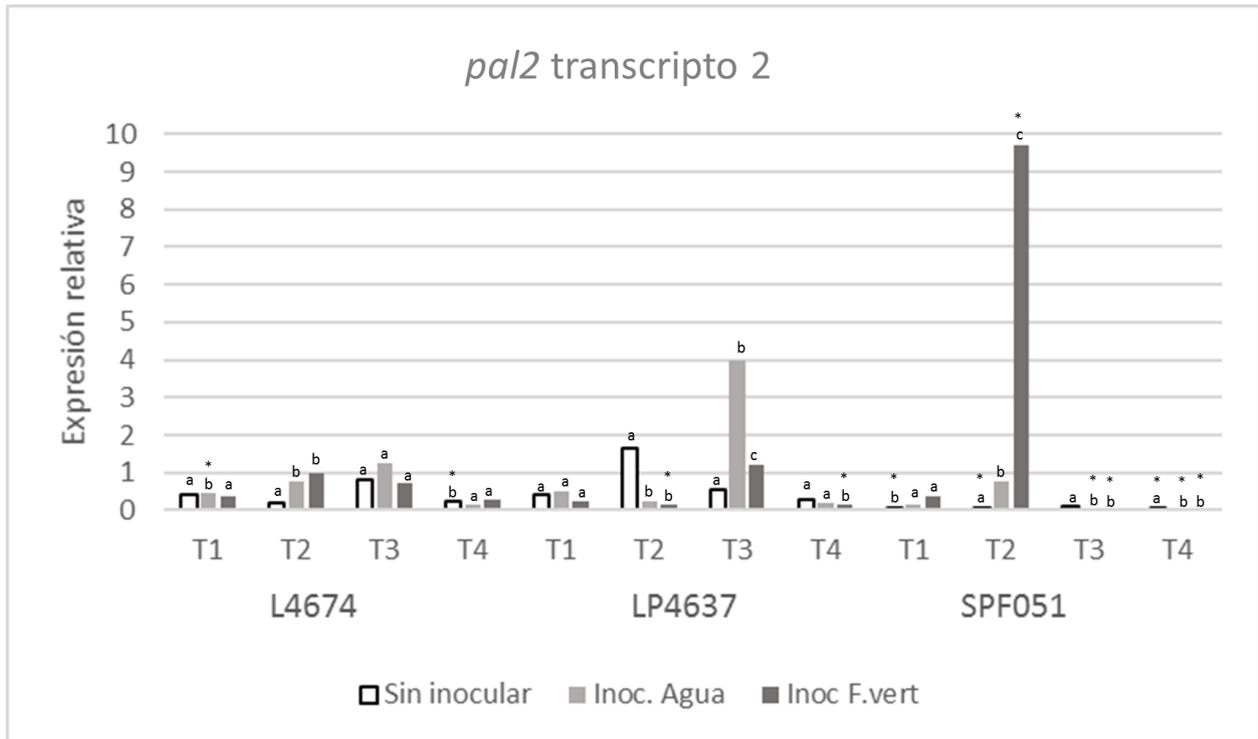


**Figura 5:** Expresión relativa del gen *pal2* transcripto 01 en tres materiales de maíz (L4674, L4637, SPF051) bajo condiciones de infección natural, inoculado con agua e inoculado con *Fusarium verticillioides*.

T1, T2 y T3: tiempos de muestreo de tejidos de estigma, 24, 48 y 72 horas luego de inoculación, respectivamente. T4: tiempo de muestreo de tejidos de grano 8 días luego de la inoculación.

\*: indica diferencias significativas de expresión génica relativa a T0 sin inocular ( $p$ -value < 0,05).

a,b,c: indican diferencias de expresión génica relativa a T0 dentro de cada tiempo ( $p$ -value < 0,05).

