



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* EN LA RESPUESTA FISIOLÓGICA Y
DE DEFENSA DEL MAÍZ CONTRA *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
FERNANDO GUZMÁN CHÁVEZ

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR
FACULTAD DE QUÍMICA

M.C. MARÍA DEL CARMEN QUINTO HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. Mayo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EFFECTO DE *TRICHODERMA ASPERELLUM* EN LA RESPUESTA FISIOLÓGICA Y DE DEFENSA DEL MAÍZ CONTRA *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Estela Sánchez Quintanar	Facultad de Química, UNAM
M.C. Carmen Quinto Hernández	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por DGAPA-PAPIIT (IN220511) y PAIP (4290-12). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Gladys Ileana Cassab López	Instituto de Biotecnología, UNAM
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. Luis Cárdenas Torres	Instituto de Biotecnología, UNAM
VOCAL	Dra. Bertha González Pedrajo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
SECRETARIO	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM



“¡Resultados! Bueno, he conseguido un montón de resultados. Conozco ya miles de cosas que no funcionan”

Thomas A. Edison





AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. A través de los siguientes apoyos:

- DGAPA-PAPIIT IN220511
- PAIP 4290-12
- Beca de maestría otorgada por CONACYT a Fernando Guzmán Chávez para realizar este trabajo.

Asimismo, se agradece al Dr. Javier Plasencia de la Parra por proporcionarnos la cepa de *Fusarium verticillioides*, y al Dr. José Luis Hernández Mendoza por facilitarnos la cepa de *Trichoderma asperellum* que se emplearon en este trabajo.

Se agradece la asesoría técnica proporcionada por la Dra. Carolina Peña para el montaje de los ensayos de PCR en tiempo real.

Se agradece la ayuda técnica de la Q. Laurel Fabila Ibarra durante la realización de este trabajo de tesis.

Un agradecimiento especial al comité tutorial integrado por la Dra. Estela Sánchez Quintanar y la Dra. Carmen Quinto Hernández por sus valiosos comentarios durante la realización de este trabajo. Y al jurado de examen integrado por los doctores: Dra. Gladys Ileana Cassab López, Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Dr. Luis Cárdenas Torres, Dra. Bertha González Pedrajo y Dr. Francisco Ruíz Terán por sus acertados comentarios a este trabajo de tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por la formación académica y profesional que recibí en los últimos años.



DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis padres: Reyna Chávez Hernández y José Guzmán Posadas por su apoyo proporcionado durante la realización de este trabajo y durante toda mi vida, al igual que a mi tío Andrés Chávez Hernández, que como un padre, siempre ha creído en mí brindándome su apoyo.

A mis hermanos, Luis y Miriam por su comprensión.

A mi amigo José Antonio Pedroza por su ayuda, comprensión y por siempre estar ahí para escucharme, criticarme, apoyarme y pasar buenos momentos. Además de ser buena compañía durante los periodos vacacionales y días festivos que iba al laboratorio.

A mi asesora, la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, por esta única oportunidad para continuar mis estudios de maestría bajo su dirección, por su apoyo, y por ayudarme a crecer no solo como estudiante sino también como ser humano.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 114 y 101 (Pau, Robert, ViriZu, ViriLu, Adri, José, Fer) por hacer grata mi estancia en este lugar.

A mis amigas de toda la vida Rosa y Diana, por cariño, amistad y por siempre estar ahí cuando más las necesito.



ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS.....	XI-XII
II. RESUMEN.....	XIII-XIV
III. INTRODUCCIÓN.....	1-16
III. 1 Pérdidas de cultivos asociadas a patógenos.....	1-4
III. 2 Ciclo de vida de <i>Fusarium verticillioides</i> en maíz.....	4-7
III. 3 Micotoxinas de <i>Fusarium verticillioides</i>	8-9
III. 4 <i>Trichoderma sp.</i> como un hongo biocontrol efectivo.....	9-15
III. 5 <i>Trichoderma</i> y su interacción en Maíz.....	16
IV. JUSTIFICACIÓN.....	17-19
V. HIPÓTESIS.....	20
VI. OBJETIVOS.....	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21-35
VII.1 Preparación y calibración del inóculo de <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	22-23
VII.2 Ensayo de cultivo dual.....	23
VII.3 Relación de conidiación entre <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	24
VII.4 Infección de las semillas de maíz Chalqueño por parte de los microorganismos fúngicos.....	25
VII.4.1 <i>Biopriming</i> de semillas de maíz.....	25-26
VII.4.2 Establecimiento del proceso de infección de las plántulas de maíz con <i>Fusarium verticillioides</i>	27-28
VII.5 Efecto de <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i> sobre el crecimiento de plántulas de maíz.....	28-29
VII.6 Análisis de genes de defensa.....	29-35
VII.6.1 Extracción de RNA de tejido foliar.....	29-30
VII.6.2 Reacción de RT-PCR punto final (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa punto final) y densitometría.....	30-33
VII.6.3 Reacción de qRT-PCR (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).....	33-35
VIII. RESULTADOS.....	36-60
VIII.1 Prueba de fitosanidad e infección de las semillas de maíz Chalqueño.....	36-37
VIII.2 Efecto antagónico entre <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	37-39
VIII.3 Efecto del <i>biopriming</i> con <i>Trichoderma asperellum</i> en la germinación de semillas de maíz Chalqueño.....	39-41
VIII.5 Efecto fisiológico del <i>biopriming</i> en plántulas de maíz.....	42-52
VIII.5.1 <i>Priming</i> de semillas y respuesta sistémica.....	42-43



VIII.5.2 Efecto sobre el crecimiento de plántulas de maíz en presencia y ausencia de los microorganismos fúngicos.....	44-52
VIII.6 <i>Fusarium verticillioides</i> afecta la expresión de los genes de defensa en las plántulas de maíz tratadas o no con <i>biopriming</i>	52-60
VIII.6.1 Vía del SA.....	53-56
VIII.6.2 Vía del JA/Et.....	56-60
IX. DISCUSIÓN.....	61-73
IX.1 <i>Trichoderma asperellum</i> beneficia el crecimiento de las plántulas de maíz var Chalqueño.....	61-64
IX.2 El <i>biopriming</i> con <i>Trichoderma asperellum</i> mantiene a las plántulas sanas contra <i>Fusarium verticillioides</i>	64-66
IX.3 Expresión de genes de defensa durante la interacción de <i>Trichoderma</i> y <i>Fusarium</i> sobre las plántulas de maíz.	66-73
X. CONCLUSIONES.....	74
XI. PERSPECTIVAS.....	75
XII. ANEXOS.....	76-86
XII.1 Anexo 1: Preparación y calibración y cálculos del inóculo de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	76-78
XII.2 Anexo 2: Reactivos y medios de cultivo.....	79-80
XII.3 Anexo 3: Preparación de material y recomendaciones.....	81- 82
XII.4 Anexo 4: Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real por SyBr Green para la detección de los niveles de transcritos relacionados con la defensa del maíz.....	82-86
XIII. REFERENCIAS.....	87-97



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de infección y enfermedad en el sistema <i>Fusarium verticillioides</i> -maíz.....	6
Figura 2.- Estructuras microscópicas características de <i>Fusarium verticillioides</i>	7
Figura 3.- Estructura química de Fumonisina B1 (origen biosintético)	8
Figura 4.- Conidios y conidióforo de <i>Trichoderma sp.</i>	11
Figura 5.- Vías inducidas por ácido salicílico y ácido jasmónico.....	14
Figura 6.- Interacciones de <i>Hypocrea/Trichoderma</i> con otros organismos en la rizósfera.....	15
Figura 7.- Efecto de hongos usados como biocontrol en las plantas.....	18
Figura 8.- Esquema general del trabajo experimental.	21
Figura 9.- Conidios de <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i>	24
Figura 10.- Prueba de Fitosanidad.	36
Figura 11.- Semillas de maíz chaqueño infectadas por dos microorganismos fúngicos.....	37
Figura 12.- Efecto antagonista de <i>Trichoderma asperellum</i> contra <i>Fusarium verticillioides</i>	38
Figura 13.- Ensayo de cultivo dual.	39
Figura 14.- Efectos fisiológicos de <i>T. asperellum</i> sobre semillas de maíz a las 24 y 48 h de germinación.	40
Figura 15.- Tamaño de radículas y efectos en la germinación de semillas tratadas con <i>Trichoderma asperellum</i>	41
Figura 16.- Hojas de plántulas de maíz provenientes de semillas que fueron sometidas a <i>biopriming</i>	43
Figura 17.- Plántulas de maíz provenientes de semillas tratadas y sin tratar con <i>T.asperellum</i> a diferentes tiempos de post-infección con <i>Fusarium verticillioides</i>	44-45
Figura 18.- Curva temporal de cambios en el tamaño de la parte aérea de plántulas de maíz provenientes de semillas con tratamiento de <i>biopriming</i> con <i>T.asperellum</i> y post-infectadas con <i>Fusarium verticillioides</i>	46
Figura 19.- Curvas temporales de los cambios en el grosor de los tallos de plántulas de maíz provenientes de semillas tratadas con el <i>biopriming</i> con <i>T.asperellum</i> y post-infectadas con <i>Fusarium verticillioides</i>	48-50
Figura 20.- Porcentaje relativo de clorofila.	51
Figura 21.- Expresión temporal de los genes de la vía del AS en hojas de plántulas provenientes de semillas que fueron tratadas con <i>T. asperellum</i> e infectadas con <i>F. verticillioides</i>	54



Figura 22.- Perfil de expresión de los genes marcadores de la vía del SA en plántulas que fueron tratadas y no tratadas con <i>T. asperellum</i> al día 1 y 4 post-infección con <i>F. verticillioides</i>	55
Figura 23.- Expresión temporal de los genes de la vía del JA en hojas de plántulas provenientes de semillas que fueron tratadas con <i>T. asperellum</i> e infectadas con <i>F. verticillioides</i>	57
Figura 24.- Perfil de expresión de los genes marcadores de la vía del JA en plántulas que fueron tratadas y no tratadas con <i>T. asperellum</i> al día 1 y 4 post-infección con <i>F. verticillioides</i>	60
Figura 25.- Vista de la Cámara de Neubauer 10X.	76
Figura 26.- Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados en la detección de los genes UBQ, PR, PAL, AOS, AOC y OPR por q-PCR.....	83
Figura 27.- Curvas estándar de amplificación de los genes UBQ,PAL, PR, AOS,AOC y OPR... ..	84-86



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Porcentaje de pérdidas de cultivo (%) debidas a patógenos (hongos, bacterias y virus), insectos y malezas.	2
Tabla 2.- Principales enfermedades del maíz asociadas a hongos y otras plagas.....	3
Tabla 3.- Condiciones de <i>biopriming</i> de las semillas de maíz con <i>T. asperellum</i>	26
Tabla 4.- Condiciones probadas de inoculación de <i>F. verticillioides</i> y su efecto en la planta.	27
Tabla 5.- Combinaciones en los tratamientos empleados.	28
Tabla 6.- Mezcla de reacción de RT.....	31
Tabla 7.- Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de PCR para los cuatro pares de oligonucleótidos empleados.	31
Tabla 8.- Condiciones empleadas en la realización de la reacción de PCR para la amplificación de los transcritos PR, PAL, PDF y AOS.	32
Tabla 9.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de PR, PAL, PDF y AOS.....	32
Tabla 10.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de PR, PAL, AOS, AOC y OPR de maíz en tiempo real.....	33
Tabla 11.- Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de q-PCR para los 6 pares de oligonucleótidos empleados.....	34
Tabla 12.- Valores de Ct de diluciones seriales de DNA en diferentes tejidos de maíz.....	86



I. ABREVIATURAS

A

- Abs** Absorbancia
AOC Aleno óxido ciclasa
AOS Aleno óxido sintasa

C

- cDNA** DNA templado
CIMMYT Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo

D

- DEPC** Dietil pirocarbonato

E

- EDTA** Ácido etilendiamina tetra acético
ET Etileno

F

- FAO** Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization)
FB1 Fumonisina FB1

G

- GA** Giberelinas

I

- ISR** Respuesta sistémica inducida

J

- JA** Ácido Jasmónico

L

- LAR** Respuesta sistémica localizada

M

- MAPK** Proteínas quinasas activadas por mitógenos

O

- OPDA** Ácido 12-oxofitodienoico
OPR OPDA reductasa



P

- PAL** Fenilalanina amonio liasa
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- PDA** Agar papa dextrosa
- PDF** Defensina de planta
- PRs** Proteína relacionada con la patogénesis

Q

- q-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

R

- RNA_m** RNA mensajero
- ROS** Especies reactivas de oxígeno
- RT** Transcriptasa reversa

S

- SA** Ácido salicílico
- SAR** Respuesta sistémica adquirida

U

- UBQ** Ubiquitina



II. RESUMEN

El microorganismo *Trichoderma sp* es un hongo que interactúa con las plantas de forma benéfica, promoviendo su crecimiento y fortaleciendo las defensas de la planta, haciéndola menos susceptible al ataque por patógenos. En el presente trabajo se estudiaron los efectos a nivel fisiológico y molecular de la interacción de plántulas de maíz variedad Chalqueño con *Trichoderma asperellum*, y la post-infección de estas con el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*. El objetivo fue determinar cuál vía de defensa predominaba durante la interacción *Trichoderma*-maíz-*Fusarium*.

El maíz Chalqueño sujeto a *biopriming*¹ con *T. asperellum* presentó a las 48 h una elongación radicular mayor y un adelanto en la presencia de raíces adventicias. El cual se mantuvo en el estadio de plántula. Con relación a la defensa, se observó una resistencia a la infección por el patógeno *Fusarium verticillioides*, ya que las hojas carecían de crecimiento del patógeno y el daño foliar fue menor al de las plántulas que no fueron previamente tratadas con *T. asperellum*.

Los niveles de clorofila en las plántulas que provenían del tratamiento con *Trichoderma* e infectadas con *Fusarium* no cambiaron, en contraste con las plántulas sin tratamiento con *Trichoderma* las cuales redujeron su contenido de clorofila, lo que sugiere un cambio en el metabolismo de carbono para reforzar las defensas de la planta.

La respuesta de defensa de la planta a través de la vía de señalización del Ácido Salicílico (SAR²), se examinó mediante el análisis de la expresión de los genes para la PR (proteína relacionada con la patogénesis) y PAL (fenilalanina amonio liasa), ambos transcritos se indujeron independientemente del tratamiento que recibieran las plantas, herida, inoculación de *F. verticillioides* o bien que provinieran de *biopriming* con *Trichoderma*. Mientras que la vía de defensa del

¹ Proceso que combina la hidratación de la semilla y la inoculación con un organismo benéfico para protegerla de organismos patógenos.

² SAR: Respuesta Sistémica Adquirida.



Ácido Jasmónico (ISR³) se evaluó mediante la expresión de 3 genes involucrados en la síntesis de JA (ácido jasmónico): AOS (aleno óxido sintasa), AOC (aleno óxido ciclasa) y OPR (ácido 12-oxofitodienoico reductasa) y un gen de defensa encendido por JA, PDF(defensina). Todos ellos fueron más altos en las plántulas con *biopriming* que en las plántulas control, y durante la infección por *Fusarium* los transcritos de la vía de síntesis de JA tienden a ser más altos en las plántulas con *biopriming*. Es probable que la alta inducción de la vía de defensa dependiente del JA sea la responsable de la salud de las plántulas con *biopriming* a pesar de haber sido inoculadas con *Fusarium verticillioides*.

³ ISR: Respuesta Sistémica Inducida.



III. INTRODUCCIÓN

III. 1 Pérdidas de cultivos asociadas a patógenos

Las enfermedades en plantas son una limitación importante en la producción de cultivos a nivel mundial, ya que se pierden del 10-30% de la cosecha global cada año (Talbot, 2010). Se prevé que la población humana aumentará en un 35% (7.7 billones) para el 2020, aunado a los hábitos alimenticios que los países desarrollan hacia determinados alimentos (por ejemplo mayor consumo de leche, carne, cereales etc.) y al incremento del uso de granos para alimentar al ganado, se proyecta que la demanda de estos llegará a ser del doble (Oerke *et al.*, 2004).

Desafortunadamente la producción agrícola relacionada con los principales productos alimenticios, es mermada anualmente por pérdidas debidas a la presencia de patógenos (Tabla 1, Lucas, 1998 y Oerke, 2006) lo cual trae consigo repercusiones económicas, por ejemplo anualmente en los Estados Unidos se pierden aproximadamente \$9.1 billones de dólares, debido a enfermedades en los cultivos ocasionadas por hongos, bacterias, nemátodos y virus, \$7.7 billones debido a insectos y \$6.6 billones por malezas (Agrios, 2005).

Adicionalmente, es posible que uno de los efectos del cambio climático sea el incremento en las infecciones en plantas, por lo que el estudio, prevención y tratamiento de las enfermedades en cultivos resulta prioritario (Talbot, 2010).



Producto	Pérdidas de cultivo (%)			
	Patógenos	Insectos	Maleza	Total
Arroz	12.2	15.1	10.2	37.5
Trigo	12.6	7.9	7.7	28.2
Cebada	10.1	8.8	10.6	29.5
Maíz	11.2	9.6	10.5	31.3
Papas	21.1	10.9	8.3	40.3
Soya	10.1	8.8	7.5	26.4
Algodón	7.9	12.3	8.6	28.8
Café	14.9	14.9	10.3	40.1

Tabla 1.- Porcentaje de pérdidas de cultivo (%) debidas a patógenos (hongos, bacterias y virus), insectos y malezas (Tomada y adaptada de Lucas, 1998 y Oerke, 2006).

Maíz

El maíz es el cultivo más importante de México, forma parte principal en la dieta de los mexicanos. Está presente en la elaboración de más de 4 mil productos con usos variados (almidón, fructuosa, aceites, cartón, chocolates, biocombustible, alimento animal, etc) (SAGARPA, 2008).

El maíz (*Zea mays*), está constituido mayoritariamente por tejido foliar. Su tallo principal es una barra esbelta y segmentada, que presenta a lo largo una serie de nodos, y que soporta dos filas de hojas únicas opuestas una de la otra. Mientras que la mayoría de las gramíneas tienen inflorescencias bisexuales, el maíz las presenta unisexuales. Las inflorescencias masculinas (estaminadas) se localizan a lo largo de estructuras ramificadas llamadas espigas, las cuales se encuentran en la parte superior de la planta. Las inflorescencias femeninas (pistilo) se encuentran en una disposición compacta alrededor de un eje y colectivamente forman la mazorca. Cada mazorca se localiza al final de una rama corta lateral (brote) en la región media de la planta (Vincent, 2002).

El cultivo del maíz ocupa poco más de la mitad de la superficie sembrada del país, representando casi una tercera parte del valor de la producción agrícola. Se



estima que su producción se ha reducido desde 2003 un 15.9% por la presencia de insectos, 9.4% por patógenos bacterianos y fúngicos y un 2.9% por virus (Oerke, 2006). Las principales enfermedades asociadas al maíz se relacionan a la infección por hongos e insectos (Tabla 2).

<p>Enfermedades foliares</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mancha bandeada de hoja y vaina por <i>Rhizoctonia solani</i> • Mancha foliar por <i>Curvularia sp.</i> • Rayado foliar por <i>Stenocarpella macrospora</i> • Tizón foliar por <i>Bipolaris maydis</i> • Mancha foliar por <i>Phaeosphaeria maydis</i> • Roya por <i>Puccinia polysora</i> • Mildiú sorgo del maíz por <i>Sclerophthora sp.</i>
<p>Pudrición de tallo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pudriciones de tallo por <i>Gibberella sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i> • Carbón de la espiga por <i>Ustilagoideia virens</i> • Pudrición de tallo por <i>Pythium sp.</i> • Pudrición de tallo por <i>Stenocarpella sp.</i>
<p>Pudrición de mazorca</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pudrición de mazorca por <i>Aspergillus</i> • Carbón común por <i>Ustilago maydis</i> • Pudrición de mazorca por <i>Gibberella sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i> • Pudriciones de mazorca por <i>Penicillium sp.</i> • Pudrición de mazorca por <i>Stenocarpella sp.</i>
<p>Enfermedades causadas por virus y mollicutes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Achaparramiento del maíz • Mosaico del enanismo del maíz • Virus del rayado del maíz • Mosaico de la caña de azúcar
<p>Plagas que afectan a la planta</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Barrenador africano del tallo de maíz • Pulgón de la hoja de maíz • Barrenador europeo del maíz • Gusano cogollero • Pulguilla negra • Saltamontes, langostas y chapulines • Barrenador oriental del maíz • Barrenador del maíz • Barrenador moteado del tallo de sorgo • Barrenador de la caña de azúcar • Termitas • Gallina ciega
<p>Plagas que afectan el grano</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polilla de los cereales • Gusanos eloteros • Gusanos de la mazorca • Barrenadores del grano • Gorgojos del grano • Roedores y pájaros

Tabla 2.- Principales enfermedades del maíz asociadas a hongos y otras plagas (Tomado y modificado del Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT), 2010).



Los hongos son los más agresivos hospederos de los cultivos de maíz. La distribución de varios hongos fitopatógenicos como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, se ha modificado y propagado durante los últimos años debido principalmente a cambios incorporados en la agricultura como: el uso de un solo tipo de antifúngico, la introducción de nuevos productos agrícolas en zonas donde solo se sembraban determinados cultivos, la forma de almacenaje, llevando con ello a grandes pérdidas económicas. Por lo tanto, se ha acentuado la investigación en hongos que constituyen una amenaza para los cultivos, con el objetivo de prevenir su acceso y propagación, ya que estos poseen múltiples mecanismos de infección y patogenicidad (secreción de toxinas); (Rossman, 2009).

III. 2 Ciclo de vida de *Fusarium verticillioides* en maíz.

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, aerobios, heterótrofos y en general no móviles. Se reproducen sexual y asexualmente (esporas y conidios respectivamente). Tienen dos tipos de células fúngicas; las somáticas, cuyo proceso de división es por mitosis; y las reproductoras, que presentan su proceso de división por meiosis. Asimismo, poseen una membrana celular basal bien organizada que contiene una gran cantidad de esteroides, en especial el ergosterol, sustancia de la que depende el mecanismo de acción de algunos fungistáticos (Bonifaz, 2010).

La pared celular está básicamente formada por quitina (*N*-acetilglucosamina), celulosa, glucanas, mananas y algunos glicopéptidos, compuestos que en conjunto dan rigidez a la pared celular y son de importancia en su taxonomía (Bonifaz, 2010).

Los hongos han desarrollado diversas estrategias para hacer frente a sus hospederos, así existen hongos biotrófos, necrotófos o hemibiotrófos. El hongo biotrófo mantiene a las plantas infectadas vivas para garantizar su suministro de



carbono orgánico y otros compuestos para el patógeno. Los hongos necrotrofo destruyen a la planta y el hongo se alimenta de tejido vegetal muerto o agonizante, pues son buenos saprófitos. Otros hongos comienzan con una infección biotrofa y cambian a un comportamiento necrotrofo en etapas posteriores de la infección, y/o bajo ciertas condiciones ambientales, estos son los hongos hemibiotrófos (Wahl *et al.*, 2010).

Por ejemplo, *Fusarium verticillioides* es un hongo hemibiotrófo que causa la pudrición de tallos, mazorcas y raíces. Durante sus dos fases de crecimiento produce micotoxinas que contribuyen a su virulencia, y si estas se acumulan en el tejido vegetal pueden ser dañinas para diferentes animales cuando las consumen (Rutherford *et al.*, 2002).

Asimismo, *Fusarium verticillioides* ocasiona enfermedad en todos los estados de desarrollo de la planta del maíz, infectando las raíces, los tallos y los granos. Este patógeno frecuentemente se encuentra colonizando asintóticamente a la planta, lo que lleva en muchos casos a ignorar su presencia al no observarse daños visibles en el hospedero (Munkvold *et al.*, 1997).

El reconocimiento de los patógenos por la planta, resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular, la denominada reacción de hipersensibilidad. Las respuestas de defensa de la planta que resultan en la muerte celular son muy eficaces contra hongos biotrófos, mientras que los patógenos necrotrofos se benefician con la muerte de la célula huésped, por lo que las plantas responden de manera diferente ante los diferentes tipos de patógenos (Wahl *et al.*, 2010).

El ciclo de infección y enfermedad en el sistema *Fusarium verticillioides*-maíz (Figura 1) es complejo, y la importancia relativa de sus componentes continúa siendo objeto de debate. El hongo sobrevive en los residuos de los cultivos, no produce clamidosporas, pero ocasiona el engrosamiento de hifas que

aparentemente prolongan su supervivencia. Este hongo es transmitido por la semilla, asociándose a esta fase de la infección con plántulas enfermas, no obstante el papel de las semillas en la transmisión no es claro en el tallo, ni en la pudrición del grano (Munkvold *et al.*, 1997; Mackean, 2010).

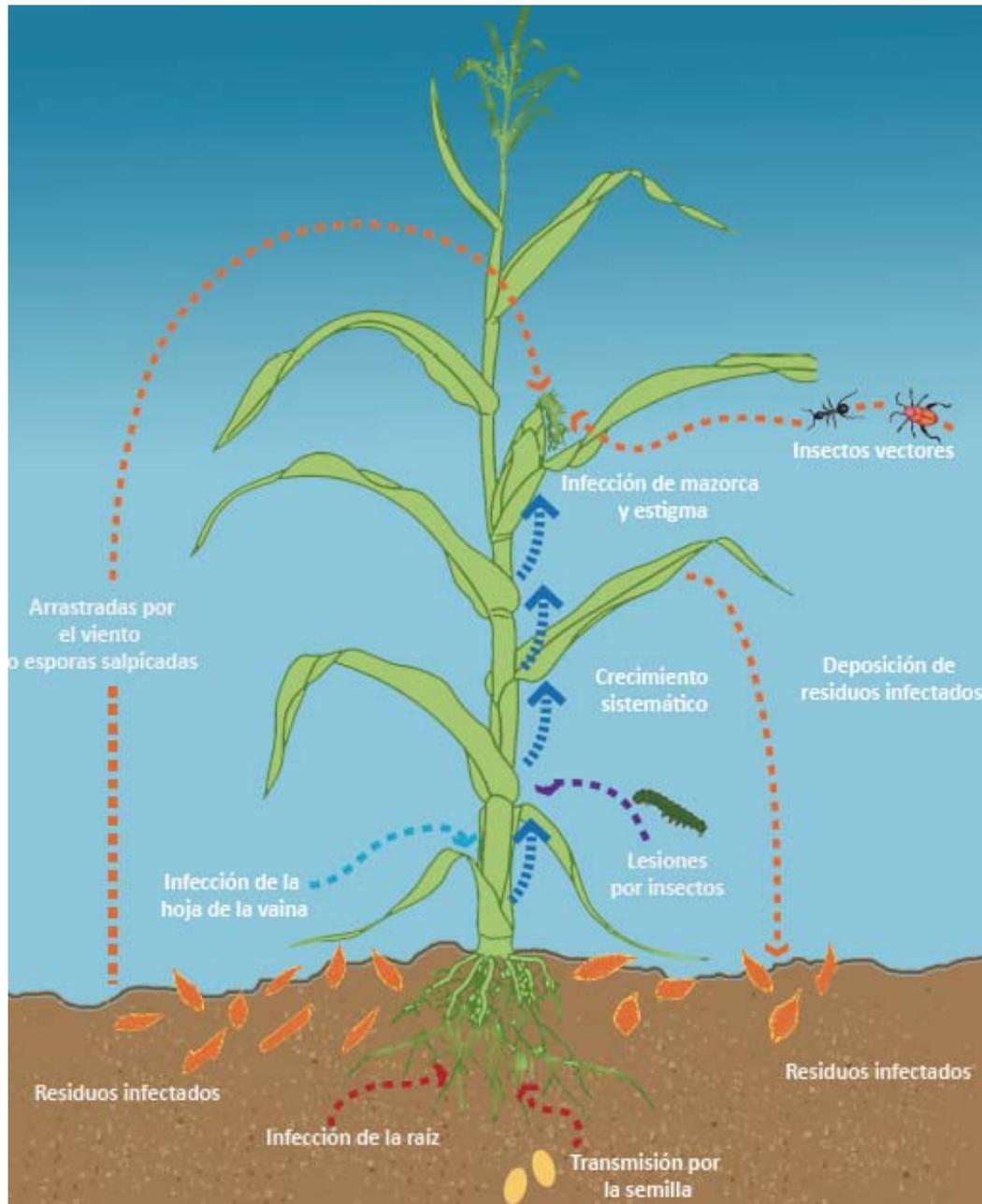


Figura 1.- Ciclo de infección y enfermedad en el sistema *Fusarium verticillioides*-maíz (Tomado y adaptado de Munkvold *et al.*, 1997; Mackean, 2010).

