



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de los transportadores SWEET de las
raíces de plántulas de maíz y su regulación por la
infección con *Trichoderma asperellum*.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GUADALUPE ITZEL PALACIOS VARGAS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Sobeida Sánchez Nieto
VOCAL:	Profesor: José Pedraza Chaverri
SECRETARIO:	Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez
1er. SUPLENTE:	Profesor: Aurora Lara Núñez
2° SUPLENTE:	Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Giovanna Paulina Aguilera Alvarado

SUSTENTANTE:

Guadalupe Itzel Palacios Vargas

Agradecimientos

El trabajo de tesis “Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por la infección con *Trichoderma asperellum*” de la alumna Guadalupe Itzel Palacios Vargas **se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto**, en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Recibió financiamiento a través de:

- DGAPA-PAPIIT proyecto PAPIIT IN217214.
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.

Asimismo, se agradece a la Dra. Carolina Peña Montes por la asesoría técnica proporcionada para el montaje de los ensayos de PCR en tiempo real.

Se agradece la ayuda técnica a la Q. Laurel U. Fabila Ibarra en el cuidado de las condiciones del invernadero y de los equipos utilizados en este trabajo.

Índice general

I. Índice de figuras	7
II. Índice de tablas	9
III. Abreviaturas	10
IV. Resumen	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. La planta de maíz.....	12
1.2. Importancia del maíz.	12
1.3. La estructura de la raíz.....	13
1.3.1. Sistema radicular embrionario.....	14
1.3.2. Sistema radicular post-embrionario.	15
1.4. Morfología y crecimiento de las raíces.....	16
1.5. Transporte vascular en plantas.	18
1.6. Transporte de agua en la raíz.	19
1.7. Transporte de azúcares en el floema.....	20
1.8. Transportadores tipo SWEETs.....	22
1.8.1. Papel fisiológico de los SWEETs.	23
1.9. <i>Trichoderma</i> como organismo promotor del crecimiento vegetal en plantas.	24
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL.....	30
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO	33

5.2.1.	Preparación y calibración del inóculo de <i>T. asperellum</i>	33
5.2.2.	Desinfección de semillas de maíz.....	33
5.2.3.	Obtención de plántulas control de 72 h de imbibición.....	34
5.2.4.	Tratamiento de biopriming con imbibición germinación	34
5.2.5.	Plantas maduras	34
5.3.	MÉTODOS	35
5.3.1.	Extracción de RNA.....	35
5.3.2.	Corrimiento en gel de RNA y calibración.	36
5.3.3.	RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa)....	37
5.3.4.	qRT-PCR (Transcriptasa Reversa. Reacción en cadena de la polimera en tiempo real).....	38
5.3.5.	Cuantificación de la expresión de los diferentes ZmSWEETs mediante qPCR.	40
6.	RESULTADOS	42
6.1.	Análisis <i>in silico</i> de la expresión de los SWEETs de maíz.....	42
6.2.	Raíces embrionarias y post-embrionarias de maíz Chalqueño.....	48
6.3.	Condiciones óptimas de expresión de los SWEET en raíces de maíz: Análisis por PCR punto final.	50
6.4.	Análisis por PCR punto final del efecto de <i>T. asperellum</i> sobre la expresión del mRNA de <i>ZmSWEET2</i> , <i>12a</i> , <i>12b</i> y <i>14b</i> en raíces embrionarias.	50
6.5.	Análisis por PCR punto final del efecto de <i>T. asperellum</i> sobre la expresión del mRNA de <i>ZmSWEET2</i> , <i>12a</i> , <i>12b</i> y <i>14b</i> en raíces post- embrionarias.	51
6.6.	Obtención de las condiciones óptimas para el análisis de la expresión de <i>ZmSWEET2</i> , <i>3b</i> , <i>12a</i> , <i>12b</i> y <i>14b</i> mediante qRT-PCR.	52
6.7.	Efecto de <i>T. asperellum</i> sobre la expresión de los SWEETs de raíces de maíz.	56
7.	DISCUSIÓN.....	58
7.1.	Selección de secuencias de los presuntos SWEET de maíz que se expresan en raíces.	58
7.2.	Expresión diferencial de los SWEET dependiente de la edad de las raíces.....	61