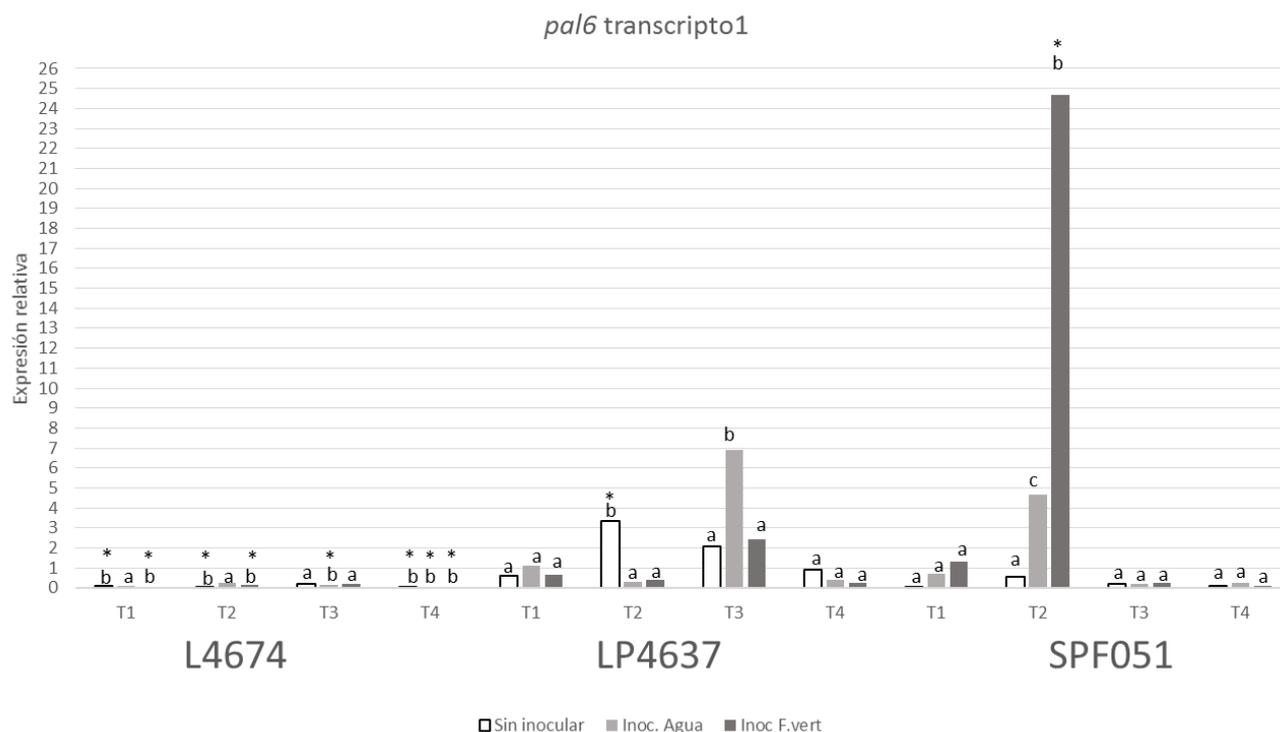


**Figura 6:** Expresión relativa a la expresión en estigmas del gen *pal2* transcripto 02 en tres materiales de maíz (L4674, L4637, SPF051) bajo condiciones de infección natural, inoculado con agua e inoculado con *Fusarium verticillioides*.

T1, T2 y T3: tiempos de muestreo de tejidos de estigma, 24, 48 y 72 horas luego de inoculación, respectivamente. T4: tiempo de muestreo de tejidos de grano 8 días luego de la inoculación.

\*: indica diferencias significativas de expresión génica relativa a T0 sin inocular. (p-value < 0,05).

a,b,c: indican diferencias de expresión génica relativa a T0 dentro de cada tiempo. (p-value < 0,05).



**Figura 7:** Expresión relativa a la expresión en estigmas del gen *pal6* transcripto 01 en tres materiales de maíz (L4674, L4637, SPF051) bajo condiciones de infección natural, inoculado con agua e inoculado con *Fusarium verticillioides*.

T1, T2 y T3: tiempos de muestreo de tejidos de estigma, 24, 48 y 72 horas luego de inoculación, respectivamente. T4: tiempo de muestreo de tejidos de grano 8 días luego de la inoculación.

\*: indica diferencias significativas de expresión génica relativa a T0 sin inocular. (p-value < 0,05).

a,b,c: indican diferencias de expresión génica relativa a T0 dentro de cada tiempo. (p-value < 0,05).