Fusarium verticillioides produce abundantes macroconidios y microconidios (Figura 2) que están en el aire sobre los campos de maíz. Los microconidios, por su parte, pueden moverse libremente dentro de la planta. La fuente de conidios aéreos se debe a los residuos en los cultivos, pero la esporulación de los hongos en los estilos o pistilos puede también contribuir a la infección de las estigmas del maíz, las cuales igualmente logran infectarse por el aire o agua contaminada con conidios. El estado fisiológico de los estigmas también afecta y aumenta la susceptibilidad a ser infectado (Leslie *et al.*, 2006 y Munkvold *et al.*, 1997).

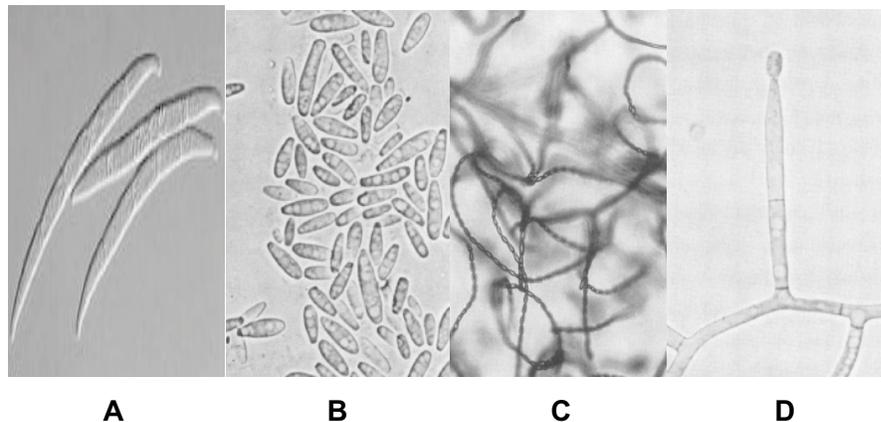


Figura 2.- Estructuras microscópicas características de *Fusarium verticillioides*. (A) Macroconidios (X1000), (B) Microconidios (X1000). (C) Cadenas de conidios (x109), (D) Monofialides (X970) (Leslie *et al.* 2006; Nelson *et al.* 1994)

Algunos factores que predisponen a la mazorca para ser infectada por el hongo son los daños causados por otros hongos, o aquellos de naturaleza ambiental, tales como la temperatura y la disponibilidad del agua, pues se ha demostrado que climas cálidos y secos favorecen el desarrollo de *Fusarium verticillioides* (Granjo *et al.*, 2007). Por otro lado, los insectos juegan un papel importante en la infección del maíz, ya que estos causan lesiones en los sitios característicos de la infección fúngica, tanto de tallo como de mazorca. También algunos insectos pueden actuar como vectores, como el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*, el gusano de maíz, el gusano de la raíz del maíz (en estado adulto y larvario) y algunos escarabajos (Munkvold *et al.*, 1997).

III. 3 Micotoxinas de *Fusarium verticillioides*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos de bajo peso molecular (Bennett *et al.*, 2003). La fumonisina B1 (FB1) también conocida como macrofusina (Figura 3) es la micotoxina más abundante de la familia de las fumonisinas, químicamente es una molécula polar de cadena larga de polialcohol (Desjardins *et al.*, 2000). Se encuentra en una proporción del 70-80 % del contenido total de fumonisinas en cultivos de *Fusarium verticillioides* y alimentos naturalmente contaminados (Wan Norhasima *et al.*, 2009). La incidencia natural de esta micotoxina es un problema de salud, ya que se ha encontrado que causa leucoencefalomalacia en caballos, mulas, burros y conejos (Desjardins *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2005); edema pulmonar en cerdos, cáncer de hígado en ratas; además de que se han reportado varios casos de cáncer esofágico en humanos en las regiones de Transkei (Sudáfrica), en China y al noreste de Italia asociados a esta micotoxina (Bennett *et al.* 2003). Por ello la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer la ha incluido en el grupo 2B como posible carcinógeno en humanos (Logrieco *et al.*, 2002)

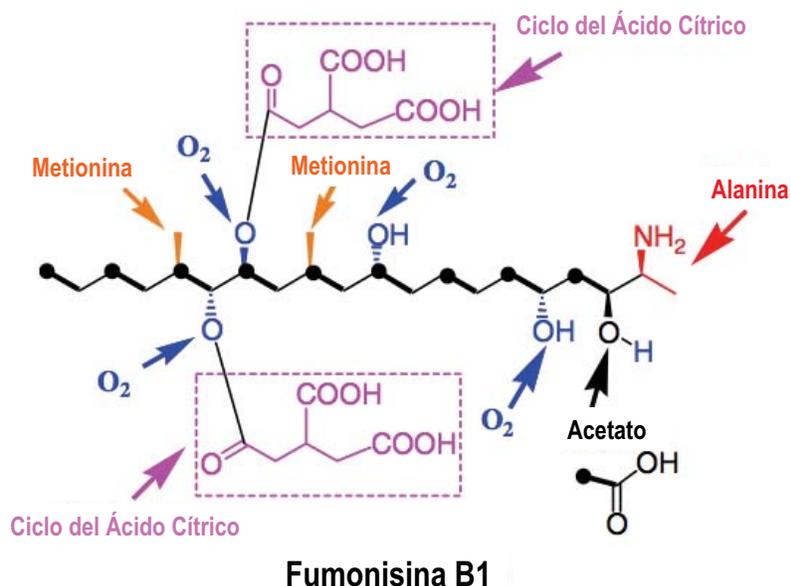


Figura 3.- Estructura química de Fumonisina B1 (origen biosintético) (Tomado y adaptado de Du *et al.*, 2008).



El mecanismo de acción molecular de las fumonisinas se encuentra relacionado con la interrupción del metabolismo de esfingolípidos. La fumonisina B1 y otros miembros de la serie B de las fumonisinas, son potentes inhibidores de la ceramida sintasa (esfinganina *N*-acetil transferasa), la cual es la enzima responsable de la acetilación de la esfinganina, el palmitato y otros ácidos grasos (Bush, 2001). Además de que reduce la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, también podría estar alterando el transporte de nutrientes, la osmolaridad y actividad de varias enzimas de la pared celular vegetal (Gutiérrez-Najera *et al.*, 2005). Otro blanco molecular de la fumonisina B1 es la forma básica de las β-1,3- glucanasas involucradas en la defensa de la planta, las cuales son moduladas por la FB1, para permitir la colonización de *F. verticillioides* en embriones de maíz (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

III. 4 *Trichoderma sp.* como un hongo biocontrol efectivo.

Para controlar las enfermedades en plantas se han utilizado diversos compuestos químicos (control químico); sin embargo, el abuso de estos ha llevado al desarrollo de patógenos resistentes a fungicidas. La implementación de nuevas herramientas basadas en microorganismos antagónicos denominados agentes biocontrol (BCAs) para manejar enfermedades, o integrarlos en la reducción de la utilización de compuestos químicos para controlar los patógenos de plantas, han resultado en impactos ambientales mínimos (Benítez *et al.*, 2004).

El número de BCAs que han sido registrados y están disponibles en productos comerciales, incluyen bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, además de hongos como *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium* (Vinale *et al.*, 2008), sin embargo, el 90% de las aplicaciones comerciales son formuladas a partir de diferentes cepas del hongo *Trichoderma* (Benítez *et al.*, 2004).



El género *Trichoderma spp.* fue descrito e introducido por primera vez en el año de 1794 por Persoon. Hasta el año 2005, se han identificado y nombrado 89 especies de *Trichoderma*, y vinculado varias especies de *Hypocrea* (estado telomórfico de *Trichoderma*) con especies de *Trichoderma* aún sin nombrar (Samuels, 2006). El género *Trichoderma* se divide en cinco grupos: 1) *Pachybasium*, 2) *Trichoderma*, 3) *Saturnisporum*, 4) *Longibrachiatum* e 5) *Hypocreanum*.

La Clasificación taxonómica de *Trichoderma spp* es (Catalogue of Life, 2011):

• División: <i>Fungi (Eumycota)</i>
• Subdivisión: <i>Ascomycota</i>
• Clase: <i>Sordariomycetes</i>
• Orden: <i>Hypocreales</i>
• Familia: <i>Hypocreaceae</i>
• Género: <i>Trichoderma</i>

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica (Infante *et al.*, 2009); en vida libre presentan una alta interacción con ambientes foliares y sobre todo con raíces, por lo que se les denomina rizósfera competentes (Harman, 2008). No obstante, en asociación con plantas son simbioses oportunistas, con múltiples mecanismos que favorecen la resistencia de la planta hacia enfermedades, además de que aumentan su productividad y crecimiento, por lo que *Trichoderma* es considerado un microorganismo biocontrol (Harman, 2006).

Dependiendo de la cepa, la utilización de *Trichoderma* en la agricultura (Vinale *et al.*, 2008) da como resultado diversas ventajas como:

- I. Colonización de la rizósfera (“rizósfera competente”), lo que permite el rápido establecimiento dentro de la comunidad microbiana de la rizósfera.
- II. Control de la microflora patogénica y competitiva/perjudicial mediante diversos mecanismos.
- III. Mejoramiento del estado de salud de la planta.
- IV. Estimulación del crecimiento de la raíz.

Dichas ventajas, se deben principalmente a la naturaleza de *Trichoderma* como un hongo de rápido crecimiento, fuerte productor de conidios (Figura 4), fuente de enzimas que degradan la pared celular de otros hongos (CWDEs: celulasas, quitinasas, glucanasas etc.) y un importante productor de antibióticos (Vinale *et al.*, 2008; Harman, 2006).

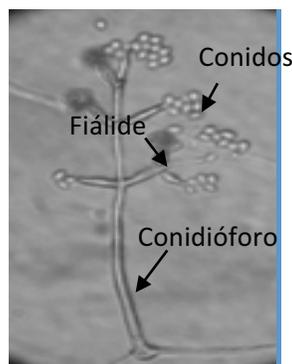


Figura 4.- Conidios y conidióforo de *Trichoderma sp.* (Tomado y adaptado de Infante *et al.*, 2009)

Los mecanismos que *Trichoderma* utiliza para contender contra patógenos y/o ayudar al crecimiento de la planta son varios y a continuación se describen

Micoparasitismo.- Proceso complejo que consiste en el reconocimiento del patógeno, el ataque y la subsecuente penetración y eliminación. Durante este proceso *Trichoderma* secreta CWDEs (“cell wall degrading enzymes”) que hidrolizan la pared celular del hongo hospedero, ocurriendo la liberación de los



oligómeros de la pared celular, lo que induce la expresión de genes involucrados en el micoparasitismo, como los implicados en la síntesis de micotoxinas, las cuales pueden difundir sobre el hongo blanco antes de que el contacto físico ocurra (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Si bien *Trichoderma* también sufre de la hidrólisis de su pared celular, el hongo activa un mecanismo de reciclaje y remodelación de su pared celular, la cual se está activamente restaurando, además se encuentra protegida parcialmente de la hidrólisis por varias proteínas hidrofóbicas y por proteínas que unen carbohidratos (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012).

Antibiosis y metabolitos secundarios.- El tipo de antibióticos sintetizados y secretados por *Trichoderma* dependen de la cepa. Las sustancias anti-fúngicas sintetizadas por *Trichoderma spp.* son: 1) antibióticos volátiles, 2) compuestos solubles en agua y 3) peptaibols (antimicrobianos).

La antibiosis ocurre a dos niveles: 1) La secreción en el suelo de una alta concentración de compuestos volátiles de bajo peso molecular, no polares que tienen un rango de acción a larga distancia, y 2) La producción de antibióticos y peptaibols que actúan en regiones próximas a la hifa productora (Vinale *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2004).

Competencia por nutrientes en la rizósfera.- Es el proceso que le permite al organismo crecer en la rizósfera y competir por nutrientes (carbono, nitrógeno y otros factores) y espacio con el patógeno hospedero de la planta (Howell, 2003; Vinale *et al.*, 2008). La presencia de *Trichoderma spp.* además aumenta por parte de la planta la toma y la concentración de nutrientes como cobre, fósforo, hierro magnesio y sodio en las raíces (Harman *et al.*, 2004).

Inducción de la respuesta de defensa de la planta.- La respuesta inducida de manera sistemática y localizada ocurre en todas o en la mayoría de las plantas en respuesta a un ataque por microorganismos patógenos, daño físico debido a



insectos u otros factores, tratamiento por inductores químicos y la presencia de rizobacterias. Existen tres vías generales que inducen resistencia a la planta, dos de ellas involucran la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), la primera como resultado del ataque de microorganismos patógenos, y en la otra, producto del daño mecánico o necrosis ocasionado por insectos y/o microorganismos necrótofos. Típicamente, la vía inducida por patógenos biótrosos se basa en la producción de SA por la planta como molécula señal, mientras que la vía inducida por insectos herbívoros se sustenta en la producción de JA como molécula señal (Figura 5, Harman *et al.*, 2004). Con base en ello la inducción de la resistencia sistémica adquirida (SAR) se correlaciona con la acumulación de SA, mientras que la resistencia sistémica inducida (ISR) se asocia con la acumulación de JA (Pieterse *et al.*, 1999). Por lo cual, para estudiar estas vías se usan genes marcadores, por ejemplo para la vía de señalización del SA, en el contexto de la inducción de defensa de las plantas se ha encontrado que el gen que codifica para la fenilalanina amonio liasa (PAL), primera enzima en la biosíntesis del SA, se incrementa (Shoresh *et al.*, 2005). Mientras que para la vía de señalización dependiente de JA/ET tiene como marcador a la aleno oxido sintasa (AOS).

En los últimos años, se ha identificado una tercera vía de la resistencia sistémica inducida que es encendida por rizobacterias (RISR), la cual se sugiere que es similar a la activación inducida por *Trichoderma spp.* (Harman *et al.*, 2004), microorganismo que además enciende la resistencia adquirida localizada (LAR) (Vinale *et al.*, 2008). Esta vía es fenotípicamente similar a la que se presenta por JA y SA, sin embargo funcionalmente es muy diferente, ya que las proteínas PR y fitoalexinas no son inducidas por la sola colonización de las rizobacterias sino hasta el momento en que la planta sufre un ataque por microorganismos patógenos (Harman *et al.*, 2004).

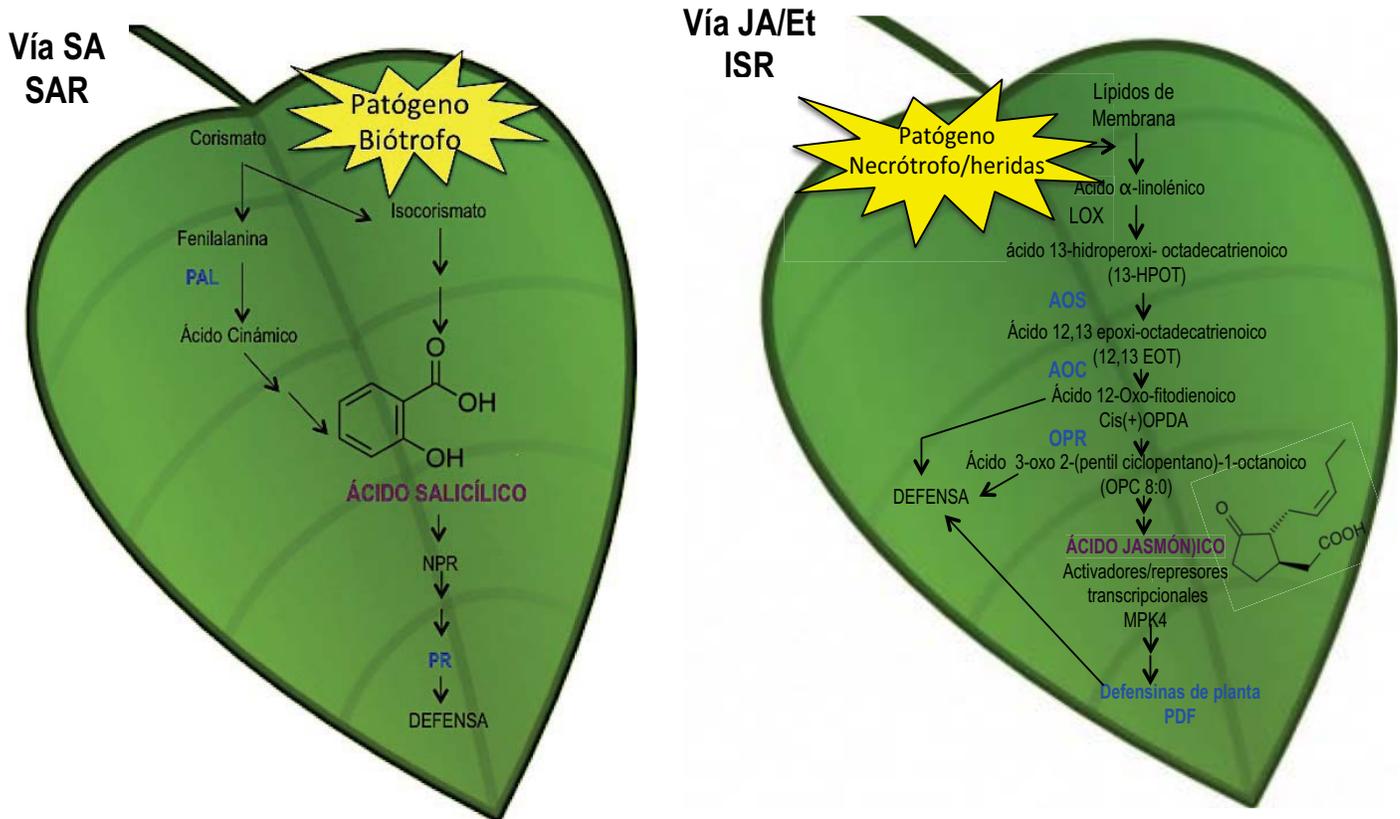


Figura 5.- Vías inducidas por ácido salicílico y ácido jasmónico (Tomado y adaptado de Harman *et al.*, 2004; Pieterse *et al.*, 2009). La vía del SA se induce por la presencia de patógenos biótrofos y da por resultado la inducción de proteínas de defensa como las PR. Mientras que los patógenos necrótrofos o las heridas llevan a la inducción de un compuesto volátil el ácido jasmónico, el cual activa las defensas de la planta vía MAPK.

Estudios recientes muestran que *Trichoderma/Hypocrea* (Figura 6) libera diferentes compuestos que disparan la resistencia sistémica de la planta, tales como la cerato-platanina Sm1 y los peptaibols que inducen una respuesta sistémica, la cual culmina con la síntesis de enzimas como la hidroxiperóxido liasa, peroxidasa y la fenilalanina amonio liasa (inductoras de lignificación). Además, las xilanasas liberadas por el hongo activan la defensa de la planta, probablemente porque actúan como patrones moleculares asociados a microorganismos.

La 1-aminociclopropano-1 carboxilato desaminasa (AAC) inhibe la formación del etileno por la planta, lo que lleva a un aumento del crecimiento radicular. Por su parte, las nitrilasas que son secretadas constitutivamente, ayudan a la formación de la auxina ácido-3-indolacético (IAA). Mientras que las hidrofobinas y swolleninas secretadas por *Hypocrea/Trichoderma* permiten su adherencia a las raíces de la planta, y que de esta forma el microorganismo se beneficie por la toma de sacarosa como fuente de carbono. De igual manera, la nematofagia de este hongo involucra la secreción de diferentes compuestos como las quitinasas y las proteasas (Druzhinina *et al.*, 2011).

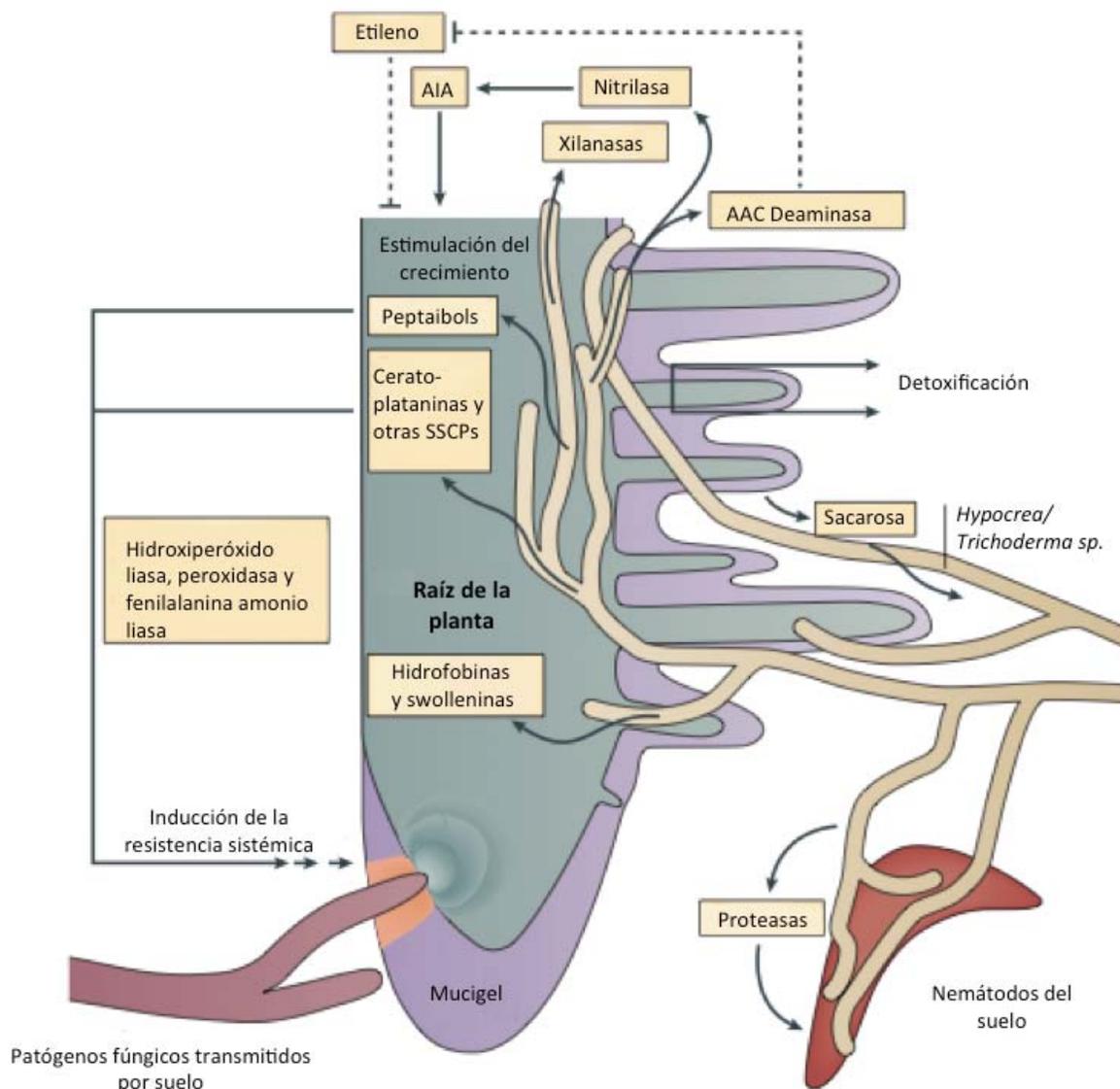


Figura 6.- Interacciones de *Hypocrea/Trichoderma* con otros organismos en la rizósfera (Tomado y adaptado de Druzhinina *et al.*, 2011).



III.5 *Trichoderma* y su interacción en Maíz

En los últimos años se ha investigado el efecto de *Trichoderma* sobre el maíz, encontrándose los siguientes efectos: mayor control de patógenos de raíz y tejido foliar; cambio en la composición de la microflora en las raíces, aumento en la solubilidad de nutrientes del suelo durante la toma de estos; incremento en el desarrollo de raíz, en la formación de raíces secundarias y enraizamiento profundo (Harman, 2006).

Trichoderma es efectivo en un gran número de especies de plantas, donde al parecer la carga genética no es un factor relevante para la interacción (Harman, 2006), a diferencia del maíz en el cual si lo es, ya que se ha observado que algunas líneas híbridas de maíz, muestran una reducción en el crecimiento cuando son tratadas con la cepa de *Trichoderma harzianum* T-22 (Harman *et al.*, 2004), mientras que otras líneas, como la Mol 17, expresan aumento en el crecimiento de raíces, brotes y menor daño foliar al ser tratadas previamente con *T. harzianum* T-22 y subsecuentemente retadas con el patógeno *Colletotrichum graminicola* (Harman *et al.*, 2004).



IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, en diferentes partes del mundo se está utilizando el enfoque ecológico en el que se emplea antagonistas fúngicos seleccionados contra patógenos contaminantes de semillas, en lugar del control químico (Lorito *et al.*, 2010; Rice Knowledge Bank, 2011). En el caso particular de *Trichoderma*, se inocula en las semillas por el método denominado de biopriming, el cual es un proceso que combina la hidratación de la semilla, y la inoculación con un organismo benéfico para protegerla de organismos patógenos.