7.3. Efecto del biopriming en la expresión de los SWEET en las raíces.....	66
8. CONCLUSIONES.....	69
9. Perspectivas.....	70
10. REFERENCIAS.....	71
11. ANEXOS.....	78
A 1. Procedimiento para el cálculo de número de conidios de <i>Trichoderma asperellum</i>	78
A 2. Preparación del material para la obtención de RNA.....	80
A 3. Secuencias de nucleótidos de los posibles SWEETs de raíces de maíz.	81
A 4. Mapa de expresión que indica la presencia de cinco presuntos SWEET en las raíces. Datos obtenidos de la página MaizeGDB.	84
A 5. Imagen de los geles de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de <i>ZmSWEET2</i> , <i>12a</i> , <i>12b</i> y <i>14b</i> en cuatro lotes de raíces embrionarias. .	88
A 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los SWEETs12a y 12b de raíces de maíz.	89

I. Índice de figuras

Figura 1. El sistema radicular embrionario del maíz.15
Figura 2. El sistema radicular post-embrionario de maíz.16
Figura 3. Estructura anatómica de la raíz primaria de maíz.17
Figura 4. Estructura dimensional de SWEET en la membrana.22
Figura 5. Actividades multifacéticas de <i>Trichoderma</i>26
Figura 6. Efecto del biopriming con <i>T. asperellum</i> en el crecimiento de las plántulas de maíz y en la expresión del SWEET13a en hojas.29
Figura 7. Diseño general para el análisis de la expresión de los SWEETs de raíces de maíz.32
Figura 8. Crecimiento hidropónico de plantas de maíz en presencia de <i>Trichoderma asperellum</i>35
Figura 9. Gel de agarosa de la calibración de los RNA ribosomales de raíz de 72 h control y biopriming.36
Figura 10. Histogramas de los SWEETs elegidos revelando la localización en los diferentes tejidos del maíz.44
Figura 11. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los presuntos SWEETs de raíces de maíz.47
Figura 12. Efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> en el crecimiento de las plántulas de maíz.49
Figura 13. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos específicos para cada SWEET SWEET2, 3b, 12a, 12b y 14b, usando cDNA de raíces embrionarias.50
Figura 14. Efecto del biopriming en la expresión de los SWEETs en las raíces embrionarias de maíz.51
Figura 15. Niveles de expresión de los ZmSWEET2, 3b, 12a, 12b y 14b en raíces post-embrionarias.52
Figura 16. Curvas de disociación para los ZmSWEET2, 3b, 12a y 14b con sus valores de eficiencia de amplificación.54
Figura 17. Curva de disociación para ZmSWEET12b.55

Figura 18. Amplicones producidos con 7 pares distintos de oligonucleótidos diseñados para amplificar a ZmSWEET12b.56
Figura 19. Efecto del biopriming en la expresión de SWEET2, 3, 12a y 14a en raíces embrionarias y post-embrionarias de maíz.57
Figura 20. Predicción de cruces transmembrana de los presuntos transportadores SWEET de raíces de maíz.60
Figura 21. Estructura de SWEET2b.64
Figura 22. Vista de la Cámara de Neubauer 10X.78
A 4. Mapa de expresión que indica la presencia de cinco presuntos SWEET en las raíces. Datos obtenidos de la página MaizeGDB.84
A 5. Imagen de los geles de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de ZmSWEET2, 12a, 12b y 14b en cuatro lotes de raíces embrionarias.88
A 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los SWEETs12a y 12b de raíces de maíz.89

II. Índice de tablas

Tabla 1. Mezcla de reacción empleada en la reacción de Transcriptasa Reversa.37
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final de los SWEET de raíces de maíz. Las secuencias de los SWEETs fueron obtenidas de las bases de datos del GeneBank y de Ensemble.38
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los SWEET de raíces de maíz y del gen endógeno por qPCR. Las secuencias de los SWEETs fueron obtenidas de las bases de datos del GeneBank y de Ensemble.40
Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para la técnica qRT-PCR para los 5 pares de oligonucleótidos empleados.41
Tabla 5. Datos de los genes que codifican para los presuntos SWEETs de localización radicular.43
Tabla 6. Porcentaje de identidad de los cinco ZmSWEET seleccionados creado con Clustal2.1.45
Tabla 7. Resumen de la expresión, posible actividad y localización intracelular de los SWEETs de raíces de maíz.66

III. Abreviaturas

cDNA	DNA complementario.
DEPC	Dietil pirocarbonato.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato.
EDTA	Ácido etilendiamina tetraacético.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RNA	Ácido ribonucleico.
RT	Transcriptasa reversa.
STP	Proteína transportadora de hexosas.
SUT	Transportador de sacarosa.
SWEET	Transportador difusional de azúcares.
TAL	Activador transcripcional.
UBQ	Ubiquitina.