El programa REST en cada análisis de expresión génica brinda valores de intervalos de confianza (IC) para cada comparación realizada. Cuanto más grande sea el intervalo, mayor será el margen de error. En cuanto a los valores observados para el genotipo L4674, fueron menores a los de los materiales resistentes en la mayoría de los tiempos y tratamientos. Para el genotipo LP4637 y para SPF051, los IC más elevados se indican en la siguiente tabla:

Genotipo	<i>pal2</i> T01	<i>pal2</i> T01	<i>pal6</i> T01	Tiempo y Tratamiento
LP4637	(0,837- 158,9)	(0,185- 318,5)	(0,658- 544,041)	T3. Inoculado con agua
SPF051	(7,342- 100,4)	(2,881-97,217)	(7,057- 263,254)	T2. Inoc. <i>F. verticillioides</i>
SPF051	-	-	(0,821- 123,795)	T2. Inoculado con agua

## DISCUSIÓN

Los intervalos de confianza de la expresión génica tendieron a ser mayores en los genotipos resistentes en comparación a los del susceptible, lo que podría ser consecuencia de diferencias entre las plantas muestreadas. Si bien el muestreo se realizó de manera homogénea a la misma hora todos los días, dentro de cada unidad experimental hubo un rango de fechas de floración que pudo haber modificado las condiciones ambientales que afectan la expresión génica. Esto sugiere que una ampliación del tamaño de muestra a intervalos más cortos de tiempo podría facilitar la estimación de los valores de expresión. Por otro lado, el uso de muestras compuestas por tres plantas pudo haber ayudado a morigerar estas diferencias.

En cuanto al genotipo susceptible, la expresión de los tres genes fue relativamente constante y baja. Esto podría asociarse con la información descrita en trabajos anteriores (Campos Bermudez *et al.*, 2013, Giomi, 2015) donde se concluyó, entre otras cosas, que L4674 tiene escasa capacidad de desarrollar una respuesta de resistencia frente a la infección. A su vez, el espesor y contenidos de fenilpropanoides en el pericarpio, caracteres dependientes de la expresión de los genes *PAL*, de esta línea son menores que los de los dos genotipos resistentes, resultando ser una barrera insuficiente para poder hacer frente a la infección por hongos y facilitando así el ingreso de los patógenos a los granos.

Los resultados obtenidos para la línea moderadamente resistente difieren de lo informado en estudios previos, donde habían revelado mayores niveles de expresión de los genes *PAL* en LP4637 en comparación con la línea L4674 (Nápoli *et al.*, 2017) como consecuencia de la inoculación con *Fusarium verticillioides*. En el actual trabajo no se

observaron diferencias significativas de expresión luego de inocular con el patógeno entre dichos genotipos. Lo que se observó fue una expresión mayor, aunque no significativa, de los tres genes en LP4637 para el tratamiento inoculado con agua en comparación con el tratamiento de infección natural 72 horas después de la inoculación. Esto se podría asociar a que los genes responden a mecanismos de estrés, como por ejemplo el daño mecánico causado por la inoculación, similar a lo que muestran los estudios realizados por Mac Donald y D' Cunha (2007). Sin embargo, resulta notable destacar que en la inoculación con el hongo no se pudo divisar el mismo efecto. La consistencia en los niveles de expresión en T3 de los transcritos podría estar indicando que la línea tiene la capacidad de expresarlos, pero los experimentos no pudieron detectar dichas diferencias para el hongo con el cual se inoculó. Estos resultados son consistentes con observaciones de Campos Bermúdez *et al.*, (2013), que indican que las diferencias en expresión génica entre ambas líneas responden a mecanismos constitutivos, es decir, estructuras o funciones preformadas independientes de la intervención del patógeno.