Existe abundante información a nivel fisiológico y a nivel de campo de los beneficios del *biopriming* con *Trichoderma spp.* y su subsecuente desafío con un patógeno (Benítez, *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Por ejemplo, la inoculación de las raíces de plántulas de maíz con *T. harzianum* T-22 induce una respuesta de defensa no solo en las raíces mismas sino también en las hojas, encontrándose resistencia a la infección por *Colletotrichum graminicola* en hojas de plántulas. (Harman *et al.*, 2004). Las plantas de maíz tratadas con *Trichoderma* previa a la exposición al patógeno *Fusarium moniliforme* reducen la producción de fumonisinas por este (Bacon *et al.*, 2001).

Molecularmente se tiene poca información acerca del mecanismo de defensa que presentan las plantas que han sido tratada con un microorganismo biocontrol, como lo es *Trichoderma*, y subsecuente retadas por un organismo patógeno, aunque se ha propuesto que *Trichoderma spp.* enciende la resistencia sistémica adquirida e inducida en las plantas (SAR e ISR), ya que los niveles de ácido salicílico, ácido jasmónico, óxido nítrico y etileno aumentan y hay un cambio importante en los flujos de iones como el calcio, así como la activación de cascadas de señalización dependientes de la activación de las MAPK (Figura 7). Adicional al efecto en la planta, *Trichoderma* produce compuestos antimicrobianos que ayudan a la planta ante la invasión de estos (Lodha y Basak, 2011; Ping, *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008).

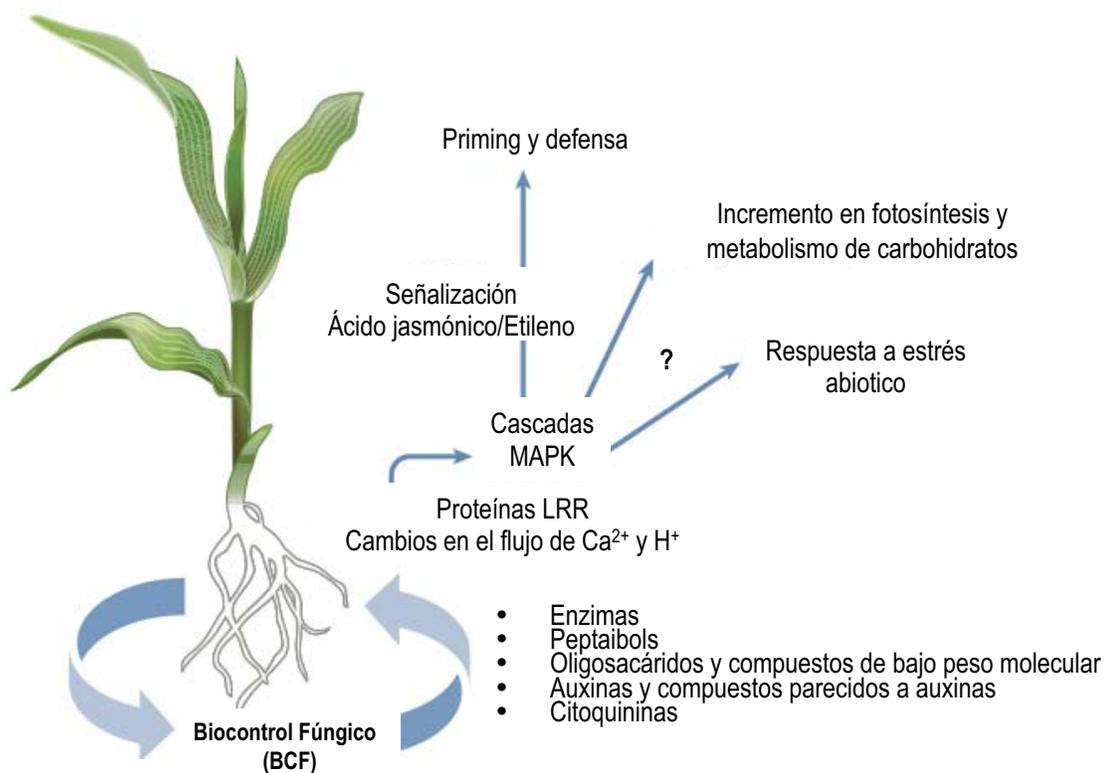


Figura 7.-Efecto de hongos usados como biocontrol en las plantas (Tomado y adaptado de Shores et al., 2010).

Por lo tanto, el biocontrol de alguna manera impacta en la expresión génica de la planta, resultando en una alteración de las respuestas de la planta ante su ambiente, y con beneficios como: incremento en el crecimiento, resistencia sistémica a enfermedades, mejora del uso del nitrógeno y aumento en la calidad de las semillas (Harman, 2011). De manera interesante, en los últimos años se ha identificado que estos efectos son similares a los activados por las rizobacterias (Harman et al., 2004).

En cuanto al hongo *Fusarium*, Alessandra y colaboradores en el 2010, investigaron el efecto de la infección de *Fusarium verticillioides* en maíz usando la técnica de microarreglos en dos líneas de maíz, una con una alta resistencia y otra susceptible a la infección por *Fusarium verticillioides*. Los autores encontraron que a las 48 h de la infección en la línea de maíz resistente, disminuye la expresión de



genes asociados al ciclo celular y al procesamiento del DNA, al igual que los genes relacionados con el metabolismo, todo lo anterior ocurre de manera opuesta en la línea sensible al hongo. Sin embargo, en ambas plantas aumentan aquellos genes que están vinculados al rescate y defensa de la planta (Alessandra *et al.*, 2010).

A pesar del estudio que se tiene de las interacciones planta-patógeno y planta-*Trichoderma spp*, poco se sabe acerca de los genes que se modulan cuando en el sistema se tiene una interacción múltiple como *Trichoderma-maíz-Fusarium*, por lo que se desconoce cuál es el mecanismo de defensa preferente que ayuda a la célula vegetal a su sobrevivencia.

Por lo anterior, este trabajo pretende dar información sobre si la ISR es una de las respuestas de defensa que se encienden cuando las plántulas de maíz han sido previamente inoculadas con *Trichoderma* (*biopriming*), y si cambia cuando las plantas son expuestas al hongo *Fusarium verticillioides*.



V. HIPÓTESIS

Trichoderma asperellum como un organismo biocontrol de patógenos, reducirá los efectos negativos producidos por *Fusarium verticillioides*, al inducir una respuesta adelantada de los genes defensa tipo ISR en las plántulas de maíz.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar si el *biopriming* con *Trichoderma asperellum* reduce los efectos negativos de la post-infección con *Fusarium verticillioides* en las plantas de maíz al inducir la expresión de genes de respuesta tipo ISR.

Objetivos Particulares

- 1.- Establecer el protocolo de *biopriming* de las semillas de maíz con *T. asperellum* y de la post-infección de las plántulas con *F. verticillioides*.
- 2.- Evaluar el efecto fisiológico de *Trichoderma* sobre la germinación y el desarrollo de las plántulas de maíz.
- 3.- Determinar si el *biopriming* con *T. asperellum* protege a las plántulas de maíz del ataque por el patógeno *Fusarium verticillioides*.
- 4.- Cuantificar los niveles de expresión de los genes relacionados con la defensa tipo SAR e ISR en las plantas sometidas a *biopriming* (PR, PAL, AOS, AOC y OPR).
- 5.- Comparar los niveles de expresión de los genes relacionados con la defensa tipo SAR e ISR entre las plántulas con *biopriming* y las no tratadas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El esquema de trabajo que se siguió se muestra en la Figura 8, las metodologías se encuentran descritas a detalle a continuación. Los pasos de optimización no se encuentran descritos con detalle pero se encuentran citados en las metodologías finales con comentarios a los cambios que se realizaron.

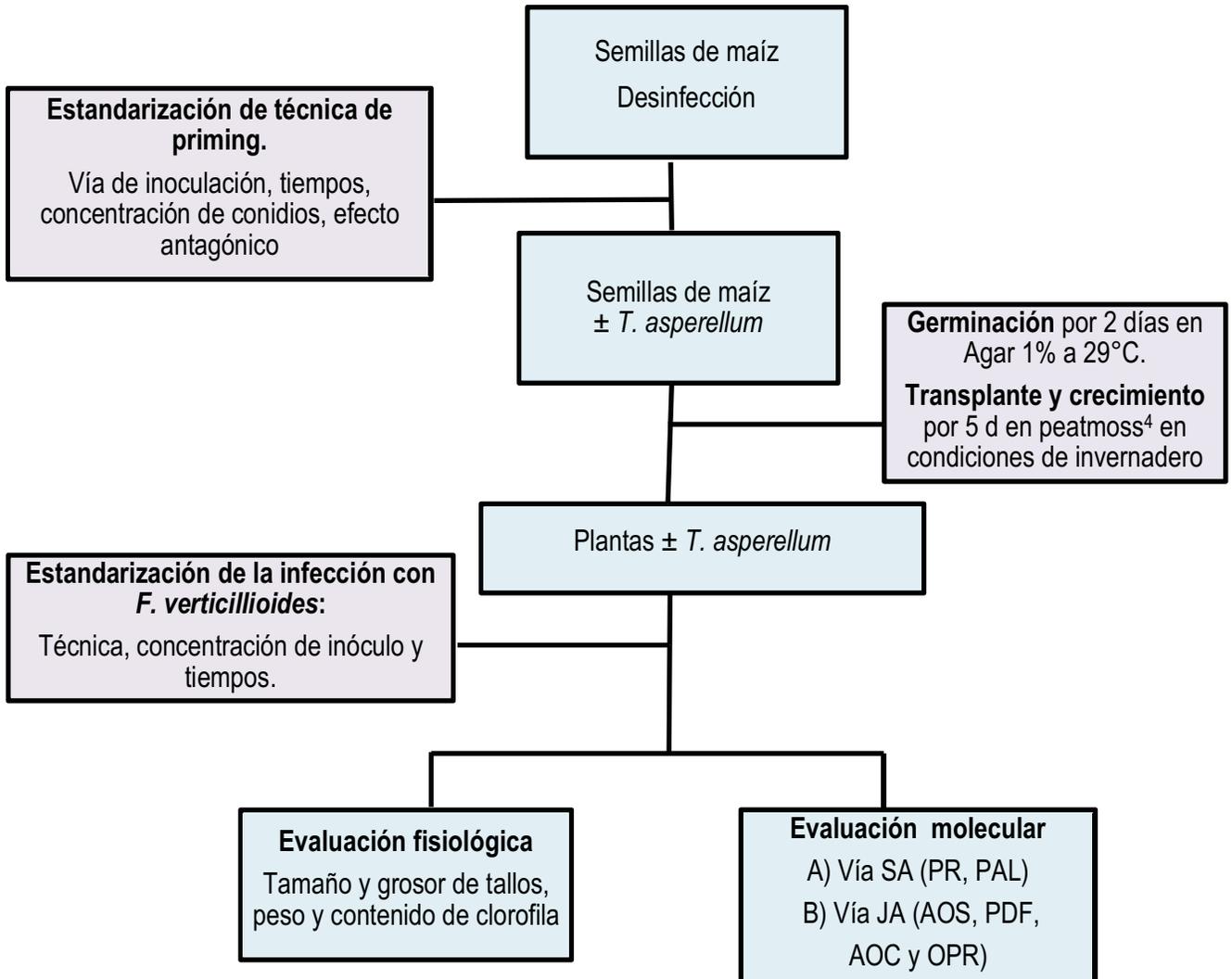


Figura 8.- Esquema general del trabajo experimental. Se germinaron semillas en ausencia o presencia de *Trichoderma* (biopriming) por 2 días en Agar al 1%, después se sembraron en tierra y se mantuvieron en condiciones de invernadero por 5 días. Posteriormente se inocularon conidios de *Fusarium verticillioides* a través de una herida por debajo del primer nodo. Se realizó la evaluación fisiológica y se obtuvieron las hojas a partir del día 1 y hasta 6 días después, a estas se les extrajo el RNA y se midió por PCR la expresión de los genes de defensa. ±= Con(+) o sin (-) *T.asperellum*.

⁴Peatmoss: Turba (material orgánico, de color pardo oscuro y rico en carbono) con propiedades de absorción del agua y de retención de los elementos nutritivos.



Ensayos de antagonismo entre microorganismos fúngicos y calibración de inóculos.

VII.1 Preparación y calibración del inóculo de *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*

En condiciones de esterilidad, se agregó 5.0 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *Trichoderma asperellum* o de *Fusarium verticillioides* (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005) de dos semanas de crecimiento (cepas proporcionadas por el Dr. José Luis Hernández Mendoza y el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra respectivamente), los cuales se encontraban en una caja Petri cultivados en Papa Dextrosa Agar (PDA) al 1.0X. Posteriormente, la caja se colocó en agitación constante y moderada por 30 min a temperatura ambiente. Se recolectó la “suspensión de conidios” en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL y se centrifugaron a 13000 rpm, por 15 min a 4°C en una centrífuga Universal 320 R Heittich Zentrifugen.

Se desechó tres cuartas partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones obtenidos, se mezclaron las suspensiones de los botones en un solo tubo eppendorf aforándolo a 1.5 mL. Nuevamente, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de agua estéril desionizada, obteniéndose así una *suspensión concentrada de conidios*.

Cuantificación de conidios. En un tubo eppendorf, estéril de 1.5 mL, se agregó 990.0 μ L del agua estéril desionizada y 10 μ L de la suspensión concentrada de conidios, dilución 1:100, de la cual se tomó 10 μ L para cargar la Cámara de Neubauer y realizar el conteo de conidios usando un microscopio óptico Olympus CH30 (Véase Anexo I). Con los datos obtenidos del conteo, se calculó el volumen necesario de la suspensión concentrada de conidios que se necesitaba para preparar un inóculo a una concentración dada.



Mantenimiento de los hongos. Se sembraron 10 μL de la suspensión concentrada de conidios en cajas Petri con PDA 1.0X (Véase Anexo II), y todo el material que estuvo en contacto con los hongos se dejó en hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) por una noche.

VII.2 Ensayo de cultivo dual.

Se inocularon 10 μL de *Trichoderma asperellum* o *Fusarium verticillioides* (inóculo calibrado a 1×10^6 conidios/mL) en PDA 1X que se encontraba en una caja Petri de 10 cm de diámetro. Se incubaron a temperatura ambiente por 2 semanas. Al concluir la incubación se cortó un disco del medio de cultivo con hongo de 1 cm de diámetro y una altura de 0.83 cm.

En una caja Petri de 10 cm de diámetro con medio PDA 1X se colocó el disco de PDA 1X del cultivo de *Trichoderma asperellum*, y a una distancia de 2.5 cm se colocó otro disco de PDA, bajo las mismas características, pero que contenía un cultivo de *Fusarium verticillioides*.

Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente, se midieron los diámetros de los halos de inhibición, y se compararon con los halos control, los cuales fueron obtenidos de cajas de PDA 1X que solamente contenían un disco de PDA 1X de un solo cultivo, con las mismas condiciones antes descritas. El porcentaje de inhibición se obtuvo utilizando la siguiente ecuación:

$$\% I = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Donde:

% I = Porcentaje de inhibición.

C= Diámetro del halo de crecimiento del microorganismo (Control)

T = Diámetro del halo de inhibición del microorganismo (Cultivo dual)

VII.3 Relación de conidiación entre *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*.

Se colocó dentro de una caja Petri con PDA 1X, 10 μL de una suspensión de conidios de *Trichoderma asperellum* a una concentración de 1×10^6 conidios/mL, y a 2 cm aproximadamente de distancia 10 μL de una suspensión de conidios de *F. verticillioides* a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Después de 72 h de crecimiento a temperatura ambiente, según se describió anteriormente, se extrajeron y contabilizaron los conidios de ambos hongos, basándose en la morfología fusiforme de los microconidios de *Fusarium verticillioides* y en la forma esférica de los conidios de *Trichoderma asperellum* (Figura 9). El ensayo se repitió utilizando una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^6 conidios/mL para ambos microorganismos.

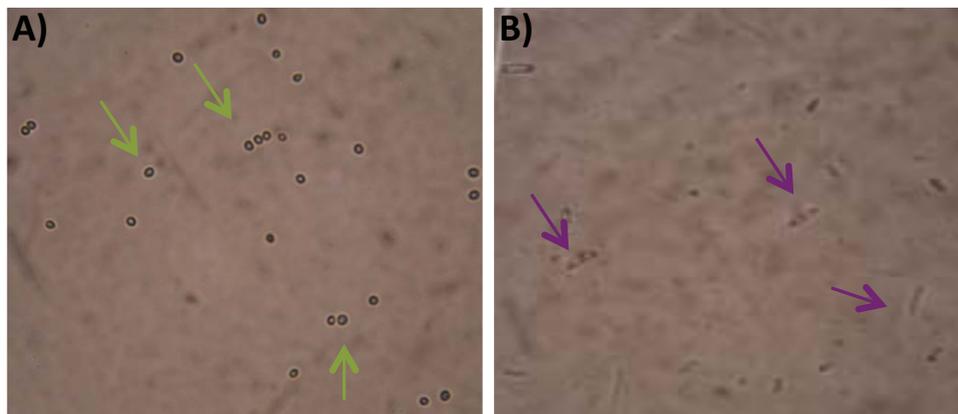


Figura 9.- Conidios de *T. asperellum* y *F. verticillioides*. A) Conidios esféricos de *Trichoderma asperellum* (flecha verde). B) Conidios fusiformes de *Fusarium verticillioides* (flecha morada) vistos a X40 en un microscópio óptico Olympus CH30 a una concentración de 1×10^6 conidios/mL en ambos casos.



VII.4 Infección de las semillas de maíz Chalqueño por parte de los microorganismos fúngicos.

Desinfección de semillas de maíz y prueba de fitosanidad.- Lotes de 10 semillas se lavaron con una solución de NaClO al 2.0% (Cloralex) por 2 min, y se enjuagaron al menos 5 veces con 200 mL de agua estéril desionizada, hasta que el olor del hipoclorito de sodio desapareció. Se colocaron en cajas Petri con PDA 1X, usando como control negativo 10 semillas enjuagadas con 500 mL de agua estéril desionizada.

Capacidad de organismos fúngicos para infectar las semillas.- Se colocaron en 1% Agar 10 semillas de maíz previamente desinfectadas y se inocularon con 10 μ L de una suspensión de conidios de *Trichoderma asperellum* a una concentración de 5×10^7 conidios/mL. Posteriormente, la caja se incubó en obscuridad a 29°C por 72 h. Asimismo, se realizó el ensayo pero usando a *Fusarium verticillioides*.

VII.4.1 Biopriming de semillas de maíz.

Montaje de la metodología de *biopriming* de las semillas de maíz con *T. asperellum*

Se probaron dos diferentes tipos de metodologías: A) Inoculación directa de cada semilla y B) Agitación de las semillas con agua adicionada con una concentración conocida de conidios de *Trichoderma*. En esta última condición se realizaron varios ensayos como se muestra en la Tabla 3. Después del tratamiento las semillas se germinaron en cajas Petri con Agar al 1% a 29°C y se evaluó por inspección visual el efecto de *Trichoderma* durante la germinación de las semillas.



Tipo de maíz	Nº de Semillas	H ₂ O (mL)	Concentración final <i>T. asperellum</i> (conidios/mL)	Agitación rotatoria (h)	Observaciones
Chalqueño	10	20	1x10 ⁸ 5x10 ⁷ 25x10 ⁶	2	A partir de las 24 h se observó invasión y necrosis del tejido por parte de <i>T. asperellum</i> .
Chalqueño	10	10	1x10 ⁷ * 1x10 ⁶ * 1x10 ⁵ * 1x10 ⁴ *	1.5	A la concentración más baja de conidios parece haber un efecto benéfico por <i>Trichoderma</i> en el maíz chalqueño y amarillo 1
Amarillo 1	10				
Amarillo 2	10				
Negro	10				
Cacahuazintle	10				
Chalqueño	100	100	1x10 ⁴	1.5	No se observó efecto benéfico de <i>T. asperellum</i>
Amarillo 1	100	100	1x10 ⁴		
Chalqueño	100	100	1x10 ³	1.5	Se observó un efecto benéfico de <i>T. asperellum</i> en la germinación del maíz chalqueño

Tabla 3.- Condiciones de bioprimering de las semillas de maíz con *T. asperellum*.

*Concentraciones usadas para cada tipo maíz probado.

Las condiciones finales después de las pruebas fueron las siguientes:

Priming y germinación.- Para las semillas control se colocaron 200 semillas previamente desinfectadas en un matraz erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de agua estéril desionizada, se colocó el matraz en agitación constante por 1.5 h en un agitador Lab-Line Orbit. Después, las semillas se germinaron en cajas Petri de vidrio de 20 cm de diámetro, con Agar al 1.0% (25 semillas por caja) a 29°C en oscuridad por 48 h, utilizando para ello la incubadora Incubator Lab-Line. Para las 200 semillas de maíz tratadas con *Trichoderma asperillum*, se repitió el procedimiento antes descrito, salvo que previo a la agitación, se inocularon con la suspensión de conidios de *Trichoderma* para obtener una concentración final de 1x10³ conidios/mL. Al concluir las 48 h de germinación las semillas se transplantaron a tierra.

Transplante a tierra.- Cada semilla germinada se colocó en macetas que contenían 150 g de Peat Most y se regaron solamente con 50 mL de agua estéril desionizada cada tercer día, debido a que no fue necesario suplementar con algún medio, ya que las plántulas que se utilizarán en los ensayos tiene a lo más 14 días de edad.



VII.4.2 Establecimiento del proceso de infección de las plántulas de maíz con *Fusarium verticillioides*.

Se probaron 3 formas distintas de inocular a *F. verticillioides* en las plántulas de maíz según se resume en la tabla 4.

Tejido inoculado	Forma de inoculación	Concentración de conidios/ μ L	Observaciones
Hojas Tallos	Discos de PDA 1X con <i>F. verticillioides</i> sobre el tejido.	1×10^6	No se logró inocular ningún tejido con el patógeno. El disco solamente se deshidrata.
Hojas Tallos	Adición sobre el tejido de una suspensión en agua de <i>F. verticillioides</i>	1×10^6	No se logró establecer la infección pues el inóculo resbaló.
Tallo (debajo de la 1er hoja)	Herida de 1.2 cm inoculada con 10 μ L de una suspensión en agua de <i>Fusarium</i>	1×10^9	Las plantas se lograron infectar, sin embargo no crecen, ya que el inóculo es demasiado. Además se observaron rasgadas las hojas, debido al probable daño mecánico durante la inoculación
Tallo (debajo del 1er nodo)	Herida de 0.6 cm inoculada con 10 μ L de una suspensión en agua de <i>Fusarium</i>	3500 6500 9500	Bajo estas condiciones se logró establecer una vía de infección sin dañar las hojas. El inóculo fue adecuado para observar la infección.

Tabla 4.- Condiciones probadas de inoculación de *F. verticillioides* y su efecto en la planta.

Las condiciones finales de infección fueron:

A plántulas de 7 días de crecimiento se les realizó una herida vertical de 0.6 cm en la parte inferior del primer nodo del tallo, para posteriormente inocular con 10 μ L de una suspensión de conidios de *Fusarium verticillioides* (Fv) previamente calibrada (6500 conidios/ μ L). A los 1, 2, 4, 5 y 6 días post infección (Dpi) con el patógeno se recolectaron y pesaron las hojas, se congelaron con N₂ líquido y fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.



Se utilizaron dos controles en el experimento, uno en donde a las plántulas se les inoculó H₂O en lugar de hongo, por lo que se realizó la herida (Herida) y otro donde no se les sometió a ningún tipo tratamiento (Sin Herida). En la Tabla 5 se ilustran las diferentes combinaciones utilizadas.

Plántula Semilla	Sin Herida (SH)	Herida (H)	<i>Fusarium verticillioides</i> (Fv)
Sin <i>Trichoderma</i> (Control)	C-SH	C-H	C-Fv
Con <i>Trichoderma</i> (Tratadas)	T-SH	T-H	T-Fv

Tabla 5.- Combinaciones en los tratamientos empleados. Fueron utilizadas lotes de 180 plántulas para los 6 tratamientos que se observan en la tabla.

VII.5 Efecto de *T. asperellum* y *F. verticillioides* sobre el crecimiento de plántulas de maíz.

Lotes de 180 plántulas de 7 días de crecimiento (30 por cada tratamiento que se encuentra en la Tabla 5) se inocularon con una suspensión de conidios de *Fusarium verticillioides* de 6500 conidios/ μ L, con H₂O, o no se trataron. Posteriormente se tomaron muestras o se realizaron observaciones a los 1, 2, 4, 5 y 6 Dpi. A las plántulas se les realizaron los siguientes ensayos:

Tamaño de la parte aérea.- Se midió la longitud desde la punta de la última hoja hasta la parte del coleóptilo próxima a la semilla utilizando una regla. El experimento se realizó por duplicado.

Grosor de tallos.- Utilizando un vernier, se midió el grosor del tallo inmediato a la primera hoja de cada plántula de maíz, y el experimento se realizó por duplicado.



Cuantificación relativa de clorofila.- Se tomó la primera hoja de cada plántula de un lote de 5 plántulas por tratamiento y se determinó en diversas partes de esta el contenido de clorofila mediante un medidor de clorofila de la marca Minolta Spad-502.

VII.6 Análisis de genes de defensa

VII.6.1 Extracción de RNA de tejido foliar.

Las condiciones del material y las soluciones se encuentran descritas en el anexo 3. Se tomó de cada tratamiento la parte aérea de 5 plántulas, las cuales se molieron con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino, se pesaron 500 mg del polvo y se colocaron en un mortero esterilizado por 1 h en autoclave, y trabajando en condiciones de asepsia, se le agregó 3 mL del reactivo de Trizol/ g de tejido, se incubó a temperatura ambiente por 5 min hasta obtener una mezcla líquida y homogénea. La mezcla se transvasó a un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 2 mL previamente enfriado, se le agregó 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 15 s, luego se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, la fase acuosa resultante se colocó en otro tubo frío de 2 mL, se le añadieron 400 µL de CHCl₃ y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL y se repitió el paso de extracción con CHCl₃. Al sobrenadante obtenido se le agregó 1 volumen de isopropanol, se agitó por inversión, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 10 min bajo las mismas condiciones antes descritas. El sobrenadante se decantó, y el botón se lavó con 1 mL de EtOH al 70% golpeando suavemente el tubo (el botón no se resuspende). Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4°C, al finalizar el tiempo se descartó el sobrenadante y dejando destapado el tubo, el botón se secó a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez seco el botón, se le agregó 500 µL de H₂O-DEPC y 167 µL de LiCl 8M ([LiCl]_{final}= 2M) y se dejó incubando por una noche a 4°C. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se desechó



y el botón se disolvió en 250 μL de H_2O -DEPC, agregándose además 500 μL de EtOH absoluto frío y 25 μL de CH_3COONa 3 M y se incubó a -70°C por una noche. La muestra se centrifugó 13000 rpm por 20 min a 4°C , el sobrenadante se descartó y el botón se lavó con 1 mL de EtOH al 70%. El botón se centrifugó por 1 min a 13000 rpm a la temperatura antes descrita. El lavado con EtOH al 70% se repitió una vez más, y el botón se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el botón se resuspendió en 40 μL de H_2O -DEPC y se almacenó la muestra de RNA total a -70°C .