IV. Resumen

El transporte azúcares en una planta desde las hojas hacia los tejidos no fotosintéticos es vital para el crecimiento y desarrollo de la planta. Los transportadores de azúcares difusionales bidireccionales SWEET han sido implicados en procesos de llenado de floema, secreción del néctar, secreción de azúcares por las raíces y parte de la respuesta de interacción de la planta a ciertos patógenos. Lo anterior los hace buenos candidatos para modificar la disponibilidad, acumulación y uso de los azúcares en las plantas.

En nuestro grupo se demostró que el tratamiento pre-germinativo de semillas con el hongo benéfico *Trichoderma asperellum*, denominado biopriming, aumentó la superficie radicular, mejoró el crecimiento de la parte aérea e indujo la expresión de ZmSWEET13a en hojas de plantas de 7 días de crecimiento. El reto posterior con el hongo patógeno *F. verticillioides* indujo un aumento mayor en la expresión de ZmSWEET13a, sugerente de una pérdida de azúcares por parte de las hojas. Sin embargo, no se examinó el impacto de *T. asperellum* sobre la expresión de los SWEETs en las raíces, pese a que el hongo las coloniza. Por lo anterior, el objetivo del proyecto fue evaluar el efecto de *T. asperellum* sobre la expresión de los presuntos SWEETs que se expresan mayoritariamente en las raíces.

Se encontró en la base de datos ARAMEMNON que cinco presuntos SWEETs se expresan principalmente en raíces. Estos SWEETs se seleccionaron y se evaluó el efecto de *T. asperellum* sobre su expresión en las raíces embrionarias y post-embrionarias del maíz Chalqueño mediante PCR punto final y por qPCR. En raíces embrionarias se encontró que SWEET2, 12a y 14b sí se expresan, mientras que en las raíces post-embrionarias se encontraron SWEET2, 3b y 14b. Durante la interacción con *T. asperellum* en raíces embrionarias la expresión del SWEET14b fue la que más incrementó, mientras que en las raíces post-embrionarias el SWEET3b fue el que más se expresó. Esto último permite sugerir que la planta responde de manera diferente dependiendo su estadio de desarrollo y supone una regulación adicional a la presencia del hongo o sus exudados que modifica la expresión de los SWEET2 y 14b en las raíces pese a que ambos se encuentran en los dos tipos de raíces.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La planta de maíz.

El maíz o *Zea mays* es una planta que pertenece a la familia *Poaceae*, mejor conocida como *Gramineae*. La planta madura de maíz es similar a la de la caña, con un tallo largo, sin ramificaciones, en un extremo contiene las flores masculinas y en el otro a las raíces. La planta de maíz es monoica, es decir, que un individuo contiene a la vez tanto unidades reproductivas masculinas como femeninas. La inflorescencia masculina es un penacho amarillo llamada panoja que puede contener hasta 25 millones de granos de polen. Mientras que, las inflorescencias femeninas se encuentran a lo largo del tallo y se denominan espigas. Estas últimas se componen del olote que es un eje central y grueso que normalmente se encuentra envuelto de brácteas (hojas). A este conjunto de espiga y brácteas se le conoce como mazorca. Además, las mazorcas presentan unas estructuras parecidas a pelos que son los estilos por donde el polen penetrará para fecundar a los óvulos. Una vez ocurrido el proceso de fecundación, se formarán entre 400 y 1200 cariósides o granos de maíz (Vincent, 2012).

1.2. Importancia del maíz.

El maíz representa una de las principales fuentes de alimentación en el mundo, de acuerdo con los datos reportados en la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción de maíz a nivel global ha ido aumentando a lo largo de los últimos años, como reflejo de la creciente demanda y consumo, siendo así es el tercer producto más vendido a nivel mundial (SIAP-SAGARPA, 2016).

México es el sexto productor de maíz a nivel mundial, alrededor del 18% del valor total de producción del sector agrícola y 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional corresponden a este cultivo. Sólo en 2010, se produjeron en México poco más de 23 millones de toneladas, sin embargo la demanda es cada

vez mayor, por lo que tanto en México como en el mundo los estudios para mejorar la producción se han incrementado (SIAP-SAGARPA, 2016).