En cuanto al tercer genotipo estudiado, SPF051, en el tratamiento de infección natural la expresión de los genes *PAL* fue baja (Figuras 5, 6, 7). Mientras que se observó un incremento significativo en la expresión de *pal2* y *pal6* 48 horas luego de la inoculación en los tratamientos inoculados, la cual al transcurrir el tiempo, disminuyó. La expresión relativa observada fue mayor en el tratamiento inoculado con *F. verticillioides* que en el inoculado con agua, lo que estaría indicando que este material genético es capaz de expresar estos genes no solo como una respuesta general al estrés (Mac Donald y D' Cunha, 2007, Fauguel, 2011), sino también como una reacción al patógeno. Resultados similares fueron informados en estudios de expresión de genes *PAL* y actividad enzimática en respuesta a patosistemas diferentes, como el mildiu (*Sclerospora graminicola*) en mijo perla (Nagarathna *et al.*, 1993), el cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate (Umesha, 2006) y el nematodo *Meloidogyne incognita* en maíz (Starr *et al.*, 2014). En dichos trabajos, se había observado que en las primeras horas (24-48hs) luego de la inoculación con el patógeno, la actividad de la enzima PAL aumentaba en los genotipos resistentes y se veía disminuida en aquellos genotipos que eran susceptibles.

No se observaron incrementos en la expresión en los estadios tempranos de desarrollo del grano (8 días después de la inoculación) en ninguno de los genotipos y tratamientos. Esto podría estar asociado a que a pesar de que los granos de maíz tienen varias clases de proteínas con actividad antifúngica que realizan múltiples mecanismos para contribuir a la resistencia frente a la infección por patógenos (Fauguel, 2011), la expresión de los genes asociados a las mismas podría darse en estadios anteriores a la formación del grano y luego “apagarse”.

A partir de lo obtenido, se puede concluir que:

- Tanto la línea susceptible como la moderadamente resistente no mostraron una expresión significativa de los genes *PAL* a través del tiempo independientemente del tratamiento efectuado.
- Los niveles de expresión en SPF051 fueron mayores, generándose un pico 48 horas después de la inoculación que luego disminuyó, en señal de que el gen posiblemente se “apagó” una vez finalizados los procesos de transcripción que conllevan luego, a la síntesis de la enzima PAL.
- Dichos resultados aportan evidencia de que los genes *PAL* estarían contribuyendo a la resistencia a *Fusarium verticillioides* en tejidos de estigmas de SPF051 durante momentos críticos para la penetración inicial del patógeno, tanto como una respuesta al estrés, causado por la inoculación, como por la reacción al patógeno.
- Mientras que para LP4637 y L4674 en las condiciones ambientales y tiempos de muestreo estudiados no se pudieron observar diferencias de expresión de dichos genes.

**BIBLIOGRAFÍA:**

Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. 5ta ed. Academic Press. 922 pp.

Bennetzen, JL; Hake, SC. 2009. Handbook of Maize: Genetics and Genomics. New York: Springer. 800 pp.

Campos- Bermudez, VA; Fauguel, CM; Tronconi, MA; Casati, P; Presello, DA; Andreo, CS. 2013. Transcriptional and metabolic changes associated to the infection by *Fusarium verticillioides* in maize inbreds with contrasting ear rot resistance. Plos One 8(4):e61580.

Cassman, KG; Dobermann, A; Walters, DT; Yang, H. 2003. Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. Annu. Rev. Environ. Resour. 2003. 28: 315–58.

Chulze, SN; Ramirez, ML; Pascale, M; Visconti, A. 1998. Fumonisin production by, and mating populations of, *Fusarium* section *Liseola* isolates from maize in Argentina. Mycological Research 102:141-144.

CIMMYT. 2004. Programa de Maíz del CIMMYT. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F. CIMMYT. 123 pp.

Colvin, BM; Harrison, LR. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. Mycopathologia 117:79-82.

Cui, JD; Qiu, JQ; Fan, XW; Jia, SR; Tan, ZL. 2014. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. Critical reviews in biotechnology, 34(3):258-268.

De la Torre-Hernández, MA; Sánchez-Rangel, D; Galeana-Sánchez, E; De la Parra, JP. 2014. Fumonisin –síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 17(1):77-91.

Di Rienzo JA., Casanoves F, Balzarini MG., Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

Doko, MB; Visconti, A. 1994. Occurrence of fumonisin B1 and B2 in corn and corn based human foodstuff in Italy. Food additives and contaminants 4:433-439.

Fauguel, CM. 2011. Tesis Doctoral Facultad Cs. Bioq. y Farm., Título: Bases bioquímicas de la resistencia a *Fusarium verticillioides* en germoplasma argentino de maíz. Caracterización de fracciones proteicas y compuestos volátiles. UNR. 100 pp.