Visualización del RNA en gel de agarosa.- Se cuantificaron 1.5 μL de una dilución de RNA 1:40 en un NanoDrop de la marca Thermo Scientific, modelo 2000. Se calculó el volumen de RNA que era necesario para tener 1 μg de RNA, se mezcló con 2 μL de amortiguador de carga y H_2O -DEPC c.b.p. 7.0 μL , posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 3 % con amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X y bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, para ello se usó una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT con amortiguador TAE 1X frío, a 90 mV (fuente Hoeffer EPS2A200) por 30 min. El RNA se visualizó en un transiluminador de UV y posteriormente las imágenes se capturaron con el equipo KODAK Image Station, modelo 400R-PRO.

VII.6.2 Reacción de RT-PCR punto final (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa punto final) y densitometría.

Para obtener el perfil de los transcritos de genes involucrados en la respuesta de defensa de la planta, se corrieron geles de agarosa al 3 % con las muestras de RNA de todos los tratamientos realizados. Se ajustaron los volúmenes empleados de RNA cuando fue necesario, para asegurar que la cantidad de RNA que se utilizaba en la producción de cDNA era la misma en todos los tratamientos.

Reacción de Transcriptasa Reversa (RT).-La reacción se efectuó agregando en un tubo eppendorf 1 μL de Oligo dT (62 μM), el volumen de RNA ajustado



previamente y H₂O-DEPC c.b.p. 10 µL. Posteriormente, este tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo se colocó en hielo por 5 min y se le agregó 10 µL de la mezcla preparada (Tabla 6), luego se calentó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento, después a 42° por 1 h, y finalmente, para inactivar a la enzima se calentó a 70°C durante 15 min, utilizando un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied biosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Reactivo	Volumen (µL)
Amortiguador ImProm-II 5X	4.0
MgCl ₂ 25mM	2.4
dNTP's 10mM	1.0
TR (Transcriptasa reversa)	1.0
H ₂ O-DPC	1.6 (c.b.p.10µL)

Tabla 6.- Mezcla de reacción de RT

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL con los componentes que se muestran en la Tabla 7.

Reactivo	PRms (µL)	PAL (µL)	PDF (µL)	AOS (µL)
PCR Master Mix 2X	12.5	12.5	12.5	12.5
Oligonucleótido Sentido	0.25	0.125	0.25	0.375
Oligonucleótido Antisentido	0.25	0.125	0.25	0.375
cDNA	1.0	1.0	1.0	1.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 25µL)	11.0	11.25	11.0	10.75

Tabla 7.-Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de PCR para los cuatro pares de oligonucleótidos empleados.



La técnica de PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 8.

Condición	PR	PAL	PDF	AOS
Pre-desnaturalización	94 °C por 5min			
Alineamiento				
Desnaturalización	94°C por 40s	94°C por 40s	94°C por 40s	94°C por 40s
Templado	57 °C por 40s	57 °C por 40s	58 °C por 40s	55 °C por 40s
Extensión	72°C por 40s	72°C por 40s	72°C por 40s	72°C por 40s
No de ciclos	26 ciclos	33 ciclos	34 ciclos	26 ciclos
Extensión Final	72 °C por 7 min			

Tabla 8.- Condiciones empleadas en la realización de la reacción de PCR para la amplificación de los transcritos PR, PAL, PDF y AOS.

A los 25 µL de producto amplificado se les agregó 2.0 µL de amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega, se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5% con amortiguador TAE 1X, bromuro de etidio 0.5 µL/mL y usando TAE 1X como amortiguador de corrida. Asimismo, se corrió en el mismo gel un marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas) al que también se le agregaron 2.0 µL del amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega y 4 µL de agua estéril desionizada. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de UV, posteriormente las imágenes se capturaron con el equipo KODAK Image Station, modelo 400R-PRO.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño (Pb)	Concentración
PR	Sentido	5'-AGA GAA GTA CGC CGC ACA GA-3'.	196	0.2 µM
	Antisentido	5'-GTA GTG GCC ACA CAC CTT GC-3'.		
PAL	Sentido	5'-GAG GAG TGC AAC AAG GTG TTC-3'.	297	0.1 µM
	Antisentido	5'-CAG GGC ACA GCT ACA CAA AA-3'.		
PDF	Sentido	5'-GCT TCA AGG GAC CTT GCT C-3'.	337	0.2 µM
	Antisentido	5'-AAA CGC GCC ATA GAG TTC AT-3'.		
AOS	Sentido	5'-AGC TCC AGT CCT TCT TCG TA-3'.	238	0.3 µM
	Antisentido	5'-ACT CGA AGT ACT TGT CCT GC-3'.		

Tabla 9.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de PR, PAL, PDF y AOS.



Los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar los transcritos por la técnica de PCR punto final corresponden a las proteínas relacionadas con la patogénesis en maíz tipo 1 (PR), la fenilalanina amonio liasa (PAL), la aleno oxido sintasa (AOS) y la defensina de planta (PDF) y fueron proporcionados por el Dr. Javier Plasencia de la Parra, las secuencias aparecen en la Tabla 9.

VII.6.3 Reacción de qRT-PCR (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Con base en los perfiles de expresión que se obtuvieron en la curva de *priming*, se decidió cuantificar por tiempo real los transcritos de plántulas de 1 y 4 Dpi, ya que en estos se observaron tendencias interesantes de aumentos y disminuciones en la expresión de los transcritos.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño (Pb)	Concentración final en la mezcla de reacción
PR NM_001159109.1	Sentido	5'-GGCCACTACACCCAGATCAT -3'.	200	150nM
	Antisentido	5'-TGGGACAGCAAGAGACACAG -3'.		
PAL NM_001254868.1	Sentido	5'-CATGTCGTCCACCTACATCG -3'.	171	150nM
	Antisentido	5'-ATCAGCTCCTTCTCGCTGAA -3'.		
AOS NM_001111774.1	Sentido	5'-GTGGACGTGACAGAGTGTC -3'.	152	150nM
	Antisentido	5'-CAACATGCCATCCTGCATTA-3'.		
AOC Ankala <i>et al.</i> , 2013	Sentido	5'-GCTACGAGGCCATCTACAGC -3'.	160	150nM
	Antisentido	5'-GGGAAGACGATCTGGTTGAG -3'.		
OPR Ankala <i>et al.</i> , 2013	Sentido	5'-TATATCAGCCGGGTGGTTCT-3'.	184	150nM
	Antisentido	5'-CCTGCTTTGATGGCGTTTAT-3'.		
UBQ (Endógeno) Zhang <i>et al.</i> ,2012	Sentido	5'-ATCTTTGTGAAGACCTCAC-3'.	216	150nM
	Antisentido	5'-CCTAAGGCGCAGCACCAAGT-3'.		

Tabla 10.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de PR, PAL, AOS, AOC y OPR de maíz en tiempo real.



Se realizó la estandarización de la técnica de qRT-PCR que consistió en: 1) Evaluar la especificidad de la reacción (véase *anexo 4*), y 2) Establecer la eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad del método (véase *anexo 4*). Para ello se utilizaron nuevos oligonucleótidos con las siguientes características: amplicones de 50 a 200 pb, un contenido de GC de 40-60%, 18-30 nucleótidos de longitud, se buscó evitar la complementariedad de secuencias entre los oligonucleótidos, además de verificar que entre el par de nucleótidos no se formaran estructuras secundarias. Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron empleando el programa Primer3PLUS (Tabla 10), y se utilizó como gen endógeno a la ubiquitina (UBQ) (véase *anexo 3*).

La reacción de q-PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L con los componentes que se muestran en la Tabla 11.

Reactivo	PR (μ L)	PAL (μ L)	AOS (μ L)	AOC (μ L)	OPR (μ L)	UBQ (μ L)
SYB Green PCR Master Mix	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Oligonucleótido Sentido	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Oligonucleótido Antisentido	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
cDNA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 20 μ L)	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7

Tabla 11.-Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de q-PCR para los 6 pares de oligonucleótidos empleados.



La técnica de q-PCR se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y el análisis de los resultados se efectuó con el software ABI PRISM 7000 SDS. Posteriormente se empleó el Método Comparativo Ct para realizar la cuantificación relativa, usando para ello la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra de interés} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

Entiéndase como *Ct* al número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado, *muestra de interés* al templado proveniente del organismo bajo las condiciones de estudio establecidas, y al *calibrador* como la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales deseamos comparar las diferencias de expresión. En este ensayo se utilizó como calibrador a las plántulas de 1 Dpi C-SH y a las de 4 Dpi C-SH.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Prueba de fitosanidad e infección de las semillas de maíz Chalqueño

Se germinaron semillas de maíz Chalqueño en PDA 1X para verificar la efectividad del método de desinfección de semillas, y de esta manera eliminar la presencia de microorganismo fúngicos contaminantes (Figura 10). Los resultados obtenidos mostraron que la desinfección mediante el lavado de hipoclorito de sodio al 2.0% fue suficiente para eliminar los microorganismos contaminantes (Figura 10A).



Figura 10.- Prueba de Fitosanidad. Semillas de maíz de 48 h de germinación en PDA 1X A) lavadas con una solución de NaClO (Cloralex) al 2% y B) con agua estéril desionizada. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Asimismo, se evaluó la capacidad de infección de los hongos *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum* en las semillas de maíz Chalqueño. Se observó que tanto *T. asperellum* como *F. verticillioides* fueron capaces de colonizar las semillas de maíz cuando estas son inoculadas a una concentración

de 5×10^7 conidios/mL, ya que se detectó crecimiento de micelio aéreo en las semillas que fueron tratadas con uno u otro hongo (Figura 11).

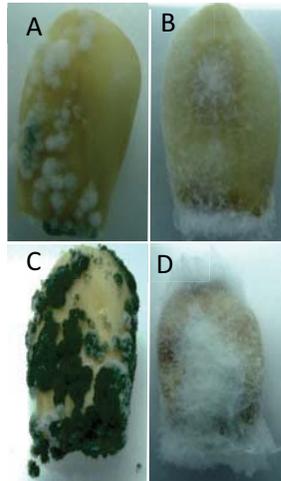


Figura 11.-Semillas de maíz chaqueño infectadas por dos microorganismos fúngicos. A y C) Semillas de maíz infectadas con *Trichoderma asperellum* y con *Fusarium verticillioides* (B y D) a una concentración de 5×10^7 conidios/mL en ambos casos. Las imágenes fueron tomadas a las 24 h de germinación (A y B) y después de 48 h de germinación (C y D). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

VIII.2 Efecto antagónico entre *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*.

Con el fin de verificar que la cepa de *Trichoderma asperellum* efectivamente presentaba un efecto antagonista frente a *Fusarium verticillioides*, ambos microorganismos se colocaron en cajas con PDA 1X. A partir del día 1 de incubación a temperatura ambiente (Figura 12), el crecimiento de *Trichoderma asperellum* fue mayor respecto al patógeno, sin importar si ambos microorganismos partían de una misma concentración de conidios (Figura 12 A-C), o si la concentración inicial de conidios de *Fusarium verticillioides* era mayor

respecto al del antagonista (Figura 12 D-F). Al realizarse el conteo de conidios en las cajas de 3 días de incubación, se obtuvo que independientemente de la concentración de conidios iniciales, había 38.63×10^8 conidios/ mL del antagonista contra 3.95×10^8 conidios/ mL de *Fusarium verticillioides*, lo que nos dio una relación de 10:1, *Trichoderma asperellum*:*Fusarium verticillioides*. Lo anterior indicó que *Trichoderma asperellum* fue capaz de crecer a un ritmo acelerado aún con la presencia de *F. verticillioides* en la misma caja.

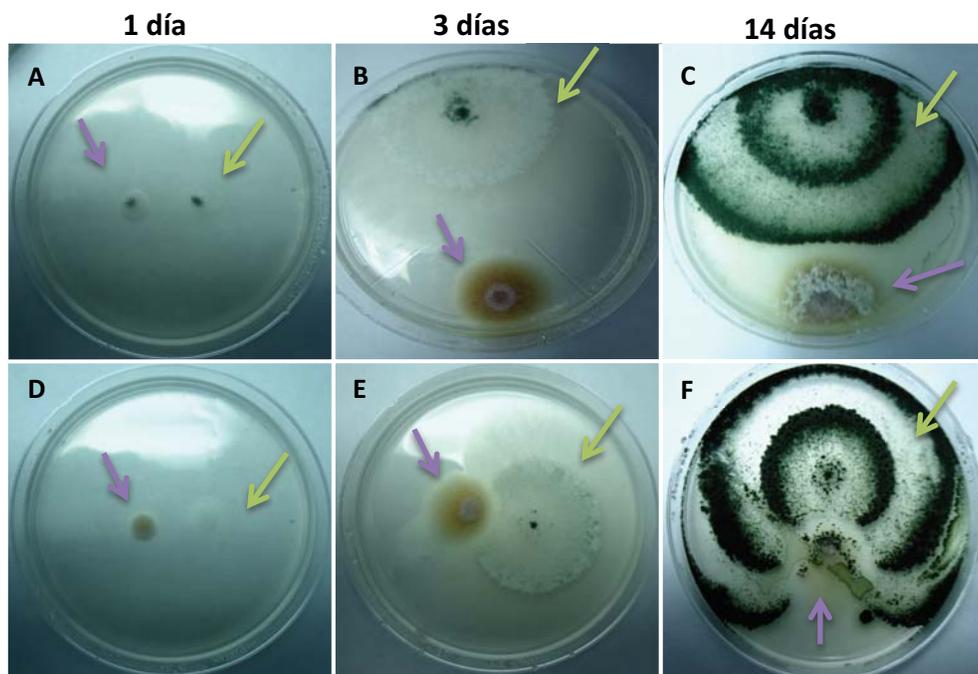


Figura 12.- Efecto antagonista de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium verticillioides*. A-C) *T.asperellum* (flecha verde) y *F. verticillioides* (flecha morada) en una concentración inicial de 1×10^6 conidios/ mL. D-F) *T.asperellum* con una concentración inicial de 1×10^6 conidios/ mL y *F. verticillioides* con una concentración de partida de 1×10^8 conidios/ mL. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Otra forma de determinar el efecto antagonista de *T. asperellum* fue mediante un **ensayo de cultivo dual** (Figura 13), en donde se emplearon discos simétricos y similares de PDA 1X inoculados con el hongo. Se midió el diámetro de inhibición

de crecimiento y se detectó que *Fusarium verticillioides* presentó una reducción en su desarrollo del $37.5 \pm 1.7\%$ respecto al antagonista, mientras que *Trichoderma asperellum* exhibió un porcentaje inhibitorio de $1.43\% \pm 0.15\%$ respecto al patógeno, lo cual nos indicó que *Trichoderma asperellum* podría funcionar como biocontrol de *Fusarium verticillioides* y que este último no es capaz de ejercer algún efecto significativo en el crecimiento de *T. asperellum*.

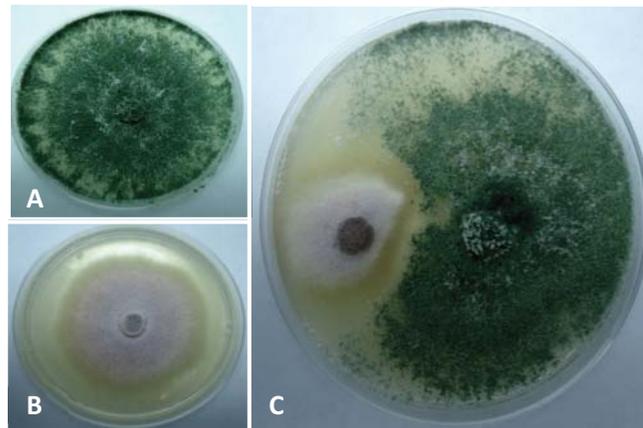


Figura 13.- Ensayo de cultivo dual. A) *Trichoderma asperellum* y B) *Fusarium verticillioides* con una concentración inicial de 1×10^6 conidios/mL a 5 días de crecimiento. C) Cultivo dual *T.asperellum-F.verticillioides* a una concentración inicial de 1×10^6 conidios/mL con 5 días de crecimiento. El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

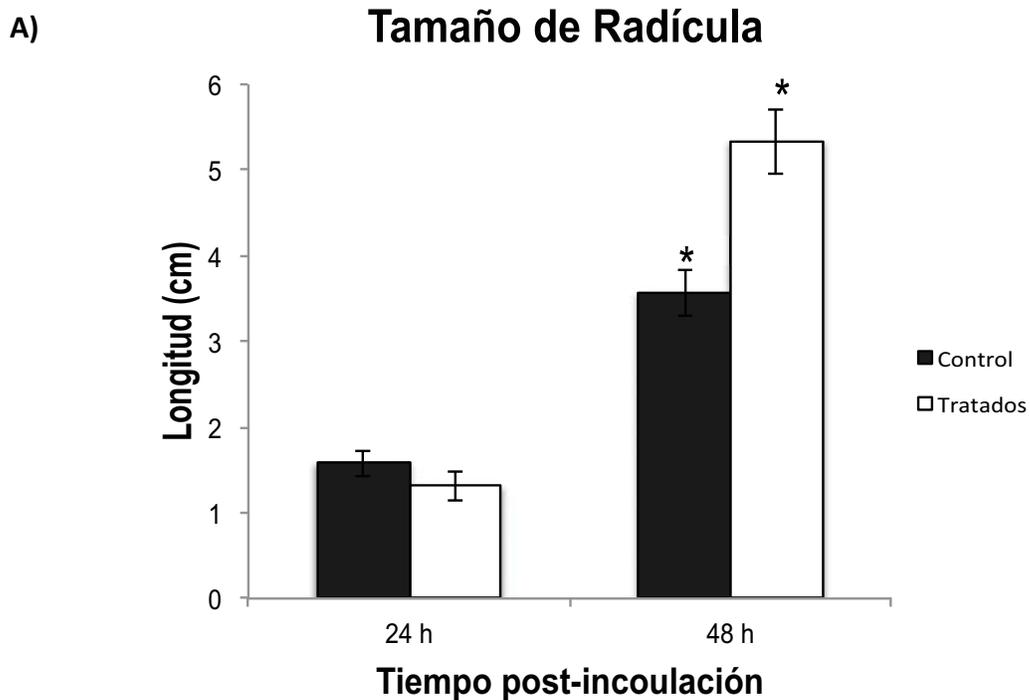
VIII.3 Efecto del *biopriming* con *Trichoderma asperellum* en la germinación de semillas de maíz Chalqueño

Para determinar el efecto de *Trichoderma* sobre el maíz Chalqueño se realizaron varios ensayos, al final el protocolo incluyó la agitación de las semillas de maíz en una suspensión de conidios de *T. asperellum* (1×10^3 conidios/mL H_2O) y su subsecuente germinación en Agar 1% por 2 días a $29^\circ C$ en obscuridad. Se observó que las semillas sometidas al tratamiento de *biopriming* presentaron un porcentaje de germinación menor (84%) al de las semillas control (90%), porcentaje que no fue significativo. No obstante a lo anterior, las semillas tratadas

con *T. asperellum* mostraron radículas más largas, la aparición de raíces seminales y más pelos radiculares a partir de las 48 h, además de que en varias de ellas ya había emergido el coleóptilo (Figuras 14 y 15). De esta manera establecimos las condiciones óptimas de germinación de las semillas de maíz en presencia de *Trichoderma asperellum*, en las que el efecto del hongo fue la de favorecer el crecimiento de la plántula.



Figura 14.- Efectos fisiológicos de *T. asperellum* sobre semillas de maíz a las 24 y 48 h de germinación. A y C Semillas de maíz germinadas por 24 h. B y D Semillas de maíz con 48 h de germinación. A y B maíz sin tratamiento y C y D tratadas con *T. asperellum*. Se muestra el acercamiento de las radículas de maíz a un lado de cada panel de semillas germinadas. El experimento se repitió cinco veces con un total de 200 semillas en cada experimento y se observaron resultados similares.



B)

	- <i>T. asperellum</i>	+ <i>T. asperellum</i>
Germinación	90%	84%
Tamaño de radículas	++	+++
Pelos radiculares	++	+++
Emergencia de coleóptilo	+	+++

Figura 15.- Tamaño de radículas y efectos en la germinación de semillas tratadas con *Trichoderma asperellum*. A) Tamaño de las radículas de semillas de maíz a las 24 y 48 de germinación con y sin *T. asperellum*, no se midieron las raíces seminales. B) Efecto en la germinación de semillas de maíz tratadas y no tratadas con el biocontrol. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 25). Los datos de las semillas tratadas se compararon con las semillas control mediante la prueba estadística *t-student*; a las 48h se presentaron valores $P \leq 0.05$ lo que indica que hay una diferencia significativa con los controles (*). Mientras que a las 24h no se observaron cambios significativos. El experimento se repitió cinco veces con un total de 200 semillas en cada experimento y se observaron resultados similares.



VIII.5 Efecto fisiológico del *biopriming* en plántulas de maíz

VIII.5.1 *Priming de semillas y respuesta sistémica*

Se exploró si las plántulas provenientes de semillas sometidas al *biopriming* con *T. asperellum* estaban protegidas contra la infección de patógenos, para ello se sometieron plántulas de maíz a diferentes dosis de *Fusarium verticillioides*. Las plántulas sin *biopriming*, denominadas plantas control (C) mostraron a los 7 días post-infección con *F. verticillioides* daño tisular en la primera hoja, principalmente en su parte central, así como crecimiento micelial del hongo patógeno; sin embargo, aquellas que provenían de semillas sometidas a *biopriming* (T) exhibieron menor área de tejido necrosado (Figura 16), lo cual además dependía de la concentración de conidios de *F. verticillioides* que se inoculara.

Las plántulas que fueron infectadas con una cantidad de 35000 conidios de *F. verticillioides*, sufrieron menor daño (Figura 16 E-F), probablemente debido a que la concentración de conidios fue muy baja, lo cual proporcionó un estímulo suficiente para una respuesta sistémica efectiva, mientras que a elevadas cantidades (95000 conidios) no se logró establecer la defensa sistémica, lo que explica la necrosis encontrada en el tejido foliar.

El *biopriming* de las semillas de maíz con *T. asperellum* protegió a las plántulas contra la infección de *F. verticillioides* hasta 65000 conidios inoculados. Por lo que para los siguientes experimentos, se utilizó esta cantidad de conidios por planta.

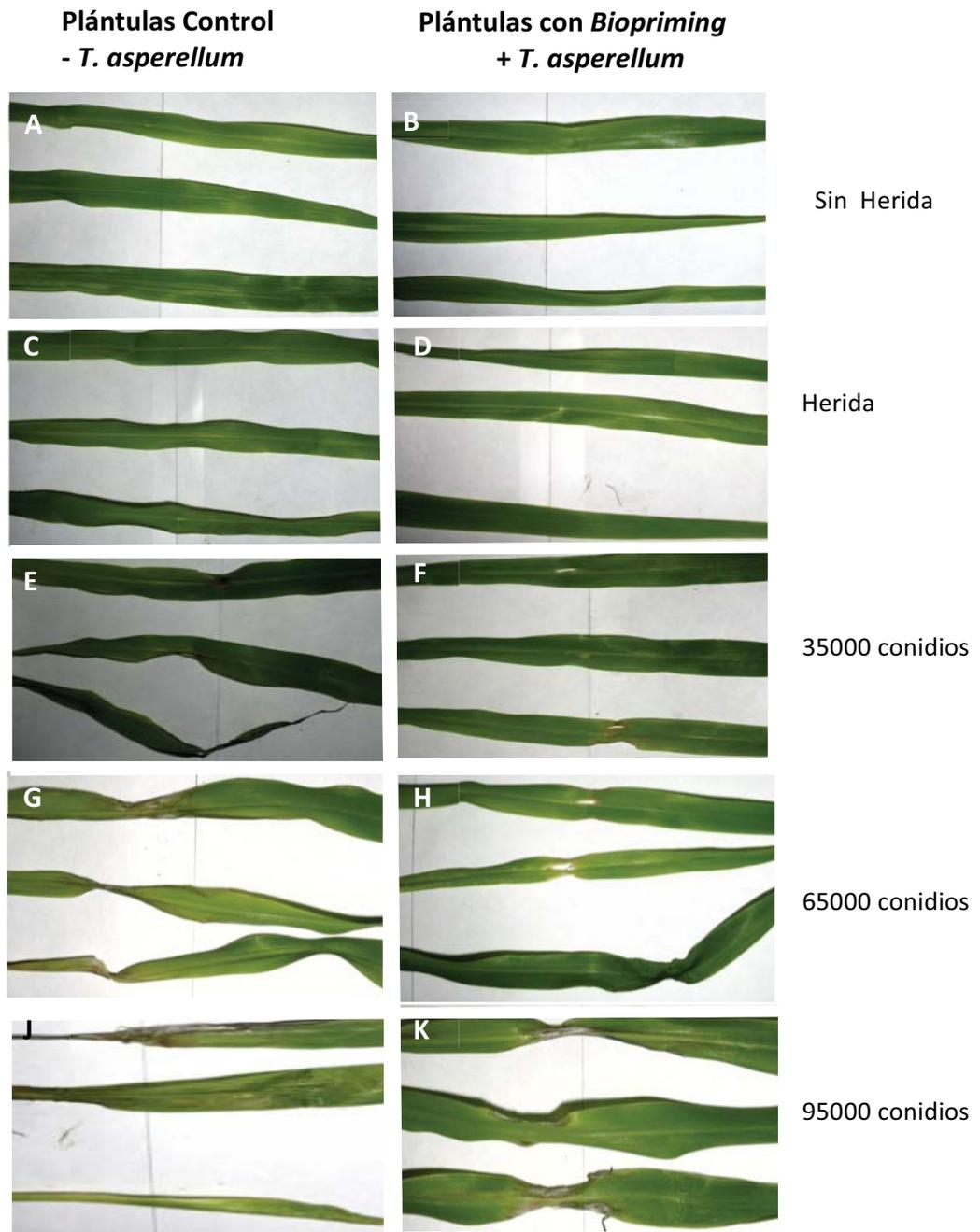
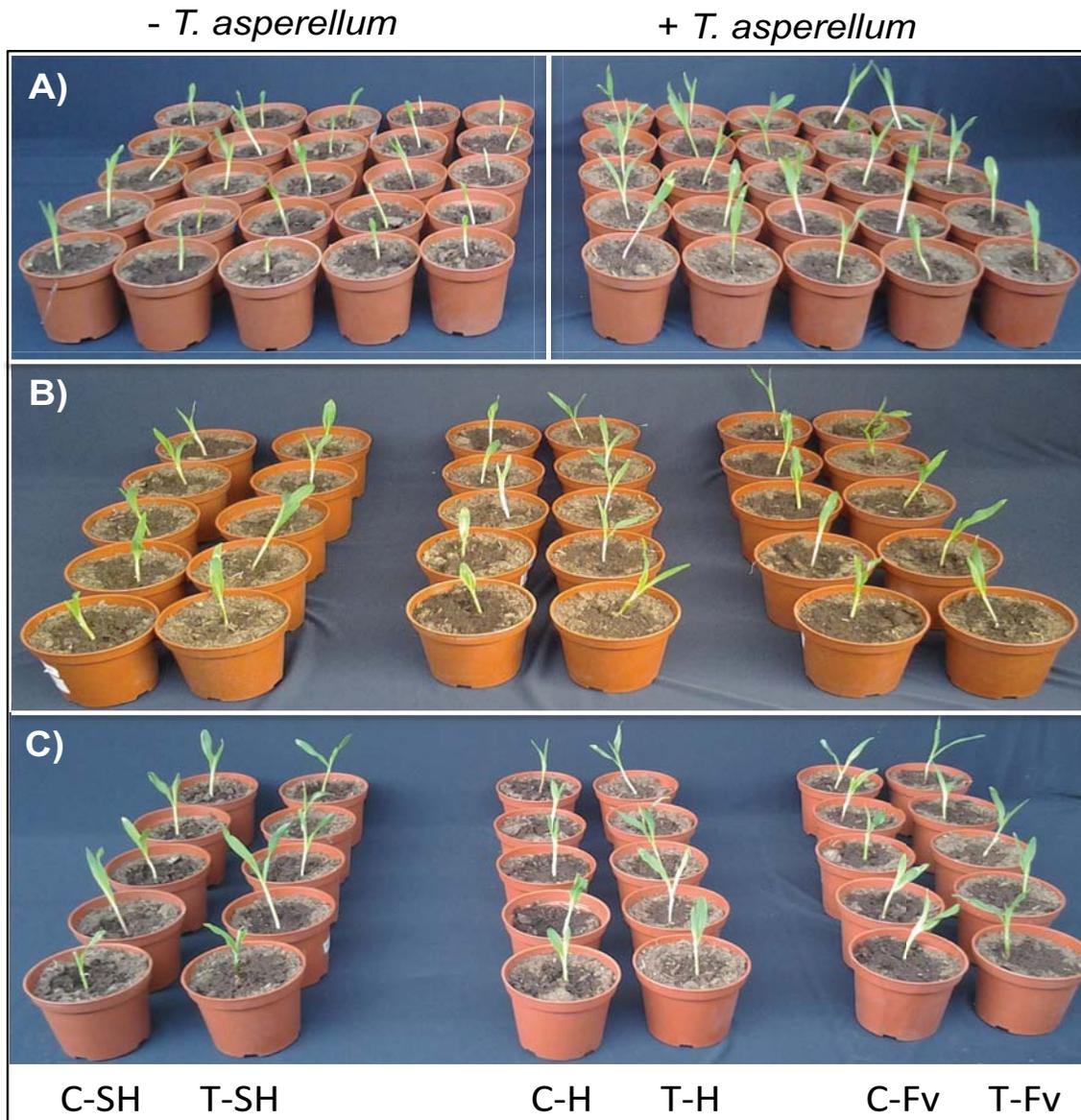


Figura 16.-Hojas de plántulas de maíz provenientes de semillas que fueron sometidas a *biopriming*. Las plántulas que no tuvieron contacto con el patógeno (A-D) no presentaron daño foliar, sin embargo aquellas que fueron inoculadas con *F. verticillioides* sufrieron necrosis en el tejido (E-J). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

VIII.5.2 Efecto sobre el crecimiento de plántulas de maíz en presencia y ausencia de los microorganismos fúngicos

Las plántulas que provenían del *biopriming* aumentaron el tamaño de su parte aérea después de los 4 dpi de crecimiento (Figura 17 y 18). Mientras que los tratamientos de herida (control de infiltración) e infección con *F. verticillioides*, ocasionarán la disminución en el crecimiento de la parte aérea, independientemente de si las plántulas pasaron por el *biopriming* o no.