Independientemente del uso que se le dé al maíz ya sea para alimentación humana o animal, la producción de fibras y materiales para la industria textil, madera, papel, o biomasa para la producción de biocombustibles, es importante aumentar la producción; para lo cual es necesario incrementar los estudios sobre los mecanismos que permiten a las plantas asignar el carbono y los nutrientes para aumentar la productividad agrícola o específicamente dirigir la ganancia de carbono hacia algún tejido en particular (Yadav *et al.*, 2015).

1.3. La estructura de la raíz.

El establecimiento de una planta generalmente se mide por la altura, talla, número de hojas y frutos o granos, todos atributos de la parte aérea; sin embargo, sin un sistema radicular fuerte y funcional el desarrollo de la planta completa se afecta. Las funciones del sistema radicular son proporcionar soporte, agua, minerales e integrar las señales del suelo y microorganismos para responder o mantener la homeostasis en la planta.

Las raíces están sujetas a diferentes tipos de estrés como cambios en la disponibilidad de nutrientes, el exceso o déficit de humedad, el viento que afecta la parte aérea y por tanto la capacidad de la raíz de mantener a la planta erguida, la diferente textura y compactación del suelo o bien las interacciones con diferentes microorganismos que pudiesen perjudicar o ayudar al crecimiento de la planta al proporcionar minerales o bien, facilitar la absorción de estos (Aiken y Smucker, 1996).

En maíz, la formación del sistema de raíces es regulada por un programa endógeno genético, pero también depende de las señales que provienen de la rizósfera, que es una zona de interacción entre las raíces vegetales y los

microorganismos del suelo, esa adaptación a los cambios en las señales ambientales le permite continuar su crecimiento (Bennetzen *et al.*, 2009). Por ejemplo, cuando hay escasez de agua, un sistema radicular profundo se desarrolla; mientras que, para incrementar la adquisición de fósforo las raíces seminales y corona son cortas (Taiz y Zeiger, 2006).

Por otra parte, el maíz tiene una gran variedad morfológica y funcional del sistema radicular, y para facilitar su estudio puede dividirse en dos tipos: sistema radicular embrionario y el sistema radicular post-embrionario (Hochholdinger *et al.*, 2004).

1.3.1. Sistema radicular embrionario.

Durante la embriogénesis de la semilla de maíz, se forma la radícula y un tejido que la recubre, denominado coleoriza (Figura 1A). La familia *Poaceae* es la única que desarrolla una raíz endógena primaria dentro del embrión (Bennetzen y Hake, 2009). Esta raíz embrionaria o radícula emergerá a través de la cubierta de la semilla una vez que se lleve a cabo el proceso de germinación y además, es la que proporcionará soporte a la plántula (Salisbury, 1994).

Poco después de la salida de la radícula, aparecerán las raíces denominadas seminales, que pertenecen al grupo de raíces adventicias, es decir, que no emergen o son parte de la raíz sino de otras partes de la plántula. Las raíces seminales se originan del nodo escutelar del embrión (Figura 1B y C) y contribuyen al desarrollo de la planta ya que a través de ellas ocurre la absorción de agua del suelo mientras que los nutrientes provienen de las reservas almacenadas en la semilla. Tanto las raíces primarias como seminales pueden permanecer funcionales durante todo el ciclo de vida de la planta de maíz, aunque contribuirán poco al sistema radicular de la planta adulta (Hochholdinger *et al.*, 2004).

En la raíz primaria se desarrollan los pelos radiculares, que son extensiones casi cilíndricas de las células epidérmicas de la raíz con una longitud de varios

milímetros y que en número pueden alcanzar hasta 200/mm². Los pelos radiculares tienen como función ampliar la superficie de absorción de nutrientes en la raíz (Figura 1B) (Hochholdinger *et al.*, 2004).