FAO: producción mundial del maíz en 2006. 2006. Manual sobre la aplicación de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de los micotóxicos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 73.

García, G; Fernandez, M; Oviedo, MS; Fauguel, CM; Giomi, GM; Iglesias, J; Presello, DA. 2014. Velocidad de senescencia de estigmas como factor de escape a las infecciones de fusarium. Congreso Nacional de Maíz. AIANBA. ROSARIO.

Garrido, CE; Hernández Pezzani, C; Pacin, A. 2012. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L). from 1999 to 2010. Food control 25; 660-665.

Giomi, GM. 2015. Mapeo de QTLs asociados a componentes de resistencia a *Fusarium spp.* en grano de maíz. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias. 84 pp.

Giomi, GM; Kreff, ED; Iglesias, J; Fauguel, CM; Fernandez, M; Oviedo, MS; Presello, DA. 2016. Quantitative trait loci for *Fusarium* and *Gibberella* ear rot resistance in Argentinian maize germplasm. Euphytica.

Iglesias, J; Presello, DA; Botta, G; Lori, GA; Fauguel, CM. 2010. Aggressiveness of *Fusarium* section *Liseloa* isolates causing maize ear rot in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 92 (1):205-211.

Jinyi, Y; Jing, L; Yueming, J; Xuwu, D; Hongxia, Q; Bao, Y; Feng, C; Dharini, S. 2014. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:1, 64-83

Leyva, E; Navarro-Tovar, G; Loredó, SE; Santos-Díaz, M. 2011. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Boletín de la Sociedad Química de México*. 78210. 35-43.

Lin, Y; Zhang, C; Lan, H; Gao, S; Liu, H; Liu, J; Cao, M; Pan, G; Rong, T; Zhang, S. 2014. Validation of potential reference genes for qPCR in maize across abiotic stresses, hormone treatments, and tissue types. *PloS one*, 9(5), e95445.

Mac Donald, MJ; D´Cunha, GB. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85:273-282.

Munkvold, GP; Desjardins, AE. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis*. 81-556-565.

Nagarathna, K; Shetty, S; Shetty, H. 1993. Phenylalanine Ammonia Lyase Activity in Pearl Millet Seedlings and its Relation to Downy Mildew Disease Resistance. *Journal of Experimental Botany*, 44(265), 1291-1296. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/23694568>

Nápoli, M; Díaz Paleo, AH; Presello, DA. 2017. Expresión de genes candidatos asociados a la tolerancia a *Fusarium* spp. en plantas de maíz (*Zea mays* L.) *Journal of Basic & Applied Genetics*. 28(1):158.

Nirenberg, HI; O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium species* and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90:434-458.

Paliwal, RL; Granados, G; Lafitte, HR; Violic, AD. 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia.

Penning, B; Hunter, C; Tayengwa, R; Eveland, AL; Dugard, C; Olek, A; Vermerris, W; Koch, K; McCarty, D; Davis, M; Thomas, S; McCann, M; Carpita, N. 2009. Genetic Resources for Maize Cell Wall Biology. *Plant Physiology*, 151:1703–1728.

Pérez-Urria Carril, E; García, A. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.

Pfaffl, MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001 29(9):e45.

Pfaffl, MW; Horgan, GW; Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Research*. 30: e36

Presello, DA; Iglesias, J; Botta, G; Reid, LM; Lori, GA; Eyhérabide, GH. 2006. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusariumgraminearum* and *Fusarium verticillioides* in Argentinian and Canadian environments. *Euphytica*. 147: 403-407.

Presello, DA; Iglesias, J; Botta, G; Eyherabide, GH. 2007. Severity of *Fusarium* ear rot and concentration of fumonisins in Argentinian maize hybrids. *Crop Prot* 26:852-855.

Presello, DA; Botta, G; Iglesias, J; Eyhérabide, GH. 2008. Effect of disease severity on yield and grain fumonisin concentration of maize hybrids inoculated with *Fusarium verticillioides*. *Crop Prot* 27:572–576.

Reid, LM; Mather, DE; Arnason, JT; Hamilton, RI; Bolton, AT. 1992. Changes in phenolic constituents of maize silk infected with *Fusarium graminearum*. *Can. J. Botany*. 70:1697-1702.