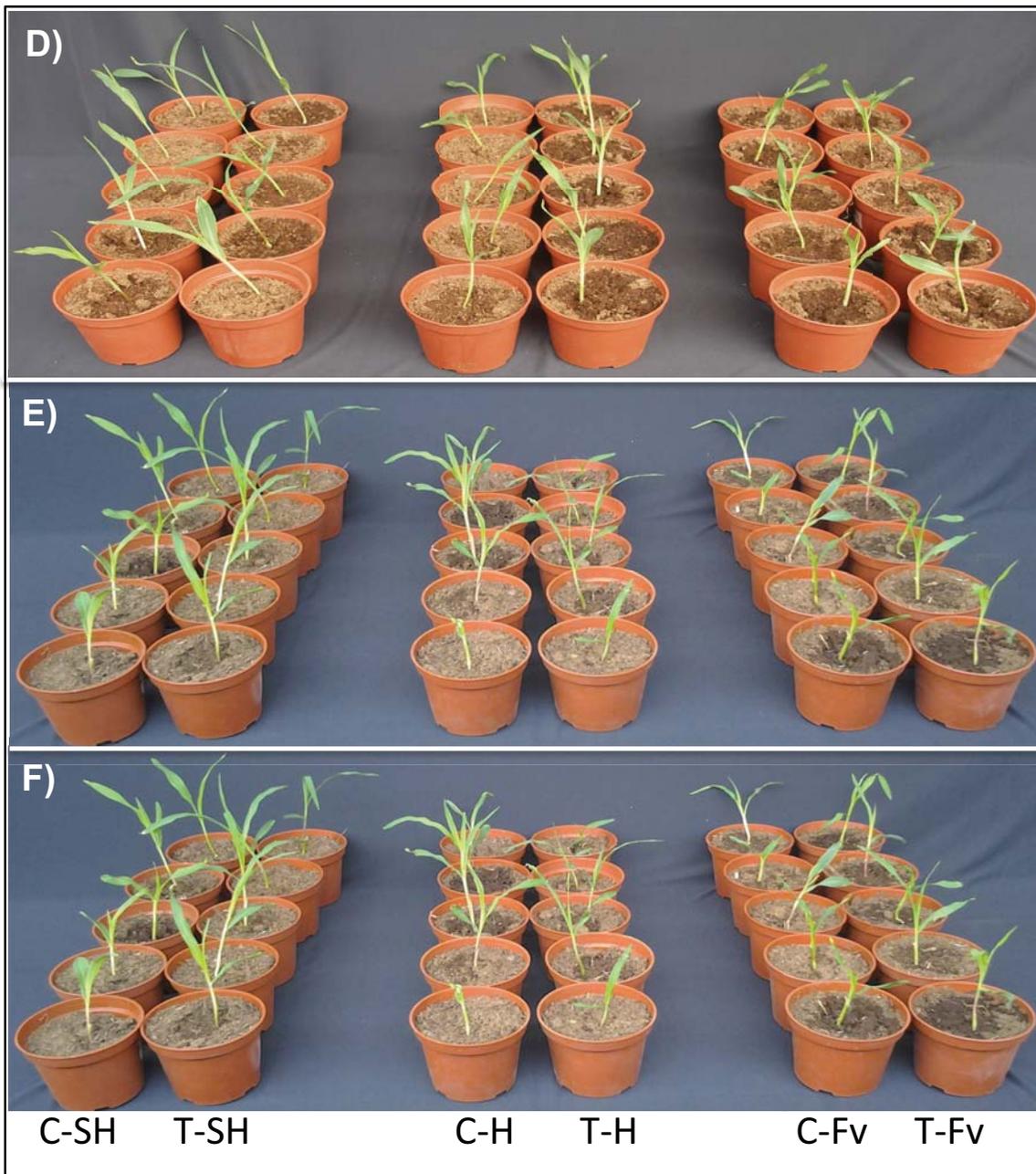


Figura 17.- Plántulas de maíz provenientes de semillas tratadas y sin tratar con *T.asperellum* a diferentes tiempos de post-infección con *Fusarium verticillioides*. A) Fotografía panorámica de plántulas seleccionadas al azar, B) 1 dpi, C) 2 dpi, D) 4 dpi, E) 5 dpi y F) 6 dpi. C-SH = Sin *T.asperellum*, plántula sin herida; C-H = Sin *T.asperellum*, plántula con herida; C-Fv = Sin *T.asperellum*, plántula con *F.verticillioides*.; T-SH = Con *T.asperellum*, plántula sin herida; T-H = Con *T.asperellum*, plántula con herida; T-Fv = Con *T.asperellum*, plántula con *F.verticillioides*. El experimento se repitió tres veces con 180 plantas cada vez con resultados similares.

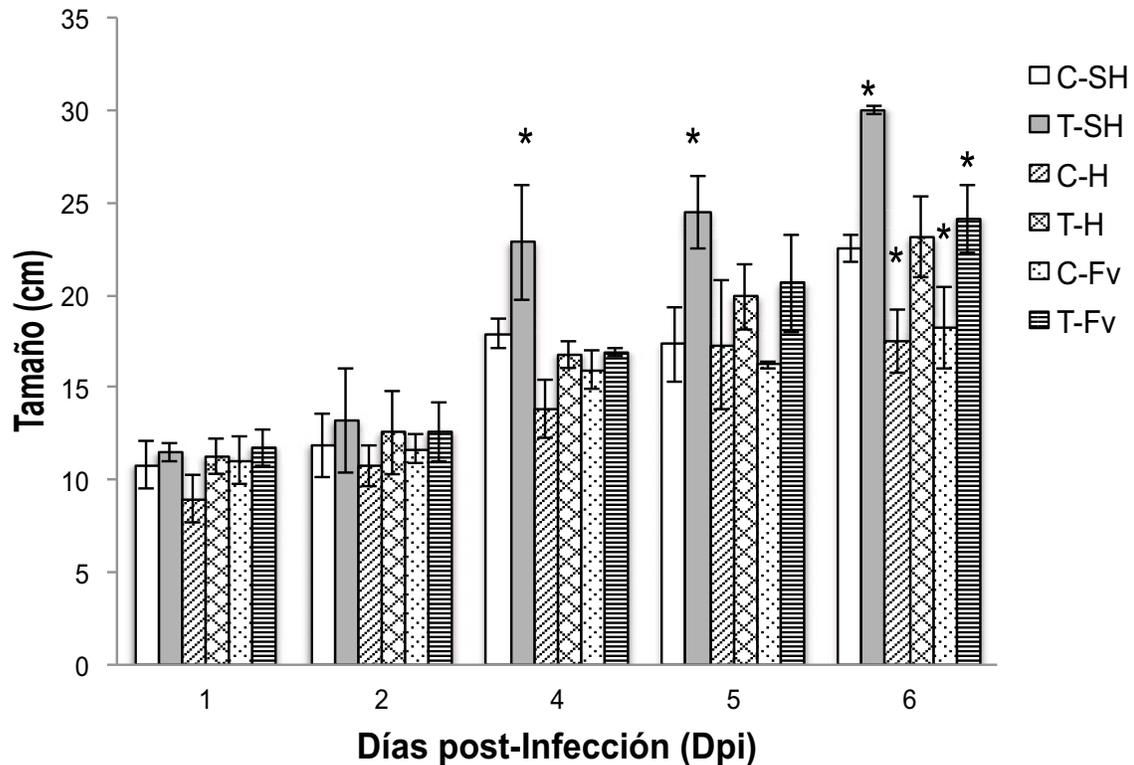


Figura 18.- Curva temporal de cambios en el tamaño de la parte aérea de plántulas de maíz provenientes de semillas con tratamiento de *biopriming* con *T. asperellum* y post-infectadas con *Fusarium verticillioides*. C-SH = Sin *T. asperellum*, plántula sin herida; C-H = Sin *T. asperellum*, plántula con herida; C-Fv = Sin *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*; T-SH = Con *T. asperellum*, plántula sin herida; T-H = Con *T. asperellum*, plántula con herida; T-Fv = Con *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 10). Los datos de las plántulas tratadas se compararon con los controles sin herida (C-SH) mediante la prueba ANOVA de dos vías; a partir del 4 Dpi se presentaron valores $P \leq 0.05$ para el tratamiento T-SH y para T-Fv, C-Fv y C-H a los 6 Dpi. lo que indica que hay una diferencia significativa con los controles (*). Mientras que para las demás plántulas no se observaron cambios significativos. El experimento se realizó por triplicado con 5 replicas por tratamiento.

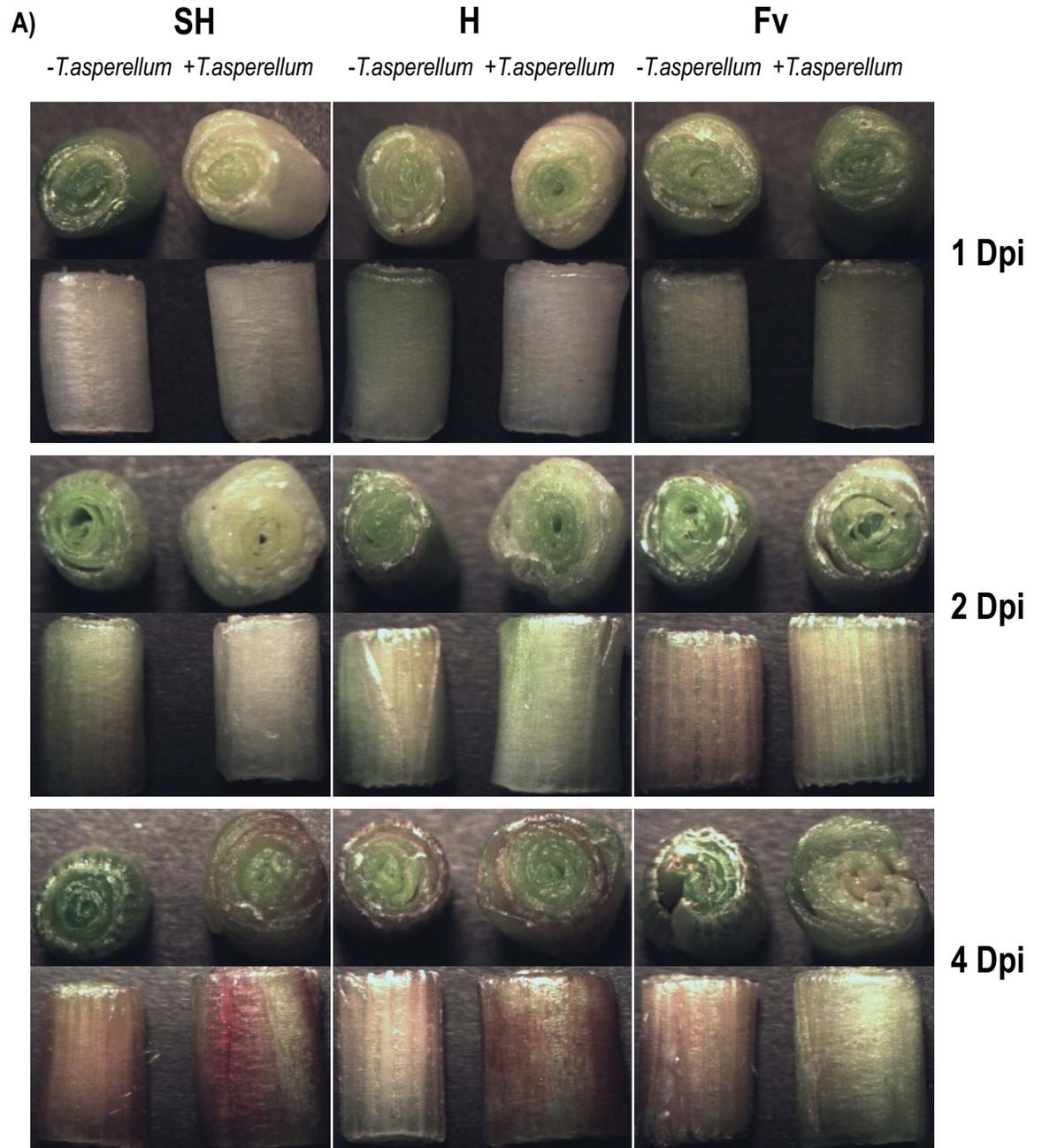
De manera interesante, la inoculación con *Trichoderma asperellum* también provocó un aumento en el grosor de los tallos de las plántulas de maíz, aún cuando estaban infectadas con *Fusarium verticillioides* (Figura 19), el aumento en el grosor se detectó a partir de los 4 Dpi.



Asimismo, se apreció que a partir de los 4 Dpi en adelante, las plántulas continuaron su crecimiento cambiando el tamaño de la parte aérea y grosor de tallos, siempre y cuando procedían de semillas tratadas con *Trichoderma*, a pesar de que fueran sometidas a una herida o al patógeno. Mientras que las plantas control redujeron su velocidad de crecimiento en estas dos condiciones (herida y patógeno).

Es probable que tiempo anterior a los 4 días post-infección se estaba montando la respuesta para contender ante la infección, y con ello posteriormente articular una respuesta efectiva, tanto a nivel de defensa como en el crecimiento de la planta (Shoresh *et al.*, 2010).

A pesar de que la acumulación de antocianinas esta asociada a la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos (Shan *et al.*, 2009) en este trabajo (Figura 19) no se observó alguna relación clara entre la coloración roja en los tallos (probable acumulación de antocianinas) y el efecto de alguno de los tratamientos que se utilizaron en el ensayo.



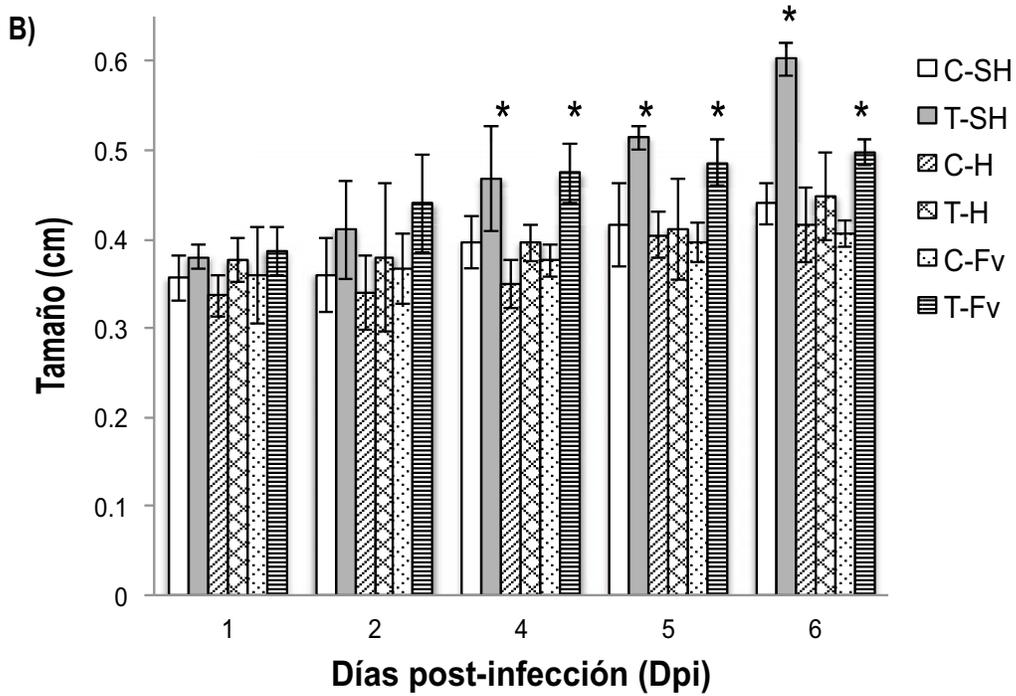
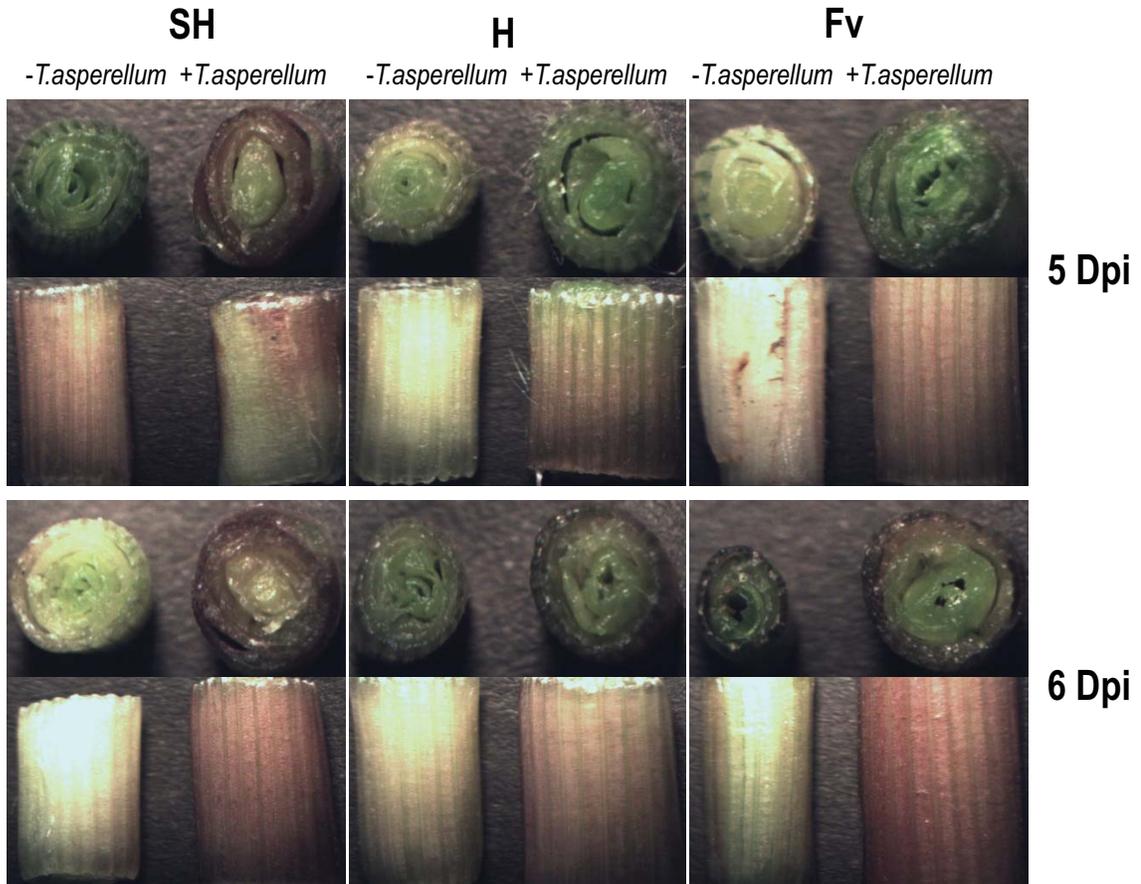


Figura 19.- Curvas temporales de los cambios en el grosor de los tallos de plántulas de maíz provenientes de semillas tratadas con el *biopriming* con *T.asperellum* y post-infectadas con *Fusarium verticillioides*. A) Vista aérea (superior) y transversal (inferior) de cortes de los tallos de plántulas de maíz provenientes de semillas tratadas con y sin *T. asperellum*, en los primeros 6 dpi con *F. verticillioides*. B) Grosor de los tallos de todos los tratamientos. C-SH = Sin *T. asperellum*, plántula sin herida; C-H = Sin *T. asperellum*, plántula con herida; C-Fv = Sin *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*.; T-SH = Con *T. asperellum*, plántula sin herida; T-H = Con *T. asperellum*, plántula con herida; T-Fv = Con *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 10). Los datos de las plántulas tratadas se compararon con los controles a las 24h sin herida (C-SH) mediante la prueba ANOVA de dos vías; a partir del 4 Dpi se presentaron valores $P \leq 0.05$ para el tratamiento T-SH y T-Fv lo que indica que hay una diferencia significativa con los controles (*). Mientras que para las demás plántulas no se observaron cambios significativos. El experimento se realizó por triplicado con 5 replicas por tratamiento.

Se ha propuesto que uno de los efectos de *Trichoderma* es afectar la tasa fotosintética (Perazzolli *et al.*, 2011) y aunado a que se observó que hubo un cambio de coloración en las hojas, se decidió determinar los niveles relativos de clorofila en las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos (Figura 20). Se observó que la cantidad de clorofila disminuyó en las plántulas control que fueron infectadas con *Fusarium verticillioides*, lo que sugirió que la planta estaba siendo afectada (Figura 20 A). Mientras que las plántulas que provenían de semillas con *biopriming* mantuvieron constantes sus niveles a pesar de haberse infectado con *F. verticillioides* (Figura 20 B).

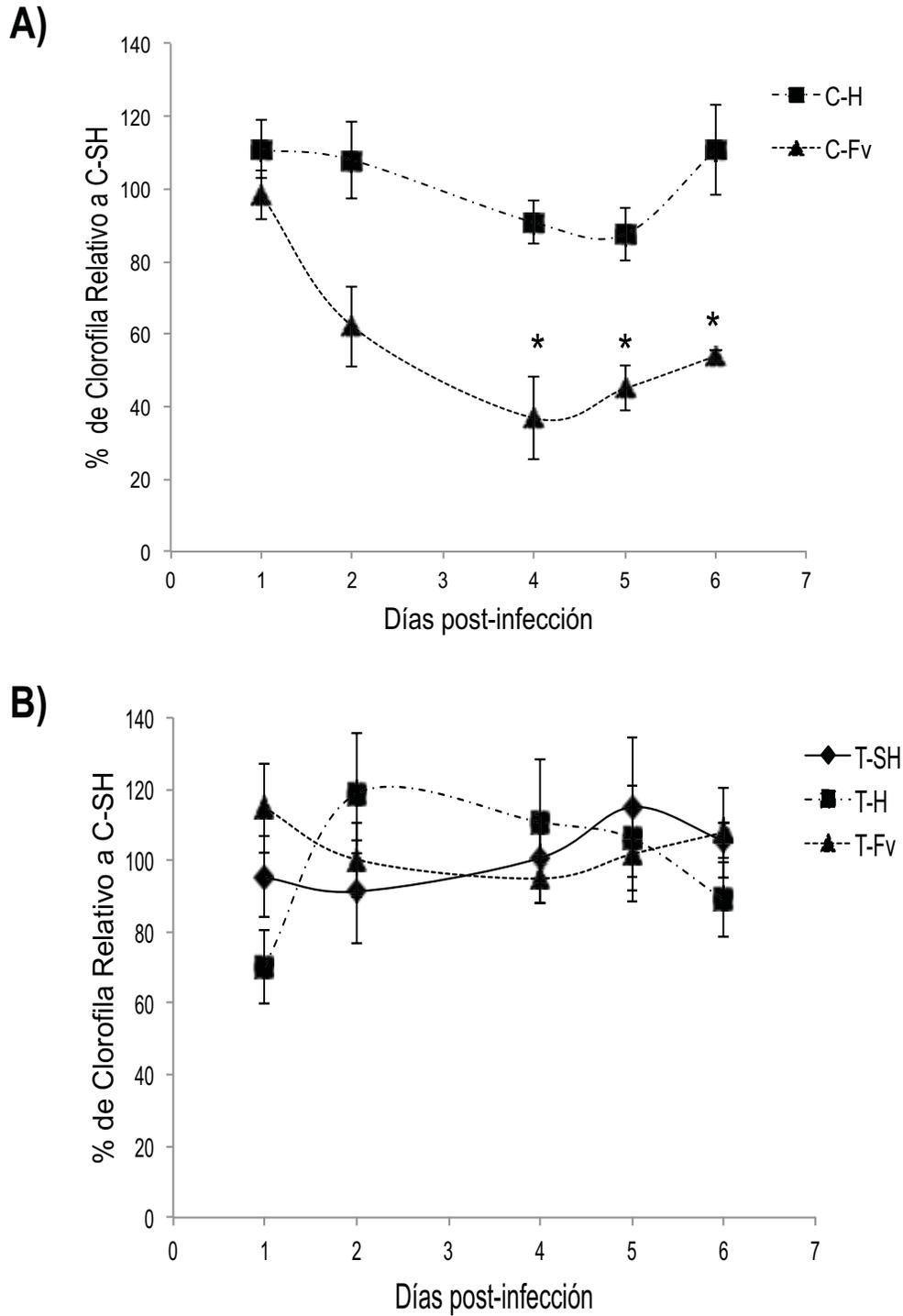


Figura 20.- Porcentaje relativo de clorofila. A) Plántulas sin *biopriming* y B) Plántulas con *biopriming*. SH= Plántula sin herida, H=Plántula con herida y Fv= Plántula retada con *F. verticillioides*. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 12). Los datos de las plántulas tratadas se compararon con los controles a las 24h sin herida (C-SH) mediante la prueba



ANOVA de dos vías; a partir del 4 Dpi se presentaron valores $P \leq 0.05$ para el tratamiento C-Fv lo que indica que hay una diferencia significativa con los controles (*). Mientras que para las demás plántulas no se observaron cambios significativos. El experimento se realizó por duplicado con 6 replicas por tratamiento.