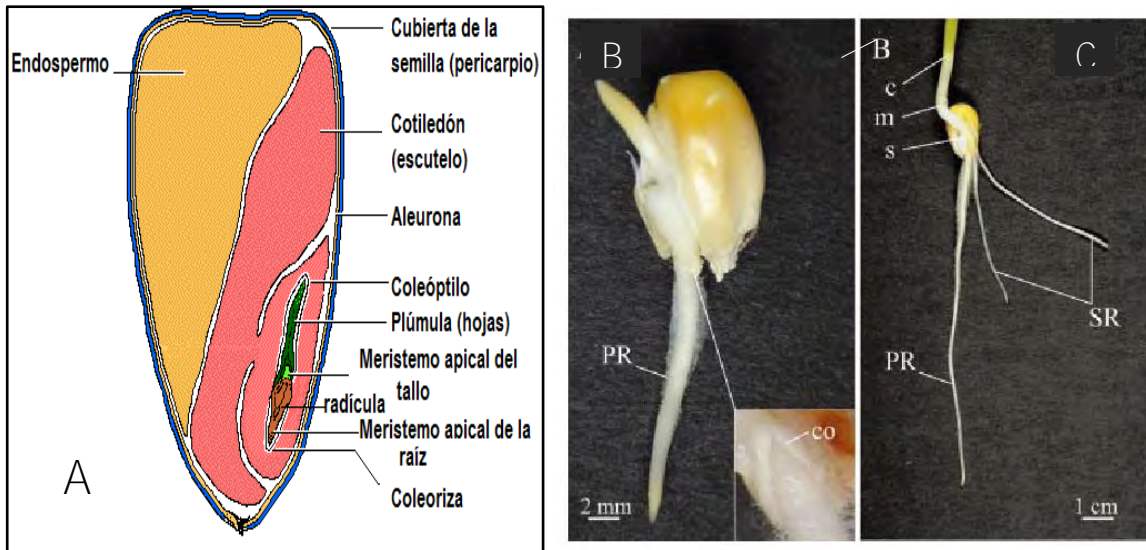


Figura 1. El sistema radicular embrionario del maíz.

A. La semilla de maíz madura con el embrión conteniendo a la radícula y a la estructura que la protege, la coleoriza (http://home.earthlink.net/~dayvdanls/monocot_seed.htm). B y C. La aparición consecutiva de dos tipos de raíz: (B) 3 ddg (días después de la germinación) y (C) 5 ddg. Los diferentes tipos de raíces están etiquetados con letras mayúsculas, otros términos que describen características específicas de la plántula de maíz están etiquetados en minúsculas. PR, raíz primaria; SR, la raíz seminal; co, coleoriza; c, nodo coleoptilo; m, mesocótilo; s, nodo escutelar (Hochholdinger *et al.*, 2004).

1.3.2. Sistema radicular post-embrionario.

El sistema radicular post-embrionario surge alrededor de dos semanas después de la salida de la radícula de la semilla. Se compone de los brotes o primordios de raíz formados en los nodos subterráneos, raíces corona y las raíces formadas en los nodos por encima del suelo a las cuales se les denomina raíces de anclaje (Fig. 2), cuya función es mantener anclada a la planta, además de participar en la toma de nutrientes y agua (Vincent, 2012; Hochholdinger *et al.*, 2004). El sistema radicular del maíz puede utilizar cerca de 6 m³ de suelo y dependiendo de la

textura y composición de este la raíz podrá penetrar alrededor de 1.5 a 1.8 m (Vincent, 2012).