Reid, LM; Hamilton, RI; Mather, DE. 1996. Screening maize for resistance to gibberella ear rot. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. Tech. Bull. Publ. 1996-5E.

Rheeder, JP; Marasas, WFO; Thiel, PG; Sydenham, EW; Shephard, GS; Van Schalkwyk, DJ. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82:353-357.

Saiki, R; Gelfand, D; Stoffel, S; Scharf, S; Higuchi, R; Horn, G; Mullis, K; Erlich, H. 1988. «Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase». *Science*239 (4839): 487-491.

Sancho, AM; Moschini, RC; Filippini, S. 2018. *Trop. plant pathol.* 43:99.

Sampietro, DA; Fauguel, CM; Vattuone, MA; Presello, DA; Catalán, CAN. 2012. Phenylpropanoids from maize pericarp: resistance factors to kernel infection and fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Eur. J. Plant Pathol.* 135: 105-113.

Schnable, PS; Ware, D; Fulton, RS. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326, 1112–1115.

Sekhon, R; Lin, H; Childs, K; Hansey, C; Buell, C; de Leon, N; Kaeppler, S. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal*, 66(4):553-563.

Shephard, GS; Sydenham, EW; Thiel, PG; Gelderblom, WA. 1990. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 13:2077-2087.

Starr, JL; Yang, W; Yan, Y; Crutcher, F; Kolomiets, M. 2014. Expression of Phenylalanine Ammonia Lyase Genes in Maize Lines Differing in Susceptibility to *Meloidogyne incognita*. *Journal of nematology*, 46(4), 360-364.

Sydenham, EW; Shepard, GS; Thiel, PG; Marasas, WFO; Rheeder, JP; Peralta Sanhueza, CE; Gonzalez, HHL; Resnik, SL. 1993. Fumonisin in Argentinean field trial corn. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41:891-895.

Tanaka, A; Yamaguchi, J; Goldsworthy, P; Bork, D. 1972. Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. *Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University* 57: 71-132. Mexico. Hokkaido University.

Tsitsigiannis I; Antoniou P; Tjamos C. 2012. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. *Phytopathol. Mediterr.* 51:158–174.

Umesha, S. 2006. *Phytoparasitica* 34: 68.

Valla, JJ. 1979. *Botánica: Morfología de las plantas superiores. Hemisferio Sur*. Buenos Aires. 322 pp.

Varón de Agudelo, F; Sarria Villa, GA. 2006. *Enfermedades del maíz y su manejo. Compendio ilustrado*. Grupo Transferencia y Tecnología. Fenalce, ICA. Bogotá, D. C., Colombia. 56 pp.

White, DG. 1999. *Compendium of corn diseases* APS Press. Mn. USA. 78 pp.

**ANEXOS:***Anexo 1. Protocolo de extracción de ARN.*

1. Moler en mortero con nitrógeno líquido la mezcla de estigmas/grano de 3 espigas.
2. Tomar 100 mg del material molido y colocarlos en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El volumen de tejido no debe exceder el 10% del volumen de Quick-Zol (Kalium Technologies S.R.L.) utilizado para la extracción.
3. Agregar 1000 µl de Quick-Zol frío.
4. Mezclar con agitador vórtex.
5. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente permitiendo la disociación completa de los complejos nucleo-proteicos.
6. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm, en frío (4 °C).
7. Conservar el sobrenadante en tubo de 1,5 ml. NOTA: Luego de este paso las muestras homogeneizadas pueden conservarse a temperatura ambiente overnight o a -20°C o -70°C por un año.
8. Agregar 200 µl de cloroformo.
9. Mezclar con agitador vórtex por 15 segundos.
10. Reposar 3 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm en frío (4 °C).
12. Conservar el sobrenadante en tubo de 1,5 ml.
13. Agregar 450 µl de isopropanol.
14. Mezclar por inversión.
15. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm en frío (4 °C).
16. Descartar el sobrenadante por inversión.
17. Agregar 1 ml de EtOH 75% (preparado con H<sub>2</sub>O DEPC 0,1%). NOTA: El ARN puede guardarse en EtOH 75% a -20°C por un año.
18. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm en frío (4 °C).
19. Descartar el sobrenadante por inversión.
20. Secar en flujo 10 minutos. Es importante no secar completamente el pellet ya que esto provoca la disminución de su solubilidad.
21. Agregar 25 µl de H<sub>2</sub>O DEPC, colocar 15 min a 55 °C.
22. Mezclar con agitador vórtex.

23. Guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Anexo 2.* Protocolo de electroforesis de ARN en gel de agarosa.

1. Preparar el gel de agarosa al 1,2 % (conteniendo TAE 1X y Bromuro de Etidio).  
250 ml TAE + 3 g de agarosa + 12,5  $\mu\text{l}$  BrEt.
2. Preparación de las muestras: 2  $\mu\text{l}$  de las muestras de ARN + 0,4  $\mu\text{l}$  de Bromofenol 6X + 8  $\mu\text{l}$  de Formamida.
3. Calentar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.
4. Colocar inmediatamente en hielo y mantener allí durante 5 minutos.
5. Cargar las muestras en el gel y correr a 150V/cm durante 45 minutos.
6. Revelar en transiluminador.

*Anexo 3.* Protocolo de síntesis de ADNc.

1. Agregar los siguientes componentes en un tubo de microcentrifuga:
  - 2  $\mu\text{l}$  de oligo (dT) 20 [200–500 ng].
  - 2  $\mu\text{g}$  de ARN total.
  - 2  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP [10 mM] (10 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
  - ajustar el volumen en 15  $\mu\text{l}$  con H<sub>2</sub>O DEPC.
2. Calentar la mezcla a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 min y luego colocar el tubo inmediatamente en hielo por 2 min.
3. Centrifugar brevemente
  - 4  $\mu\text{l}$  de buffer de síntesis de primera cadena [5X].
  - 0,5  $\mu\text{l}$  RNaseOUT™ (Invitrogen, Cat# 10777-019).
  - 1  $\mu\text{l}$  de enzima M-MLV Transcripta (200 U/ $\mu\text{l}$ )
4. Homogenizar con micropipeta.
5. Incubar a  $50^{\circ}\text{C}$  por 60 min.
6. Inactivar la enzima calentando la reacción a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min.

*Anexo 4.* Protocolo PCR convencional.

1. Descongelar y centrifugar el cDNA.
2. Preparar la reacción de acuerdo con la siguiente tabla:
  - 1  $\mu\text{l}$  de muestra ADNc
  - 6,02  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O
  - 3,38  $\mu\text{l}$  de Mix J (dNTPS, buffer 10X, MgCl<sub>2</sub>)

- 0,25 µl primer directo
- 0,25 µl primer reverso
- 0,10 µl *Taq polimerasa*

Llevando el volumen de reacción a 11 µl totales.

*Anexo 5. Protocolo PCR cuantitativa en tiempo real.*

Nota: La Master Mix qPCR y el colorante de referencia ROX 50X deben ser almacenados en oscuridad o protegidos de la luz.

1. Descongelar la Master Mix qPCR SYBR/ROX previamente almacenada a -20 °C, el colorante de referencia 50X ROX, el molde, los *primers* y el ddH<sub>2</sub>O libre de DNasas y RNasas. Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente y homogenizarlos antes de usar.
2. Preparar la reacción de acuerdo con la siguiente tabla:
  - 1 µl de muestra ADNc (10X)
  - 6 µl Master Mix qPCR(2X)
  - 0,23 µl *primer* directo (10 µM)
  - 0,23 µl *primer* reverso (10 µM)
  - 4,516 µl ddH<sub>2</sub>O libre de RNasas
  - 0,024 µl ROX (50X)

Llevando el volumen de reacción a 12 µl totales por cada pocillo de la placa.

Todos los pasos deben ser realizados manteniendo los tubos en hielo.

3. Cerrar los tubos y mezclar suavemente. Centrifugar brevemente para coleccionar cualquier líquido residual en las paredes y la tapa.
4. Colocar los tubos de PCR en el ciclador térmico y comenzar el ciclado de qPCR.
5. Amplificación:

<b>Etap</b> a	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Paso</b>	<b>Recolección de señal</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	1X	95 °C	10 min	Desnaturalización inicial	No

<b>PCR</b>	40X	95 °C	15 seg	Desnaturalización	No
		60 °C	1 min	Hibridación/Extensión	Si

### Etapa de la curva de Melting/Disociación

Anexo 6. Tablas *t* de Student pareadas para el gen de referencia.