En resumen el efecto fisiológico del *biopriming* con *Trichoderma asperellum* fue aumentar la longitud de la parte aérea, el grosor de los tallos, sostener los niveles de clorofila pese a la presencia del patógeno *Fusarium verticillioides*, y mantener por más tiempo sanas a las plántulas. Por lo que la respuesta de la planta ante el *biopriming* fue positiva y probablemente la defensa de esta se encontraba adelantada o aumentada en las plántulas que provenían de semillas sometidas a *biopriming*.

VIII.6 *Fusarium verticillioides* afecta la expresión de los genes de defensa en las plántulas de maíz tratadas o no con *biopriming*

Para evaluar si los genes de defensa de las vías dependientes del SA o JA se encendían durante la infección por *Fusarium* y si esta era diferente cuando ocurría primero el *biopriming* con *Trichoderma asperellum*, se analizaron mediante las técnicas de PCR punto final y PCR cuantitativo la expresión de los genes PR y PAL para la vía del SA (Figuras 21 y 22) y los genes AOS, AOC, OPR y PDF para el análisis de la vía del JA (Figura 23 y 24). El material biológico utilizado fueron las hojas de las plántulas de maíz y la infección con *F. verticillioides* se realizó abajo del primer nodo en el tallo, mientras que el *biopriming* con *T. asperellum* se efectuó en las semillas, recordando que la infección por este hongo ocurre en las raíces (Avis *et al.*, 2008).



VIII.6.1 Vía del SA

Se utilizó como marcadores de la vía del SA a PAL y PR. La PAL codifica para la enzima fenilalanina amonio liasa involucrada en la biosíntesis de ácido salicílico y constituye una enzima crucial en el montaje de la respuesta sistémica, además de inductora de la lignificación de la pared celular (Druzhinina *et al.*, 2011). Mientras que PR codifica para una glucanasa, proteína que se expresa ante el ataque por organismos de tipo biotrofo (Revière *et al.*, 2008).

Se encontró que el gen que codifica para la PR presentó niveles muy bajos o nulos en plantas que no se trataron o bien que se sometieron al tratamiento de herida (Figura 21). Pero al inocular las plántulas con *Fusarium* el transcrito aumentó a los tiempos de 5 y 6 Dpi. En cuanto a las plántulas que provenían del tratamiento con *Trichoderma asperellum* y que se retaron con *F. verticillioides*, presentaron niveles de expresión de PR ligeramente aumentados a tiempos cortos, lo cual probablemente se deba a que la exposición a *T. asperellum* indujo a esta vía.

Sin embargo, al analizar el perfil de expresión del gen de la PAL durante la post-infección o tratamiento (Figura 21), se observó que aún sin tratamiento ya hubo una expresión alta del gen, lo que indicó que el solo corte de las hojas que se hizo para obtener el tejido pudo inducir su expresión, mientras que la presencia del hongo redujo sus niveles a partir de los 2 días post-infección, independientemente de si provenían de semillas que fueron sometidas al *biopriming* o no.

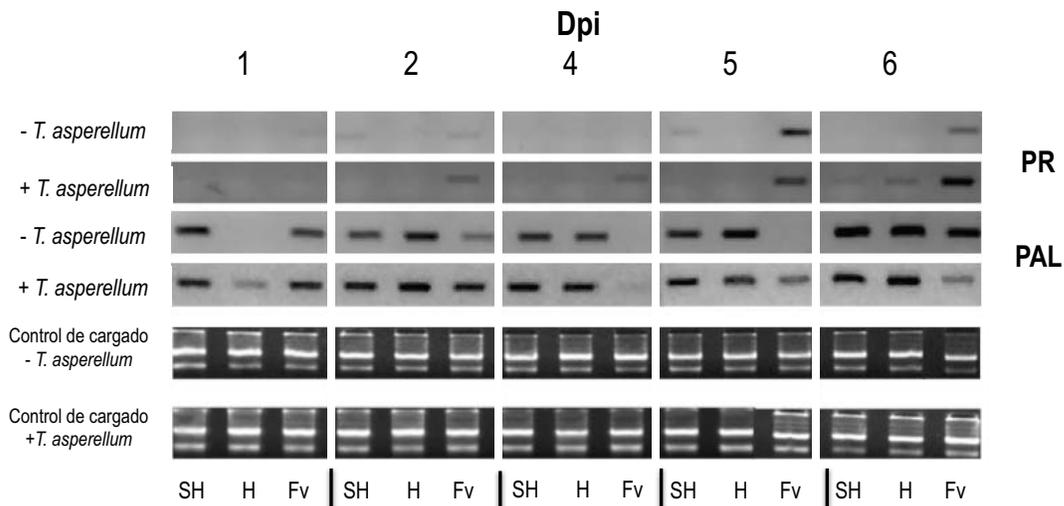


Figura 21.- Expresión temporal de los genes de la vía del SA en hojas de plántulas provenientes de semillas que fueron tratadas con *T. asperellum* e infectadas con *F. verticillioides*. La determinación de la expresión de los transcritos se realizó con la técnica de PCR punto final para los transcritos para PR y PAL en hojas de plántulas procedentes de semillas con o sin *biopriming* con *T. asperellum*. SH = Plántulas que no sufrieron heridas. H = Plántulas que solamente sufrieron herida. Fv=Plántulas que fueron infectadas con *F. verticillioides*. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

Para cuantificar los cambios en los transcritos de la vía del SA se realizó el método de PCR en tiempo real a dos tiempos post-infección 1 y 4 días (Figura 22), tiempos en los cuales el perfil de expresión en las hojas fue distinto según los datos de la Figura 21 y en los que las plántulas presentaron diferencias en los síntomas de la infección por *F. verticillioides* (Figuras 17-19).

Se encontró que al primer día post-infección o tratamiento aumentaron los niveles de transcritos tanto de PR como el PAL, independientemente de si el tratamiento que recibió la plántula fue la herida o la inoculación del patógeno, o bien que las plántulas provinieran del *biopriming* con *T. asperellum*. El nivel de expresión máximo para PR se observó en las muestras que no se trataron con el hongo

biocontrol y que además sufrieron una herida (C-H), 28.9 veces más respecto a las muestras a las que no se les realizó algún tratamiento (C-SH), mientras que las plántulas a las que se les retó con *F. verticillioides* la expresión de PR solo fue 2.9 veces más.

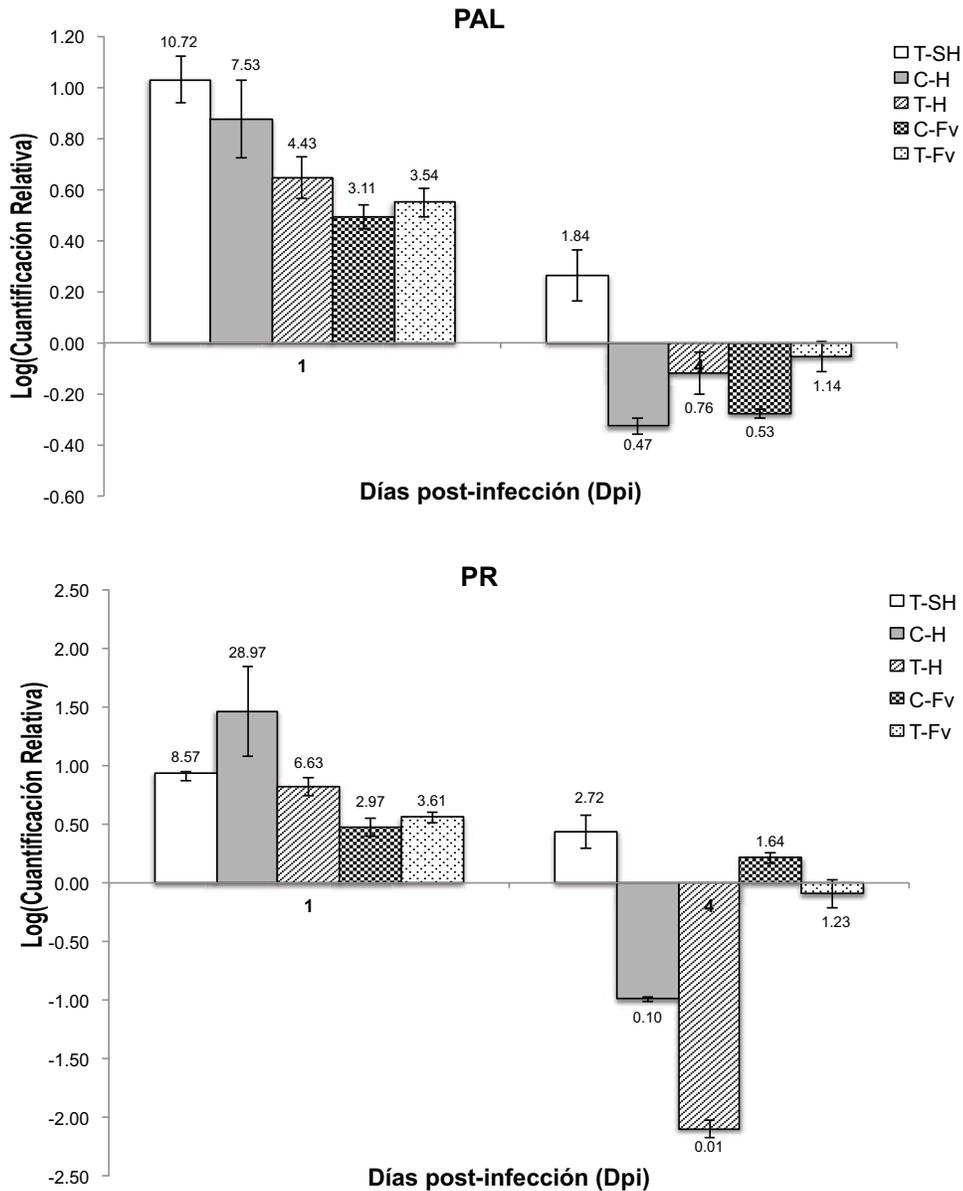


Figura 22.- Perfil de expresión de los genes marcadores de la vía del SA en plántulas que fueron tratadas y no tratadas con *T. asperellum* al día 1 y 4 post-infección con *F. verticillioides*. Se observó una sobreexpresión al día 1 post-infección en plántulas heridas con y sin



tratar con el microorganismo biocontrol, tendencia que se invirtió al cuarto día post-infección. Las plántulas que provenían de semillas tratadas con *T. asperellum* mostraron niveles de sobreexpresión al día uno, mientras que al cuarto día dichos niveles se redujeron y se asemejaron a los de las muestras sin algún tipo de tratamiento. Calibradores: C-SH para cada tiempo (1 y 4 Dpi respectivamente) C-SH = Sin *T. asperellum*, plántula sin herida, C-H = Sin *T. asperellum*, plántula con herida, C-Fv = Sin *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*, T-SH = Con *T. asperellum*, plántula sin herida, T-H = Con *T. asperellum*, plántula con herida, T-Fv = Con *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 2). El experimento se realizó por duplicado con 4 replicas por tratamiento.

Por otra parte, al cuarto día post-infección los niveles de expresión tanto de PR como de PAL se redujeron en todos los tratamientos, e incluso llegaron a ser menores que los de los controles sin herida.

Por lo anterior, *Trichoderma* no afectó de manera específica la respuesta de la planta a la herida o al tratamiento posterior con *Fusarium* por la vía del ácido salicílico, y se demostró que *T. asperellum* fue percibido probablemente como un organismo invasor.

VIII.6.2 Vía del JA/Et

La vía del JA/Et está relacionada con la respuesta sistémica inducida (ISR) por microorganismos no patógenos que pueden llevar a la promoción del crecimiento vegetal (Pieterse *et al.*, 2009); vía podría haber estado encendida en las plántulas con *biopriming* con *Trichoderma asperellum*. Para examinar si la vía se encontraba encendida se estudiaron varios genes que participan en la síntesis de JA, como AOS, AOC y OPR (Zamioudis y Pieterse, 2012), además de la PDF, la cual codifica para una defensina, que es una clase de proteína antimicrobiana sintetizada por la planta en respuesta a JA (Wang *et al.*, 2011).

Inicialmente se evaluó la expresión de los genes de la aleno oxido sintasa (AOS) y la defensina de planta (PDF), mediante PCR punto final.

En la curva temporal de expresión del gen PDF a diferentes tiempos post-infección (Figura 23), se encontró que el tratamiento de herida y patógeno en las plántulas control modificó los niveles del transcrito de manera variable. Al comparar los niveles de PDF entre las plántulas control y las que provenían del *biopriming* se observó que los niveles fueron muy parecidos a los controles en los diferentes días y tratamientos, pero solo a los tiempos posteriores a los 2 días post-infección o tratamiento. Lo que podría indicar que la respuesta sistémica de defensa ocurrió en los primeros 2 días post-infección en las plántulas con *biopriming* y que fueron retadas con el patógeno. Los transcritos de AOS presentaron un perfil similar de expresión al de PDF, mayor expresión en plántulas provenientes del *biopriming* de semillas de maíz a tiempos menores de 2 Dpi o tratamiento, y un retraso en el aumento del transcrito de AOS para las plántulas que no provenían del *biopriming*.

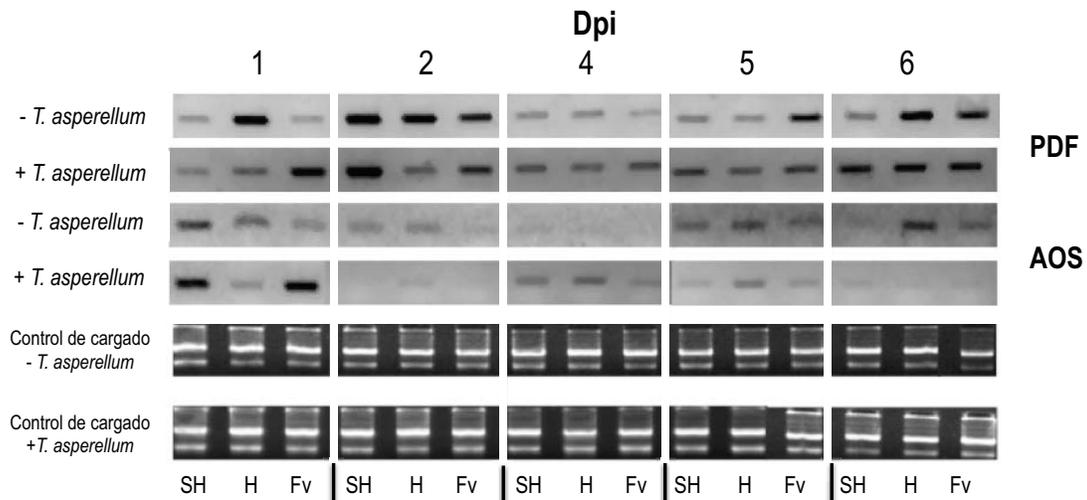


Figura 23.- Expresión temporal de los genes de la vía del JA en hojas de plántulas provenientes de semillas que fueron tratadas con *T. asperellum* e infectadas con *F. verticillioides*. Expresión de los transcritos para PDF y AOS en hojas de plántulas procedentes de semillas con o sin *biopriming* con *T. asperellum*. SH = Plántulas que no sufrieron heridas. H = Plántulas que solamente sufrieron herida. Fv=Plántulas que fueron infectadas con *F. verticillioides*. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.



Para cuantificar la magnitud de los cambios en expresión de los genes de defensa involucrados en esta vía se realizó la técnica de PCR en tiempo real y se determinaron los niveles de los transcritos de genes involucrados en la vía de síntesis del JA: AOS, AOC y OPR. En este caso no se determinó PDF pues aunque se diseñaron varios oligonucleótidos para amplificar a este transcrito por PCR tiempo real, no se logró obtener un producto único, ya que hay varias PDFs en maíz (Wang *et al.*, 2011; Thomma *et al.*, 2002) además de que la técnica de cuantificación por PCR tiempo real es más sensible que el PCR punto final. La amplificación de los genes mencionados sí mostraron un solo producto de amplificación (véase anexo 4).

En la Figura 24 se observa que al primer día de tratamiento los niveles de AOS se elevaron en las plántulas control con herida (C-H; 60.9 veces) y también en las plántulas control inoculadas con *Fusarium* (C-Fv; 11.73 veces más). Este es un resultado final esperado ya que la vía del JA se enciende por herida y por la interacción de la planta con un microorganismo de tipo biotrofo, tal como lo es *Fusarium* al inicio de la infección, ya que se comporta como un organismo de estas características aunque después cambia a un estado necrótrofo (Rutherford *et al.*, 2002). No obstante en estos aumentos de transcritos en las plántulas control, el mayor nivel de expresión se encontró en las plántulas que provenían del *biopriming* con *T. asperellum*, 111.38 veces más transcritos que el control sin tratamiento. El tratamiento con el patógeno en las plántulas con *biopriming* redujo el nivel de transcrito (T-FV; 45.37), pero a pesar de la reducción aún es 4 veces más que el de las plántulas control (C-FV; 11.73).

No obstante en la elevación del nivel de transcritos de AOS al cuarto día post-infección, observamos una disminución en su expresión en todos los tratamientos, manteniéndose todas las muestras tratadas con *Trichoderma* en niveles de 4.57 a 10.50 veces más altos respecto a aquellas que no fueron sujetas a ningún



estímulo (C-SH), rango de expresión en el que también se hallan las plantas que únicamente fueron retadas con *F. verticillioides*.

Los niveles de AOC presentaron una tendencia similar al de AOS, excepto que su expresión se mantuvo a los 4 días del tratamiento. Mientras que la expresión de OPR fue alta en todos los tratamientos al primer día, con el nivel más alto en las plántulas con *biopriming* sin infectar o herida.

Por lo tanto, la expresión de estos marcadores sugiere que el *biopriming* indujo en las plántulas la respuesta ISR vía JA/Et (niveles altos de AOS, AOC y OPR) y que el posterior enfrentamiento de estas a una herida o a *F. verticillioides*, moduló esta respuesta que aunque siguió siendo alta no fue la misma con la que respondieron las plántulas que no pasaron por el *biopriming*.

Es posible que esta respuesta aumentada en la vía JA/Et fuera la que favoreció la defensa de las plántulas que pasaron con *biopriming* al ataque por *Fusarium*, llevando a que las plántulas se observaran sanas.

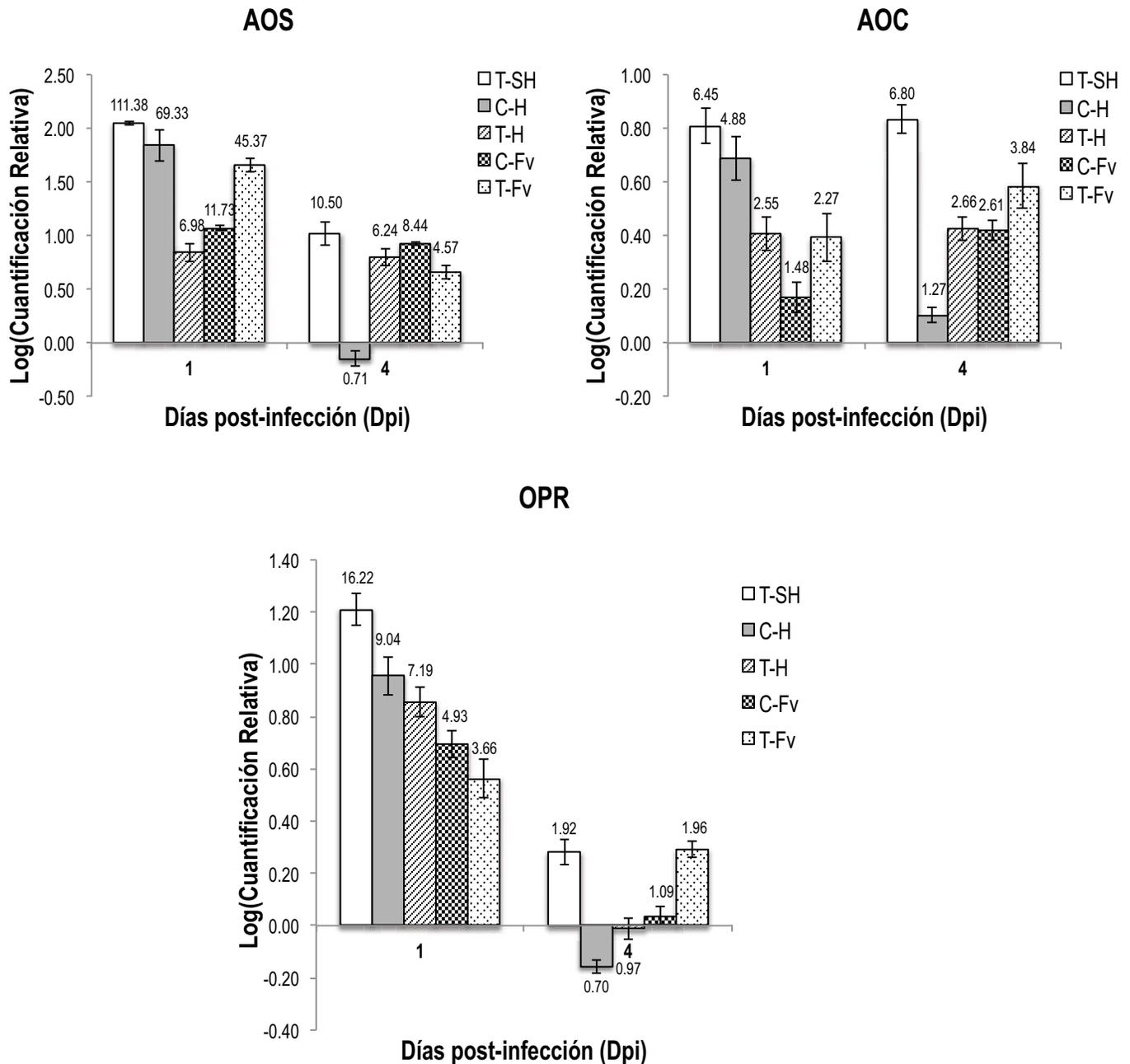


Figura 24.- Perfil de expresión de los genes marcadores de la vía del JA en plántulas que fueron tratadas y no tratadas con *T. asperellum* al día 1 y 4 post-infección con *F. verticillioides*. Calibradores: C-SH para cada tiempo (1 y 4 dpi respectivamente) C-SH = Sin *T. asperellum*, plántula sin herida, C-H = Sin *T. asperellum*, plántula con herida, C-Fv = Sin *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*, T-SH = Con *T. asperellum*, plántula sin herida, T-H = Con *T. asperellum*, plántula con herida, T-Fv = Con *T. asperellum*, plántula con *F. verticillioides*. Los datos mostrados son media \pm desviación estándar (n= 2). El experimento se realizó por duplicado con 4 replicas por tratamiento.



IX. DISCUSIÓN

IX.1 *Trichoderma asperellum* beneficia el crecimiento de las plántulas de maíz var Chalqueño

De manera continua las plantas se encuentran expuestas a diferentes tipos de microorganismos y en general a comunidades de ellos. Los microorganismos denominados de control biológico son percibidos por la planta como invasores, pero estos manipulan las defensas de la planta para mantenerse como hospederos por tiempos prolongados y establecer una relación benéfica para ambos (Zamioudis y Pieterse, 2012).

Trichoderma asperellum ha sido descrito como un hongo que mejora el crecimiento de la planta (Harman *et al.*, 2004 y Shores, 2010), en este sentido se corroboró que efectivamente en el maíz variedad Chalqueño tiene estos efectos benéficos. Durante el periodo de la germinación *Trichoderma* favoreció el crecimiento radicular (radículas largas y gruesas) y en el caso de las plántulas de 15 días se observó que la parte aérea presentó tallos gruesos y altos, además de que las raíces eran numerosas.

Efectos similares se han encontrado en semillas de tomate que fueron tratadas con los conidios de *Trichoderma harzianum* T-22, las que incrementaron su protrusión radicular y elongación, la respuesta de la semilla fue rápida y comenzó antes de que el hongo penetrara a las porciones vivas de la semilla (el embrión), proceso invasivo que probablemente se debió a evocadores secretados por el hongo (Shores *et al.*, 2010).

Una de las posibles explicaciones para el aumento en el crecimiento de las plántulas después del tratamiento con *Trichoderma*, es el hormonal o la presencia de factores de crecimiento (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Es posible entonces que el incremento en la elongación radicular en las plántulas producto del



biopriming con *Trichoderma*, pueda deberse a la actividad de la ACC desaminasa producida por *Trichoderma*, ya que esta controla la biosíntesis del etileno por la planta, pues mayor actividad de la ACC desaminasa menor etileno producido por el organismo fotosintético (Avis *et al.*, 2008; Druzhinina *et al.*, 2011).