L4674:

#### T0 N vs T1 N

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T0	T1	3	0,72	30,40	29,68	1,66	-3,41	4,85	0,75	0,5313

#### T1 N vs T2 N

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	2,31	29,68	27,38	2,28	-3,36	7,97	1,75	0,2219

#### T2 N vs T3 N

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-2,84	28,04	30,89	1,45	-6,45	0,76	-3,39	0,0771

#### T3 N vs T4 N

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	3,59	31,89	28,30	4,34	-7,20	14,38	1,43	0,2887

#### T1 A vs T2 A

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	0,83	30,07	29,24	0,89	-1,37	3,04	1,63	0,2453

#### T2 A vs T3 A

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-1,76	29,24	30,99	4,85	-13,80	10,28	-0,63	0,5941

#### T3 A vs T4 A

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
Columna1	Columna2	3	2,51	30,99	28,48	9,59	-21,31	26,34	0,45	0,6944

#### T1 I vs T2 I

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-0,03	28,97	29,00	1,72	-4,31	4,25	-0,03	0,9778

#### T2 I vs T3 I

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-0,77	29,00	29,77	1,24	-3,85	2,30	-1,08	0,3928

#### T3 I vs T4 I

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	2,46	29,77	27,31	5,70	-11,71	16,63	0,75	0,5333

**LP4637:****T0 N vs T1 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T0	T1	3	1,84	30,32	28,49	3,23	-6,18	9,85	0,99	0,4284

**T1 N vs T2 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-1,72	28,49	30,21	3,21	-9,70	6,27	-0,93	0,4524

**T2 N vs T3 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-1,00	30,21	31,21	1,76	-5,38	3,38	-0,98	0,4288

**T3 N vs T4 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	1,55	31,21	29,66	1,21	-1,45	4,56	2,22	0,1564

**T1 A vs T2 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-0,68	29,62	30,29	0,91	-2,93	1,58	-1,29	0,3259

**T2 A vs T3 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-2,40	30,29	32,69	1,49	-6,10	1,30	-2,79	0,1078

**T3 A vs T4 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	2,46	32,69	30,23	2,17	-2,94	7,86	1,96	0,1893

**T1 I vs T2 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	3,15	30,65	27,50	6,96	-14,13	20,42	0,78	0,5153

**T2 I vs T3 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-5,78	27,50	33,29	4,57	-17,14	5,57	-2,19	0,1598

**T3 I vs T4 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	6,51	33,29	26,77	5,87	-8,07	21,10	1,92	0,1947

## SPF051:

**T0 N vs T1 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T0	T1	3	8,14	33,23	25,10	3,58	-0,76	17,03	3,94	0,0589

**T1 N vs T2 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-2,25	25,10	27,34	7,08	-19,84	15,35	-0,55	0,6381

**T2 N vs T3 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	-2,36	27,34	29,70	6,25	-17,88	13,15	-0,66	0,5795

**T3 N vs T4 N**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	0,75	28,37	27,63	0,50	-0,49	1,98	2,60	0,1217

**T1 A vs T2 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-2,19	28,18	30,37	3,63	-11,21	6,83	-1,04	0,4063

**T2 A vs T3 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	3,09	31,17	28,08	7,42	-15,34	21,52	0,72	0,5459

**T3 A vs T4 A**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	1,19	28,08	26,89	2,37	-4,70	7,08	0,87	0,4762

**T1 I vs T2 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T1	T2	3	-3,02	29,77	32,79	2,38	-8,92	2,89	-2,20	0,1592

**T2 I vs T3 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T2	T3	3	2,61	32,79	30,18	2,43	-3,42	8,65	1,86	0,2035

**T3 I vs T4 I**

Obs (1)	Obs (2)	N	media (dif)	Media (1)	Media (2)	DE (dif)	LI (95%)	LS (95%)	T	Bilateral
T3	T4	3	-1,19	28,99	30,18	1,48	-4,88	2,50	-1,39	0,2994

Referencias → N tratamiento sin inocular, I tratamiento inoculado con *Fusarium verticillioides*, A tratamiento inoculado con agua.