Asimismo, se ha reportado que varias cepas de *Trichoderma* también producen metabolitos secundarios parecidos a auxinas los que inducen el crecimiento de la planta, y que son requeridos durante el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010). Esto podría explicar la morfología de las raíces de plántulas de maíz que provenían de semillas tratadas con *T. asperellum*, pues estas tendieron a expandirse lateralmente.

El contenido de IAA durante la interacción de *Trichoderma asperellum* y embriones de maíz Chalqueño aumenta desde las 8 h de germinación y se mantiene alto hasta las 48 h (Arciniega-Ruiz, 2012). Por lo que es probable que se encuentre un nivel alto de IAA en las plántulas sujetas al *biopriming* a las 48 h de germinación, y que ello contribuya al aumento en la elongación radicular así como la aparición de las raíces seminales en las plántulas de maíz. Desconocemos si a tiempos prolongados del crecimiento de las plántulas de maíz el contenido de IAA está incrementado, pese a esto, si consideramos que las semillas con *biopriming* ya se encontraban adelantadas en su desarrollo a las 48 h de germinación (radículas más largas y el coleóptilo se observó más fuerte), es posible que este avance le fuera suficiente para producir una plántula más alta que la plántula que provenía de semillas sin *biopriming*. Se hace necesario llevar a cabo la determinación de los niveles de IAA para explicar el crecimiento de las plántulas.

Otra hormona que se conoce como regulador de elongación de los tallos es la giberelina (GA) (Stavang *et al.*, 2005), en los embriones de maíz germinados en presencia de *Trichoderma* se encontró que el contenido de esta hormona aumenta



cerca de 2 veces respecto a los embriones control (Arciniega-Ruíz, 2012), por lo que es posible que la hormona aumente en las plántulas provenientes de semillas de maíz con el *biopriming*.

Recientemente se ha propuesto que la vía de GA es aprovechada por microorganismos necrótrofos para modular la respuesta de defensa de la planta y hacerla susceptible ante la infección por biótrosos. El resultado que llevó a proponer lo anterior fue que mutantes para las 4 proteínas DELLA de *Arabidopsis thaliana* inducen la expresión de los genes de la vía de defensa dependiente de JA. Las proteínas DELLA son represoras del crecimiento vegetal, y su degradación es mediada vía GA, entonces al aumentar el GA aumenta el crecimiento vegetal lo que ayuda al establecimiento del microorganismo de tipo biótrofo y hace lo opuesto con el necrótrofo (Navarro *et al.*, 2008).

Las citoquininas también se han propuesto como responsables del mayor crecimiento de las plántulas, pues se ha observado que los niveles de estas aumentan en *A. thaliana* cuando sus raíces son tratadas con el hongo *Piriformospora indica* ocasionando la promoción del crecimiento (Shoresh *et al.*, 2010).

La segunda explicación que se propone para los efectos observados del *biopriming* con *Trichoderma* es el aumento en la solubilización de nutrientes en el suelo. *Trichoderma* secreta ácidos orgánicos, como el glucónico, cítrico o fumárico y esta acidificación puede contribuir a la solubilización de fosfatos, micronutrientes y cationes minerales que llevan al aumento en el crecimiento vegetal (Benítez *et al.*, 2004). Las semillas de maíz Mol 17 sujetas al *biopriming* con *T. harzianum* T-22 (recombinantes que responden fuertemente a la colonización de la raíz por T-22) incrementaron el tamaño de raíces y hojas. Los autores encontraron que hay un aumento en la solubilización de los nutrientes del suelo y la planta aumenta la toma de estos (Harman *et al.*, 2004). En el presente trabajo sabemos que el



aumento en la elongación radicular y la aparición adelantada del coleóptilo en las semillas de maíz Chaqueño sometidas a *biopriming* no ocurrió por la solubilización de los nutrientes del suelo, ya que fueron germinadas en Agar al 1% por 48 h, por lo que una explicación alternativa es posible.

Una tercera explicación del aumento de la talla de las plantas durante la interacción con *Trichoderma*, es la alteración del metabolismo de la planta. Se ha documentado desde un enfoque proteómico, que la interacción entre plántulas de maíz y *T. harzianum* T22 aumenta desde 5 hasta 40 veces más la expresión de proteínas involucradas en la glucólisis, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la fotosíntesis. Además de que el contenido de almidón y azúcares solubles se incrementa hasta en 4mmol/g de tejido fresco (Shoresh *et al.*, 2010).

En este trabajo se encontró que pese a que el contenido de clorofila entre las plántulas provenientes del *biopriming* con *Trichoderma* y las plántulas sin *biopriming* es similar, al someter a ambos lotes de plántulas a la infección de *F. verticillioides* se redujo el contenido de clorofila en las plántulas sin *biopriming*. Esto sugiere que *Trichoderma* modifica el metabolismo de las plántulas y ello les beneficia ante el ataque posterior de un patógeno. Para confirmar lo anterior se propone medir en un futuro el contenido de carbohidratos y los niveles de expresión de genes fotosintéticos como la subunidad pequeña de la rubisco (RSS) y la proteína de unión a clorofila (CBP).

IX.2 El *biopriming* con *Trichoderma asperellum* mantiene a las plántulas sanas contra *Fusarium verticillioides*

El género *Trichoderma spp.* ha sido descrito no solo como promotor del crecimiento vegetal sino también como un organismo de control biológico, ya que presenta varias estrategias para combatir a los organismos patógenos y aumentar



las defensas de la planta (Druzhinina *et al.*, 2011; Vinale *et al.*, 2008; Benítez *et al.*, 2004).

En este trabajo se encontró que la inoculación de las plántulas con *Fusarium* o bien la producción de una herida, disminuyó la talla de la planta, lo anterior producto probablemente del aumento en la demanda energética y de carbono para restaurar la integridad celular, ya que se ha documentado que se altera la actividad respiratoria así como la toma de sacarosa exógena durante la infección (Ibraheem *et al.*, 2008). No obstante, las plántulas que provenían del *biopriming* con *Trichoderma* después de la herida o la inoculación con *Fusarium*, fueron más altas que las plántulas control sometidas a estos tratamientos. Es probable que *Trichoderma* haya cambiado el metabolismo de las plantas mejorando no solo su respuesta ante el ataque de un patógeno sino también en su proceso de restauración celular.

En cultivos de uva tratados con BTH (Benzothiadiazole, análogo de SA) para simular la SAR que naturalmente se induce por patógenos, se redujeron sus contenidos de clorofila, mientras que el tratamiento previo del cultivo con *T. harzianum* T39 mantiene los niveles de clorofila semejantes al de las plántulas sin BTH, similar a lo que se observó en este estudio. Estos datos sugieren que la defensa contra un patógeno es energéticamente más costosa que el mantener a un organismo benéfico (Perazzolli, *et al.*, 2011).

En relación a la defensa de la planta, el tratamiento de semillas de maíz con *T. harzianum* reduce la incidencia de *F. verticillioides*, abate los niveles de fumonisinas, aumenta la tasa de germinación y disminuye la incidencia de enfermedad en las mazorcas posiblemente debido a la reducción de patógenos de la rizósfera (Nayaka *et al.*, 2008).



Trichoderma además de sintetizar compuestos antimicrobianos y antinematodos puede interactuar directamente con los patógenos. El contacto directo de *T. asperellum* con *F. verticillioides* lleva al primero a envolver y estrangular a las hifas del patógeno, después penetra en el organismo y por último consume el citoplasma del huésped para abatir su crecimiento, este fenómeno ha sido descrito como micoparasitismo (Harman *et al.*, 2004; Howell, 2003; Vinale *et al.*, 2008; Arciniega-Ruiz, 2012).

IX.3 Expresión de genes de defensa durante la interacción de *Trichoderma* y *Fusarium* sobre las plántulas de maíz.

Si bien es cierto que uno de los efectos de *Trichoderma* es modificar el metabolismo primario de la plántula para mejorar su crecimiento, también induce la respuesta de defensa de la planta. Las respuestas de defensa de la planta ante los invasores son variadas, al inicio de la infección la planta reconoce al invasor, si este es benéfico o produce un daño mecánico se lleva a cabo la respuesta de defensa mediada por ácido jasmónico/etileno (Van der Ent *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2005; Harman *et al.*, 2004). Por otra parte, hongos biótrofos inducen la vía de señalización mediada esencialmente vía SA (Pieterse *et al.*, 2009; Vlot *et al.*, 2009). Aunque es común encontrar a microorganismos que no se encuentran exclusivamente con un solo estilo de vida, es decir son hemibiótrofos, ya que al relacionarse con la planta son primero biótrofos y posteriormente necrótrofos, por lo que las vías del SA y del JA/Et que generalmente son antagonistas que cooperan entre sí para contender con el patógeno (Bari y Jones 2009; Pieterse *et al.*, 2009; Antico *et al.*, 2012).

La interacción de una planta con un hospedero es compleja, aún más cuando no solo es un hospedero el que a la vez invade a la planta, esta es la razón por la que pocos estudios se enfocan a la búsqueda de las vías que se encienden cuando hay interacciones múltiples (Kniskern *et al.*, 2007). En el presente trabajo se



analizó la inducción de dos vías de defensa de las plantas, la del SA y la del JA/Et durante la interacción benéfica producida por *Trichoderma asperellum* y la posterior adición del patógeno *Fusarium verticillioides*.

La vía del ácido salicílico se enciende de manera similar por daño, por *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Las plantas presentan mecanismos de defensa que le permiten contender contra diferentes microorganismos. Existen una variedad de compuestos en las plantas que le permiten reducir el crecimiento o penetración de los invasores, algunas de ellas son inducidas al presentarse el posible huésped. Dentro de estas moléculas se encuentran las fitoalexinas, un derivado de la vía de los fenilpropanoides, vía en la que la fenilalanina es un precursor importante. La enzima que desamina a este aminoácido, la fenilalanina amonio liasa o PAL, es clave para la producción de los diferentes metabolitos de la vía de los isopropanoides, varios con actividad anti-microbiana, además de ser precursores del SA (Iriti y Faoro, 2009). La expresión de la PAL durante la defensa es un indicador de que la planta percibió a un invasor.

La expresión de PAL se indujo tanto en las plantas infectadas con *Trichoderma*, como con *Fusarium* y también con la herida a niveles muy similares a tiempos cortos (1 Dpi). En principio la activación de la vía de los fenilpropanoides por la inducción de la transcripción de la PAL llevaría a un aumento en la producción de lignina, necesario para reforzar la reparación las paredes celulares de la célula vegetal, (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaraz, 2007). Esto sería necesario en cualquiera de los tratamientos que se produjeron en este trabajo, ya que las paredes celulares fueron dañadas por el paso del hongo independientemente de si este era benéfico o no.



Adicionalmente a lo anterior, a través de la vía de los fenilpropanoides se lleva a cabo la síntesis de SA que induce la expresión de proteínas de defensa (PR). La expresión aumentada de PAL y PR, indican una respuesta sistémica ya que hubo cambios en la expresión de estos (aunque menores para PAL) cuando las plántulas fueron inoculadas con el patógeno en los tallos. La presencia de *Trichoderma* en la plántula de maíz no tuvo una respuesta diferente a la de la planta que fue infectada solo con *F. verticillioides*.

En el caso de las PRs se ha documentado que raíces de pepino que han sido colonizadas por *Trichoderma asperellum* T-203, reducen la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, probablemente para que el organismo se establezca en la planta (Howell, 2001; Harman *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2008; Shores, 2010), resultado que contrasta con el de este estudio, ya que el nivel de expresión en presencia únicamente de *Trichoderma* aumentó 8.57 veces más.

Tras la disminución de las PRs inducidas por la presencia de *Trichoderma* en pepino, la plántula se encuentra susceptible a responder al ataque de algún patógeno mediante la producción de PRs y compuestos antimicrobianos (Harman *et al.*, 2004 y Shores, 2010). En nuestro caso la producción de PRs y PAL aumentó en las semillas de manera similar ante todos los tratamientos. Es posible que *F. verticillioides* al ser un organismo hemibiótrofo sea percibido de inicio como un hongo benéfico al igual que *T. asperellum*, por lo que no encontramos diferencias entre la inducción de los genes examinados en la vía del SA para los tratamientos analizados.

Se ha demostrado que las plantas transgénicas de tabaco y *Arabidopsis* que no pueden acumular ácido salicílico, debido a que expresan el gen bacteriano NahG que codifica para una salicilato hidroxilasa, son hipersusceptibles a patógenos virulentos e incapaces de montar una respuesta sistémica adquirida, lo cual



confirma el papel de esta vía en la resistencia a patógeno y corrobora que cuando hay un estrés de este tipo ocurra su inducción (Halim *et al.*, 2006). Lo anterior se observó en este trabajo, ya que se indujo la expresión del gen PR cuando la planta sufrió un ataque por un microorganismo, independientemente de si este fuera benéfico o no, aunque no había sido descrito que el proceso de herida produjera un aumento en los niveles de PR y PAL a tiempos tempranos de haberse llevado a cabo el estímulo.

Por lo anterior, el aumento en los transcritos de la PR y PAL, puede llevarse a cabo de manera similar cuando se somete a estrés biótico y al mecánico en las plántulas de maíz. Aunque habría que analizar a un organismo de tipo necrótrofo para determinar si esto ocurre ante cualquier tipo de microorganismo.

La vía de señalización JA/ET se encuentra altamente inducida en las plántulas que provienen del biopriming.

El JA es el producto final de la vía de los octadecanoides, en donde una serie de reacciones iniciada por la lipoxigenasa actúa sobre el ácido linolénico que resulta en la formación del 13 hidropéroxido en el cloroplasto y su posterior conversión a un estereoisómero del OPDA (9S,13S-OPDA; OPDA 12 **OxoPhitoDienoic Acid**) por la acción secuencial de la aleno oxidasa sintasa (**AOS**) y la aleno oxido ciclasa (**AOC**) aún en el cloroplasto, llevando a la formación de un anillo de ciclopentenona de OPDA. Después, ya en el peroxisoma se reduce el anillo de ciclopentenona por la OPDA reductasa (**OPR**), posteriores pasos de oxidación completan la síntesis de JA (Howe, 2001; Loake y Grant, 2007). El OPDA como el JA y las formas metiladas de este se han propuesto como efectores de la respuesta de defensa en las plantas (Howe, 2001).



Para evaluar si se encendía la vía de señalización del JA/ET durante la interacción con los dos hongos se examinaron los perfiles de expresión de los genes involucrados en su síntesis AOS, AOC y OPR, adicionalmente se analizó el perfil del gen de la PDF (defensina) que se enciende una vez que el JA se eleva.

También se encontró que las plántulas de maíz inducen la expresión temprana de los genes AOS, AOC, OPR y PDF tanto al someterlas a una herida como la presencia de los dos hongos (primer día de tratamiento). Sin embargo, contrario a las PR y PAL el nivel de expresión fue aún más alto en las plantas que provienen de semillas que fueron tratadas con *T. asperellum*, sugeriendo de que el estímulo de defensa inducido por *Trichoderma* fue por la vía del jasmónico.

La inducción de la vía del JA ya ha sido encontrada tanto para *Trichoderma* como para otros organismos benéficos y rizobacterias (Zamioudis y Pierse, 2011; Shores et al., 2012; Pieterse et al., 2009; Van Loon, 2007). La planta responde ante la presencia de cualquier microorganismo montando una respuesta inmune, ya que la planta reconoce moléculas ajenas a ella. Sin embargo, el microorganismo interfiere con estas respuestas para poderse establecer en la planta. Por ejemplo, en el caso de *Rhizobium* se ha encontrado que la secreción de lipopolisacáridos le permite inhibir la respuesta de defensa de la planta, mientras que *Laccaria bicolor* secreta proteínas similares a las proteínas que se encuentran en el haustorio de basidiomicetos patógenos (SiHEP), y algunas proteínas pequeñas ricas en cisteínas (MiSSP) que pueden funcionar como efectores extra o intracelulares para suprimir la respuesta inmune del hospedero (Zamioudis y Pierse, 2011).

En nuestro caso no encontramos que *T. asperellum* llevara a una reducción en la respuesta de defensa de la planta, probablemente porque los tiempos en los que se examinó la defensa fueron después de 8 días de haber expuesto a las semillas de maíz al *biopriming*. Otra explicación es que la reducción en la respuesta de



defensa de la planta ocurre en el tejido colonizado, y en este trabajo se evaluó la respuesta de defensa a en las hojas de las plántulas con el *biopriming* de *Trichoderma*.

Asimismo, existe evidencia de la inducción de la vía del ácido jasmónico/ etileno por inoculación con *Trichoderma* a través del estímulo de peptaiboles secretados por el hongo, que conducen a la emisión de ácido jasmónico, etileno y compuestos volátiles (Shoresh *et al.*, 2010), lo cual hace que probablemente los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis del ácido jasmónico (AOS, AOC y OPR) aumenten.

En cuanto a la respuesta de las plántulas ante el reto con *F. verticillioides*, se encontró que se indujo la expresión de los genes implicados en la síntesis de JA, pero su expresión no es la misma entre las plántulas control y las que recibieron el *biopriming*, estas últimas presentaron aún más transcrito para AOS y AOC que las plántulas control. Mientras que la expresión de OPR en las plántulas con *biopriming*, a pesar de ser menor que el nivel de expresión de las plántulas control al primer día de la inoculación con *Fusarium*, mantienen un nivel alto y mayor de transcritos a los 4 días del tratamiento que las plántulas control retadas con *Fusarium* (C-FV).

La vía del jasmónico se enciende ante la presencia de una herida o bien ante hongos necrotrofos (Pieterse *et al.*, 2009). Como consecuencia a lo anterior se induce la expresión de genes que tienen que ver con la defensa, como la PDF, su transcripción se indujo tanto con la herida como con *F.verticillioides* a tiempos menores de 2 días de tratamiento. Es probable que ya que este último, que es un hongo de tipo hemibiótrofo, aún estuviera en su fase biótrofa y por tanto no llevará a la expresión de PDF a tiempos prolongados de inoculación.



Otra explicación a lo anterior es que se tiene documentado que existe una interacción de antagonismo entre las vías del SA y la del JA/ET. Se ha observado que mutaciones que interrumpen la señalización del ácido jasmónico llevan a un aumento en genes marcadores, como la PR en la vía del ácido salicílico, mientras que la interrupción en la señalización del ácido salicílico incrementa o induce los niveles de PDF1.2 (Kazan *et al.*, 2008), lo cual podría explicar el por qué nuestros niveles de expresión de las PRs comenzaron aumentando en los primeros tiempos post-infección, mientras que los niveles de la PDF disminuyen a estos mismos tiempos.

Por otra parte, se conoce que la respuesta mediada por ácido salicílico si bien muchas veces se inhibe ante la señal de ácido jasmónico/ etileno, hay genes que se inducen por ambas vías e incluso muestran un efecto sinergista para potenciar la defensa contra patógenos e insectos (Antico, *et al.*, 2012). Esto podría explicar el comportamiento de nuestros perfiles de expresión, ya que en ciertos tiempos post-infección, genes cuya expresión que debería ser opuesta muestran patrones similares. Este es el caso de PAL, AOS, AOC y OPR en donde se observó un aumento en la expresión génica en las plántulas que solamente fueron heridas y que provienen de semillas tratadas con el hongo biocotrol durante las primeras 48 h post-infección.

Con los resultados presentados, podemos sugerir que las plántulas de maíz mostraron una respuesta sistémica debida a la activación de ambas vías de defensa, la vía del ácido salicílico y la vía del ácido jasmónico/etileno. Es sistémica ya que las hojas de plántulas provenientes de semillas tratadas con *T. asperellum*, exhibieron menor daño en el tejido foliar y la ausencia de crecimiento de micelio aéreo del patógeno sobre las hojas de la planta, a pesar de que la inoculación de *F. verticillioides* se realizó en los tallos. Los niveles de expresión de los marcadores moleculares sugieren una hipersensibilidad en respuesta al patógeno, ya que la respuesta se presentó antes y más elevada en la vía del JA en las



plantas que fueron tratadas con *Trichoderma asperellum*. Esto aunado al aumento encontrado en la expresión de PR y PAL en respuesta a la vía del SA, lleva a que las plántulas puedan defenderse mejor ante un estímulo negativo como fue la inoculación con *Fusarium verticillioides*.

Para determinar la contribución a la defensa de cada una de las vías, se hace necesario analizar no solo el contenido hormonal en los tratamientos estudiados, sino también la actividad de proteínas que están relacionadas con la defensa e inducidas de manera específica por las dos vías analizadas, y aunado a los resultados de expresión presentados nos permitiría plantear si hay una diferencia temporal en cuanto a los eventos de defensa dependientes, de cada una de las vías de señalización analizadas.



X. CONCLUSIONES

El maíz Chalqueño sujeto a tratamiento con *T. asperellum* presentó a las 48 h de germinación una elongación radicular mayor y un adelanto en la presencia de raíces adventicias.

Las plántulas sometidas a biopriming mostraron resistencia frente a la infección con *F. verticillioides*, ya que el daño foliar que se observó fue menor. Además de que los niveles de clorofila no cambiaron en estas plantas.

Los genes evaluados en la vía del SA se expresaron independientemente del tratamiento que recibieron las plantas. Sin embargo, se encontró que el proceso de herida produjo un aumento en los niveles de expresión de los genes PR y PAL a tiempos tempranos de haberse llevado a cabo el estímulo, lo cual no había sido reportado con anterioridad. Mientras que los niveles de expresión para los genes involucrados en la vía del JA fueron más altos en las plántulas con *biopriming* que en las control.

Todo lo anterior sugiere que *Trichoderma asperellum* se comportó como microorganismo promotor del crecimiento vegetal e inductor de las defensas de maíz, al encender con mayor intensidad la respuesta de la vía del JA/Et en comparación con la vía de defensa dependiente del SA. Ante *Fusarium verticillioides*, la respuesta de las plantas con el *biopriming* de *Trichoderma* fue modular la vía de defensa de JA/Et y mantener la de SA, lo que permitió que las plántulas con *Fusarium* se mantuvieran sanas por más tiempo que las que no pasaron por el *biopriming*.



XI. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos anteriormente se pretende:

1. Comparar estos resultados con el perfil de diferentes hormonas como JA, SA, GA, IAA y ABA, para corroborar que los niveles de expresión de los transcritos impactan en la síntesis de algunas de estas hormonas y para explicar la fisiología de las plántulas que pasaron por el *biopriming* con *Trichoderma*.
2. Determinar la actividad de las proteínas de defensa involucradas en la vía del JA y SA, para corroborar que los niveles de expresión corresponden a cambios en la actividad de las proteínas.

XII. ANEXOS

XII.1 Anexo 1: Preparación y calibración y caculos del inóculo de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Se colocaron 100 μL de la suspensión de conidios de cualquiera de los 2 hongos en una cámara de Neubauer. Se realizó la cuenta de conidios, el número promedio de conidios que fueron contabilizados en los cuatro cuadrantes (áreas L de la Figura 25)

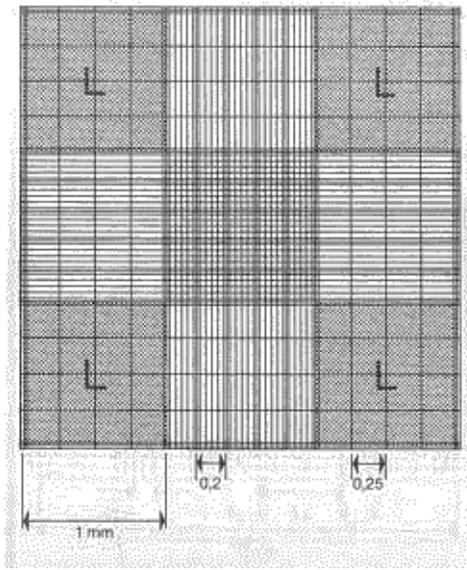


Figura 25.-Vista de la Cámara de Neubauer 10X. Tomado de Universitat de Barcelona, 2010.

Para obtener el número de conidios/mL se realizó el cálculo según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Conidios}}{\text{mL}} = \frac{(\text{Promedio de Conidios})FD}{\text{Volumen del cuadrante}}$$

Donde el volumen del cuadrante es:

$$(\text{Lado } L) \times (\text{Lado } L) (\text{Depresión central}) = (1\text{mm})(1\text{mm})(0.1\text{mm}) = 0.1\text{mm}^3$$



Convirtiendo mm^3 en mL

$$\left(\frac{1 \text{ mL}}{1000 \text{ mm}^3}\right)(0.1 \text{ mm}^3)=1.0 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

Por tanto

$$(\text{Promedio de conidios})(\text{FD}) \left(10^4 \text{ mL}^{-1}\right) = X \frac{\text{conidios}}{\text{mL}}$$

Factor de Dilución
empleado
Factor de corrección de la
Cámara de Neubauer (volumen
del cuadrante)

Entonces, supongamos que se obtuvo de la siguiente lectura de conidios:

Promedio de Conidios = 52 conidios y que para poder contarlos se hizo una dilución en donde se tomaron $10 \mu\text{L}$ y se llevaron a $1000 \mu\text{L}$ entonces

$$\text{FD} = \frac{1000}{10} = 100 \text{ (en general siempre se sugiere esta dilución)}$$

Por tanto

$$(52 \text{ conidios})(100)(10^4)=5.2 \times 10^7 \text{ conidios/mL}$$

Pasamos la concentración en términos de μL y queda que:

$$\left(\frac{5.2 \times 10^7 \text{ conidios}}{\text{mL}}\right)\left(\frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}}\right)=52 \text{ 000 conidios}/\mu\text{L}$$

Sabemos que cada plántula de maíz necesita $10 \mu\text{L}$ de inóculo que contengan 65000 conidios de *F. verticillioides*, por lo que:

$$10 \mu\text{L} \rightarrow 65000 \text{ conidios, es decir } \frac{65 \text{ 000 conidios}}{10 \mu\text{L}}=6500 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

Si suponemos que inocularemos 30 plántulas de maíz, entonces necesitamos $300 \mu\text{L}$ de inóculo.



Ahora solo resta aplicar la siguiente relación:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde:

C_1 =Concentración inicial de conidios (*después de resuspender el pellet*)

C_2 = Concentración final de conidios (*concentración del inóculo*)

V_1 =?

V_2 = Volumen a preparar de inóculo

Por tanto: $V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$

$$C_1=52\,000 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

$$C_2= 6500 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

V_1 =?

$V_2 = 1000 \mu\text{L}$ (*se prepara esta cantidad en vez de $300 \mu\text{L}$ ya que no se recomienda preparar exactamente el volumen justo necesario, además de que el inóculo sobrante es viable para utilizarse hasta por una semana después de su preparación*)

Por tanto:

$$V_1 = \frac{(6500 \text{ conidios}/\mu\text{L})(1000 \mu\text{L})}{(52\,000 \text{ conidios}/\mu\text{L})} = 125 \mu\text{L de suspensión concentrada de conidios}$$

Por lo que para **1000 μL** de inóculo se necesitan: **875 μL** (agua estéril desionizada)+ **125 μL** (suspensión concentrada de conidios)



XII.2 Anexo 2: Reactivos y medios de cultivo

Reactivo	Modo de preparación	Comentarios
Acetato de sodio 3M	Para preparar 50 mL Acetato de Sodio 3M, pesar 12.304 g de acetato de sodio (PM=82.03 g/mol) y disolverlos en 50 mL de agua DEPC	
Agar 1.0 %	Para preparar 300 mL de agar al 1%, disolver 3 g en 100 mL de agua desionizada, caliente en microondas a intensidad media para disolver los grumos, agregue 200 mL de agua desionizada y esterilice por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm ² (15 lb/in ²)	
Agua-DEPC 0.1 %	Para preparar 1 L de H ₂ O-DEPC a 999 mL de agua estéril desionizada se le agrega 1 mL de DEPC (Dietil pirocarbonato). Se coloca en agitación constante por una noche en un recipiente tapado, y al día siguiente se esteriliza el H ₂ O-DEPC por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm ² (15 lb/in ²)	Usar guantes
Agua estéril desionizada	Esterilizar agua desionizada en autoclave por 45 min a 121°C a una presión de 1.1Kg/cm ² (15lb/in ²)	
Bromuro de Etidio 0.5 mg/mL	En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar 50.0 µL de Bromuro de Etidio 10 mg/mL y 950.0 µL de agua estéril desionizada.	Sustancia mutagénica. Usar guantes y desechar aquello que estuvo en contacto con el bromuro de etidio.
Cloruro de Litio 8M	Para preparar 50 mL de LiCl 8M, disolver 16.056 g de Cloruro de Litio (MM = 42.39 g/mol) en 50 mL de Agua DEPC.	
EDTA 0.5 M pH=8.0	Para preparar 500.0 mL de EDTA 0.5 M (Ácido etilendiamina tetra acético), se pesa 93.05 g de EDTA disódico (MM=372.2 g/mol) y se disuelven en 400.0 mL de agua estéril desionizada, la solución permanece turbia a continuación se ajusta el pH a 8.0 con NaOH concentrado, entonces se clarifica y se afora al volumen con 100.0 mL de agua estéril desionizada.	A pH 8.0 el EDTA permanece como una solución incolora.
Etanol 70 % para extraer RNA	Para preparar 100 mL de etanol 70%, agregar 70 mL de etanol absoluto a un frasco con tapa previamente esterilizado, y completar el volumen con 30 mL de H ₂ O-DEPC.	
Gel de Agarosa 1 % con TAE	Para un gel de 35 mL, pesar 0.350 g de agarosa y depositarlo en un matraz erlenmeyer estéril. Agregar 34.3 mL de H ₂ O-DEPC, calentarlo en microondas a intensidad media por 45 s. Una vez tibio, se le adiciona 0.7 mL de	Usar guantes



	TAE 5X y 35 μ l bromuro de Etidio 0.5 mg/mL (1 μ L bromuro de Etidio 0.5 mg/mL por cada mL de gel).	
Hipoclorito de Sodio 2.0 %	Agregar 2 mL de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y 80 mL de agua estéril desionizada, a un matraz erlenmeyer o botella de 100 mL.	
PDA 0.5 X (Papa Dextrosa Agar 0.5 X)	Para preparar 250 mL de PDA al 0.5 X se disuelven en 50 mL de agua estéril desionizada 3.0 g de Papa Dextrosa Broth (PDB) 1X (24.0 ^g / _L), a continuación, se añaden 3 g de Agar para tener al final una concentración de agar al 1.2 %. Finalmente, se calienta en microondas a intensidad media para disolver los grumos, se afora a 250 mL con agua estéril desionizada y se esteriliza el medio preparado por 30 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm ² (15 lb/in ²)	
PDA 1 X (Papa Dextrosa Agar)	PDA 1X equivale a 39g de PDA por Litro, por tanto para preparar 250 mL de PDA 1X, disolver 9.75 g de PDA en 250 mL de agua desionizada y esterilizar por 30 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm ² (15 lb/in ²)	
SDS 10 %	Para preparar 100.0 mL de esta solución se agrega a un recipiente o fracaso de vidrio 10.0 g de SDS (dodecil sulfato de sodio, detergente aniónico que solubiliza membranas, proteínas y tejidos) y se afora con 100.0 mL de agua estéril desionizada.	Se recomienda usar cubrebocas para pesarlo
TAE 50X	Para preparar 1.0 L de TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X, se disuelven en 750.0 mL de agua DEPC 242.0 g de TRIS Base (MM=121.14 g/mol) y se agregarn 57.1 mL de ácido acético glacial, posteriormente se le adiciona 100.0 mL de EDTA 0.5 M (pH=8.0) y se ajusta el volumen a 1 L.	
		Utilizar botellas de vidrio estériles en todos los casos.



XII.3 Anexo 3: Preparación de material y recomendaciones

Material para realizar la extracción de RNA

Consideraciones generales: Para extraer RNA siempre se debe utilizar guantes y cubrebocas, trabajar en la campana de extracción, además de que los reactivos que se utilicen siempre deberán estar fríos (mantenerlos en refrigeración o en hielo a 4°C). Se podrá detener el procedimiento de extracción cuando a las muestras se les haya agregado Trizol o etanol, sin embargo se recomienda terminar la extracción el RNA en una sola sesión, y trabajar a lo máximo 10 muestras a la vez.

Morteros.- Para cada muestra o tratamiento se utiliza un mortero libre de RNAasas, para eliminar las RNAasas debe ser previamente tratado de la siguiente manera: Lavar el recipiente con agua y jabón, posteriormente agregar de 15.0 a 20.0 mL de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) y lavar con él las paredes del mortero ayunándose del pistilo, a continuación el mismo hipoclorito de sodio se deja reposar por 15 min. Al finalizar el tiempo enjuagar con H₂O-DEPC tanto al mortero como al pistilo, para así poderlos secar y envolver en papel aluminio. Finalmente se esterilizan en una autoclave por 60 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm² (15 lb/in²), se retiran y una vez tibios se almacenan a -70°C.

Puntas de micropipeta.- Las puntas libres de DNAasas con filtro.

Cámara de electroforesis.- La cámara y los peines de esta, que se utilicen para correr las muestras de RNA, se deberán lavar previamente con agua y una solución de SDS 10 %. La cámara se deja 30 min en agitación constante y moderada con SDS 10 %. Al finalizar el tiempo se enjuaga con H₂O-DEPC. Cabe mencionar que siempre se trabajará con guantes y una vez limpia la cámara nunca se debe tocar con las manos desnudas.



Material para q-PCR

Utilizar puntas con filtro y libres de DNAsas, las placas de 96 pozos, las cubiertas protectoras y todo el material que se utilice en esta técnica deberá ser manipulado con guantes y portando una bata limpia.

Por su parte, las placas de 96 pozos podrán reutilizarse hasta haber agotado los pozos disponibles, por lo cual se recomienda cubrir con la mica protectora toda la placa e ir retirándola conforme se vayan usando los pozos.

Se deberá trabajar en todo momento en una campana de flujo laminar y emplear micropipetas debidamente calibradas dado la sensibilidad del método.

XII.4 Anexo 4: Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real por SyBr Green para la detección de los niveles de transcritos relacionados con la defesna del maíz

Para evaluar la **Especificidad** del método se observó que los oligonucleótidos empleados para cada gen no formaran dímeros a temperaturas de fusión menores a 80°C, ni tampoco productos inespecíficos a diferentes temperaturas (Figura 26). Ya que solo se observó un único pico que muestra la temperaturas de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción, por lo que el producto de cada uno de estos es específico.

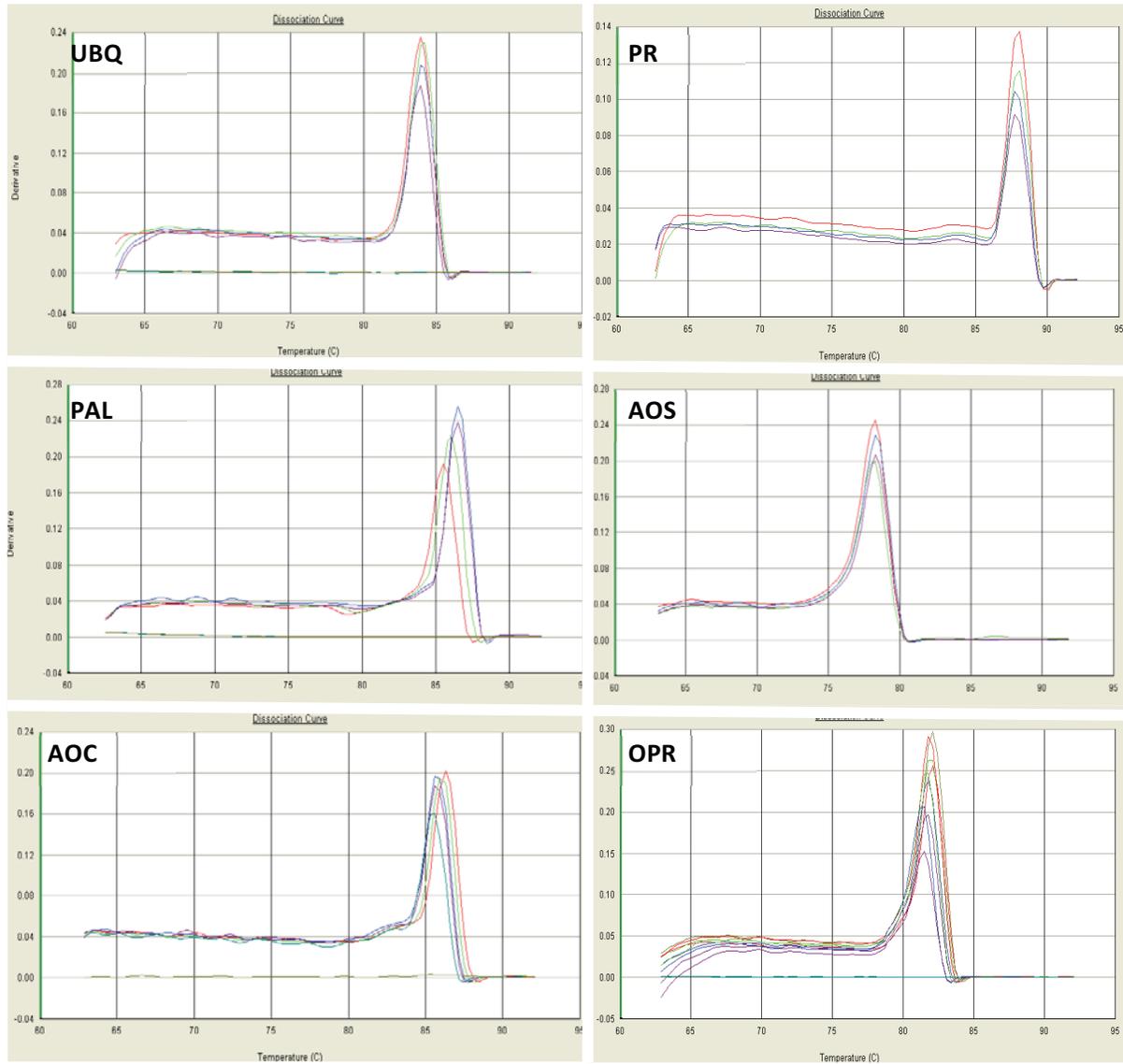


Figura 26.- Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados en la detección de los genes UBQ, PR, PAL, AOS, AOC y OPR por q-PCR

Para establecer la **eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad** del método se ajustó la línea base, el Threshold (umbral de detección e fluorescencia) para cada detector o gen, ya que un error experimental como la presencia de contaminantes, error de pipeteo, entre otros, pueden producir resultados que desvien la curva de amplificación típica, y por consiguiente generar “baseline” y “threshold” incorrectos. Asimismo se validó el ensayo mediante una curva estandar a partir de muestras de cDNA diluidas serialmente en ordenes de 2, la cual se se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada apareciera la curva típica de amplificación (Figura 27). La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclo en el cual la florescencia alcanza el threshold fijado) vs Log Concentración (cDNA diluidas serielamente en ordenes de 2), donde la pendiente debe ser cercana de -3.32, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación igual al 100 % (Figura 27). Por lo cual la fórmula empleada para calcular el % de eficiencia de amplificación a partir de la pendiente dada es:

$$\%E = \left(\left[10^{-1/m} \right] - 1 \right) \times 100$$

donde:

m= a la pendiente de la curva Ct vs LogConcentración

Considerándose como aceptable una eficiencia mayor del 90.0%



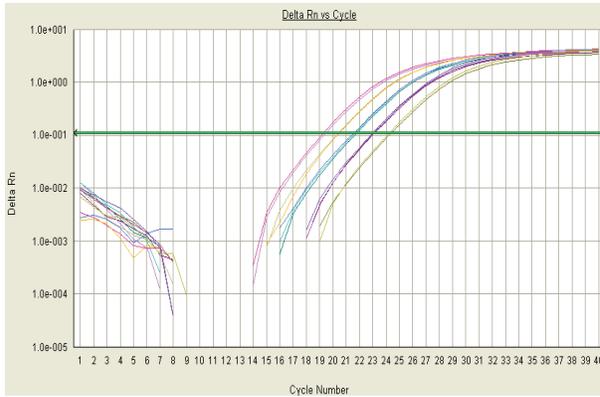
UBQ
Baseline:3-17
Threshold:0.0904
m=- 3.4864
%E = 93.57%



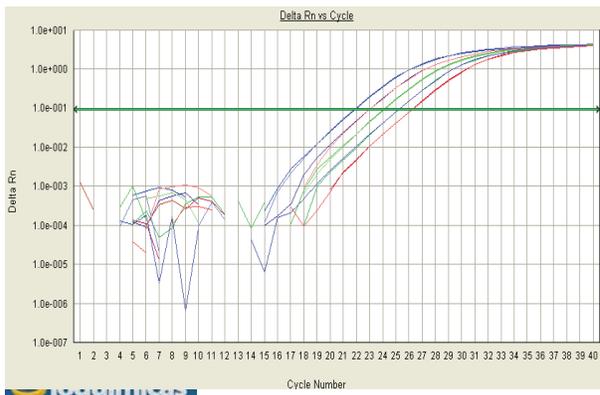
PRm
Baseline:3-17
Threshold:0.0106
 $m = -3.3979$
%E = 96.92%



PAL
Baseline:3-17
Threshold:0.0180
 $m = -3.3383$
%E = 99.32%



AOS
Baseline:3-17
Threshold:0.1121
 $m = -3.4337$
%E = 95.54%



AOC
Baseline:3-15
Threshold:0.0943
 $m = -3.4544$
%E = 94.75%





OPR
 Baseline:3-20
 Threshold: 0.0424
 m= -3.4337
 %E = 91.3%

Figura 27.- Curvas estándar de amplificación de los genes UBQ,PAL, PR, AOS,AOC y OPR. Se muestran los datos de Baseline, Threshold, pendiente (m) y el % de eficiencia para cada gen. Las concentraciones de cDNA utilizados fueron las generadas a partir de 1.0 µg de RNA.

Para verificar que el UBQ fuera un gen endógeno se realizó una ensayo utilizando diluciones seriadas de DNA molde proveniente de dos tejidos diferentes de maíz (embriones y hojas de plántulas de 10 días de crecimiento) y se verificó que los valores de Ct fueran semejantes (Tabla 12), ya que ello nos indica que el gen es un buen candidato para utilizarse como normalizador (endógeno) en los ensayos realizados

Tejido	µg de DNA templado				
	50	25	12.5	6.25	3.125
Hojas	23.04	24.29	25.44	26.50	27.26
Hojas	22.87	24.14	25.30	26.78	27.32
Embriones	22.72	24.21	25.35	26.88	27.90
Embriones en sorbitol	22.87	24.21	25.92	26.73	27.94

Tabla 12.- Valores de Ct de diluciones seriadas de DNA en diferentes tejidos de maíz



XIII. REFERENCIAS

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. San Diego California. Estados Unidos de América. Elsevier Academic Press pp 66-67.
- Alessandra, L; Luca, P; Adriano, M. 2010. Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. Journal Plant of Physiology 167: 1398:1406.
- Ankala, A; Kelley R. Y; Rowe, D. E; Williams, W. P; Luthe, D. S. 2013. Foliar herbivory triggers local and distance defense response in maize. Plant Science 199-200:103-112.
- Antico, C. J; Colon, C; Banks, T; Ramonell, K. M. 2012. Insights into the role of jasmonic acid-mediated defences against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. Frontiers in Biology 7: 48-56.
- Arciniega-Ruiz JM. 2012. Cambios en los niveles hormonales de embriones de maíz inducidos durante su interacción con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Avis, T. J; Gravel, V; Antoun, H; Tweddell R.J. 2008. Multifaced beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil Biology and Biochemistry 40: 1733-1740.
- Bacon C.W; Yates I.E; Hinton D.M; Filmore M. 2001. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. Environmental Health Perspectives 109: 325-332.
- Bari, R; Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology 69: 473-488.



- Barron, D. 1997. RNA Agents total RNA isolation system. *Promega Notes Magazine* 61: 33pp.
- Benítez, T; Rincón A. M; Limón, M. C y Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Bennett, J.W y Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516.
- Bonifaz, A. J. 2010. *Micología médica básica*. 3ª Edición. Mc Graw Hill. México, México. 7-29, 49-50 pp.
- Bush, J.B. 2001. *Fusarium verticillioides* infection, fumonisin contamination and resistance evaluation in North Carolina maize. Tesis de Maestría en Ciencias. North Carolina State University.
- Camarena-Gutiérrez, G; De la Torre-Almaraz, R. 2007 Resistencia Adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo* 13: 157-162.
- Catalogue of life. 2011. Taxonomic tree of the genus *Trichoderma* <http://www.catalogueoflife.org/browse/tree/id/2388319>
- Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT). 2010. Lista de Plagas y enfermedades del maíz. http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=51&lang=es
- Contreras-Cornejo, H.A; Macías-Rodríguez, L; Cortés-Penagos, C; López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 1579-1592.



- Desjardins, A. E; Hohn, T. M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:147-152.
- Desjardins, A.E; Plattner, R.D. 2000. Fumonisin B₁-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5773-5780.
- Druzhinina, I.S; Seidl-Seiboth, V; Herrera-Estrella, A; Horwitz, B. A; Kenerley, C. M; Monte, E; Mukherjee, P.K; Zeilinger, S; Grigoriev, I. V; Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Natures Reviews Microbiology* 9: 749-759.
- Du, L; Zhu, X; Gerber, R; Huffman, J; Lou, L; Jorgenson, J; Yu, F; Zaleta-Rivera, K; Wang, Q. 2008. Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:455-464.
- Granjo, C. A; Alves dos Reis, T; Gambale W; Correa B. 2007. Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*164:119–126.
- Gruber, S y Seidl-Seiboth, V. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*.158:26-34.
- Guzmán-Chávez, F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Halim, V. A; Vess A; Scheel, D; Rosahl, S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology* 8: 307-313.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*.96:190-194.



- Harman, G.E. 2008. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T.hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Biological Control: A guide to Natural Enemies in North America, Cornell University 1-14.
- Harman, G. E. 2011. Multifuncional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189: 647-649.
- Harman, G.E; Howell, C R; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Harman, G.E; Petzoldt, R; Comis, A; Chen, J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred Mol17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147-153.
- Howe, G. A. 2001. Ciclopentanone signals for plant defense: Remodeling the jasmonic acid reponse. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of The United States of America* 98: 12317-12319
- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control plant diseases: the historical and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87:4-10.
- Ibraheem, O; Hove, R. M; Bradley, G. 2008. Sucrose assimilation and the role of sucrose transporters in plant wound response. *African Journal of Biotechnology* 7: 4850-4855.
- Infante, D; Martínez, B; González, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24:14-21



- Instituto de Biotecnología Agrícola (INBIO).2011. Las biotecnologías. Las omicas. [En Línea] http://www.inbio-paraguay.org/interna/la_biotecnologia_17.html
- Iriti, M; Faoro, F. 2009. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 3371-3399.
- Jares, P; Campo E. 2003.Tecnología de *microarrays* de DNA en hematopatología. *Hematopatologica* 87: 35-40.
- Kazan, K; Manners, J. M. 2008. Jasmonate signalling: toward an integrated view. *Plant Physiology*. 146: 1459-1468.
- Kniskern, J.M; Traw, M.B; Bergelson, J. 2007. Salicylic acid and jasmonic acid signaling defense pathways reduce natural bacterial diversity on *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20: 1512–1522.
- Lastra, G; Manrique C. 2005. Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades. *Revista Colombiana de Reumatología*.12: 253-267.
- Leslie, J; Summerell, B; Bullock, S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Editorial Blackwell Publishing, Iowa, EUA. pp 274-278.
- Loake, G; Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Plant Biology* 10: 466-472.
- Lodha TD, Basak J. 2012. Plant-Pathogen Interactions: What Microarray Tells About It? *Molecular Biotechnology* 50: 87-97.



- Logrieco, A; Mulè G; Moretti, A; Bottalico A. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 597-609.
- Lorito, M; Woo, S.L; Harman, G. E; Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 395-417.
- Lucas, J.A. 1998. *Plant pathology and plant pathogens*. 3ª Edición. Blackwell Science. Reino Unido. 17 pp.
- Mackean, D. G. 2010. Maize plant. <http://www.biology-resources.com/drawing-plant-flower-15-maize-plant.html>
- Munkvol, G. P; Desjardins A. E. 1997. Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81: 556-565.
- Navarro, L; Bari, R; Achard, P; Lisón, P; Nemri, A; Harberd, N. P; Jones, J. D. G. 2008. DELLAS control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signalling. *Curren Biology* 18: 650-655.
- Nayaka, S; Niranjana, S; Shankar, A.U; Raj, S.N; Reddy, M; Prakash, H; Mortensen, C.N. 2010. Seed bioprimering with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43: 264-282.
- Nelson, P. E; Desjardins, A. E; Plattner, R.D.1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology* 31: 233-252.



- Nelson, P.E; Dignani, C ; Anaissie E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7:479-504.
- Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144:31-43.
- Perazzolli, M; Roatti, B; Bozz, E; Pertot I. 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defence without costs for grapevine. *Biological Control* 58: 74-82
- Pieterse, C. M. J; León-Reyes, A; Van der Ent, S; Van Wees, S.C. M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308-316.
- Pieterse C.M. J; Van Loon, L. C.1999.Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Science* 4:52-58.
- Pieterse C.M. J, León-Reyes, A. Van der Ent, S; Van Wees, S.C.M. 2009.Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*.5: 308-316.
- Ping, L; Boland, W. 2004.Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 9:263-266.
- Kazan, K; Manners, J. M. 2008. Jasmonate signalling: toward an integrated view. *Plant Physiology*. 146: 1459-1468.
- Ramírez, J; Chávez, L; Santillán, J.L; Guzmán, S. 2003. Microarreglos de DNA. *Mensaje Bioquímico, Facultad de Medicina-UNAM* 27: 97-120.
- Rivière, M. P; Marais, A; Ponchet, M; Willats, W y Galiana, E. 2008. Silencing of acidic pathogenesis-related *PR-1* genes increases extracellular β -(1 \rightarrow 3)-glucanase



activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal of Experimental Botany*. 59: 1225-1239.

Rice Knowledge Bank. 2011. Seed biopriming.

<http://www.knowledgebank.irri.org/qualityseedcourse/index.php/module-2-production-of-rice-seed-in-irrigated-mainmenu-103/2-seed-cleaning-and-treatment-before-planting-mainmenu-47/161-seed-biopriming>

Robert-Seilaniantz, A; Navarro, L; Bari, R.; Jones, J.D.G. 2007. Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10:372-379.

Rodriguez, I. P; Barrera, H. A.2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 7: 323-335.

Rossmann, A.Y.2009. The impact of invasive fungi on agricultural ecosystems in the United States. *Biological Invasions* 11:97-107.

Rutherford, R.S; Van Antwerpen, T; Conlong, D.E; Keeping, M,G; McFarlane, S. A; Vogel, J. L. 2002. Promoting plant health: potential for the use of plant-associated microorganisms in the biological control of pathogens and pests insugarcane. *Proceedings Congress of the South African Sugar Technologists Association* 76:289-300.

Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*. 96:195-206.

Sánchez-Rangel, D; San Juan-Badillo, A; Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8565-8571.



- Sánchez-Rangel, Sánchez-Nieto, S; Plasencia, J. 2012. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta*. 235:965-978.
- Schulze, A ;Downrard, J. 2001. Navigating gene expression using microarrays- a technology review. *Nature Cell Biology*. 3: E190-E195.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2008) http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Maiz/Descripción.pdf
- Shan, J; Zhang, Y; Peng, W; Wang, Z; Xie, D. 2009. Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 60: 3849-3860.
- Shoresh, M; Harman, G.E; Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*.48:21-43.
- Shoresh, M; Yedida, I; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signalling pathways in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Stavang, J. A; Lingard, B; Erntsen, A; Lid, S. E; Moe, R; Olsen, J. E. 2005. Thermoperiodic steam enlogation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiology* 138: 2344-2353.
- Strable, J; Scanlon M. 2009. *Maize (Zea mays): A model organism for basic and applied research in plant biology*. Cold Spring Harbor Protocols.1-10.
- Talbot, Nicholas J. 2010. Living the Sweet Life: How does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *Plos Biology* 8 :1-3.



- Thomma, B.P.H.J; Cammue, B.P.A; Thevissen, K. 2002. Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.
- Universitat de Barcelona. 2010. Técnicas de conteo celular. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>
- Van der Ent, S; Van Wees, S.C. M; Pieterse, C. M. J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70: 1581-1588.
- Van Loon, L. C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *The European Journal of Plant Pathology* 119: 243-254.
- Vinale, F; Sivasithamparan, K; Ghisalberti, E. L; Marra, R; Woo, S. L; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40:1-10.
- Vincent, P. L. D. 2002. *Zea mays* (maize, corn). *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7.
- Vlot, A. C; Dempsey, D'M, A; Klessig, D. F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review Phytopathology* 47:177-206
- Wahl, R; Wippels, K; Goos, S; Kämper; Sauer, N. 2010. A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *Plos Biology* 8:1-11.
- Wan Norhasima, W.M; Abdulmir, A. S; Abu Bakar, F; Son, R; Norhafniza, A. 2009. The health and toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. *American Journal of Infectious Diseases* 5: 283-291.



Wang, B; Yu, J; Zhu, D y Zhao, Q. 2011. Maize defensin ZmDEF1 is involved in plant response to fungal phytopathogens. *African Journal of Biotechnology* 10: 16128-16137.

Wullschleger, S. D y Difazio, S.P. 2003. Emerging use of gene expression microarrays in plant physiology. *Comparative and Functional Genomics* 4: 216-224.

Zamioudis, C; Pieterse, C. M. J. 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 139-150.

Zhang, L; Hu, Y; Yan, S; Li, H; He, S; Huang, M; Li. L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Molecular Biology* 79: 285-293.