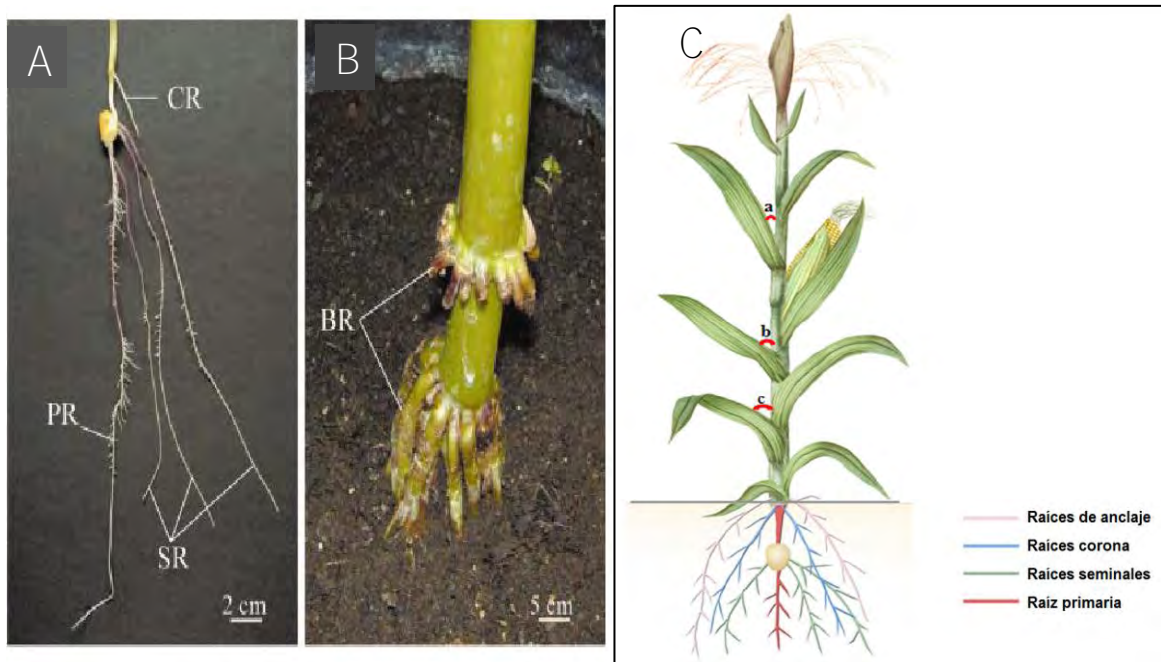


Figura 2. El sistema radicular post-embionario de maíz.

Se ilustra la aparición consecutiva de los cuatro tipos principales de raíz: (A) 10 ddg (días después de la germinación); (B) sistema de raíces de la planta adulta sobre el suelo cerca de seis semanas después de la germinación (Hochholdinger et al., 2004). C. sistema radicular de una planta madura de maíz PR, raíz primaria; SR, la raíz seminal; CR, raíz de la corona y BR, raíz de anclaje (Gong et al., 2015).

1.4. Morfología y crecimiento de las raíces.

El corte transversal de la raíz madura primaria permite observar a la médula central rodeada por un anillo de elementos vasculares (Figura 3A y B). El más grande de los elementos vasculares, el metaxilema, se compone de vasos que pueden ser más amplios que largos. Alrededor del metaxilema se encuentra el protoxilema y rodeando a los tejidos vasculares se encuentra una sola capa de células de paredes delgadas denominada periciclo. Dicha capa se encuentra delimitada por la endodermis, en el que una banda de Caspary es a menudo

evidente. Además, las células de esta capa contienen suberina que les permite bloquear de manera efectiva el paso de solutos así como los iones al cilindro vascular vía apoplasto. La presencia de la banda de Caspary permite mantener una concentración iónica más alta en el xilema que en el agua del suelo que rodea a las raíces lo que permite que el agua suba por el xilema (Freeling y Walbot, 1994).

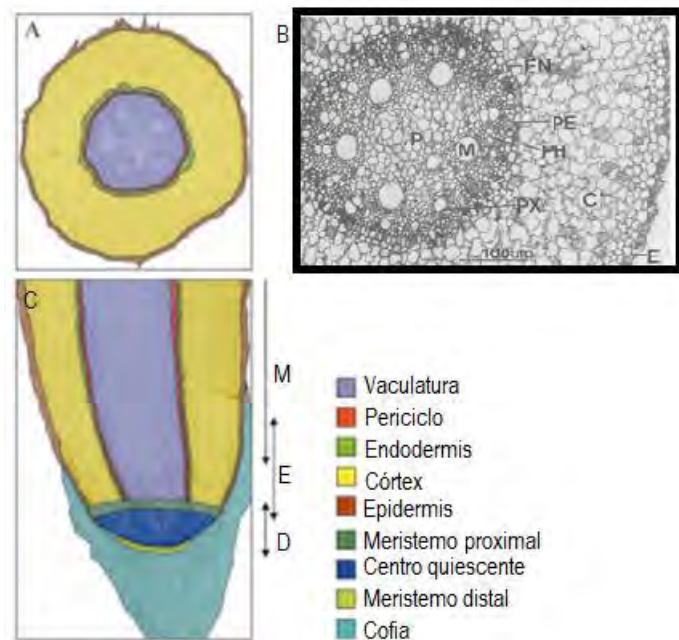


Figura 3. Estructura anatómica de la raíz primaria de maíz.

Se muestran las posiciones relativas de los diferentes tipos de células: (A y B) de sección transversal; médula central (P), metaxilema (M), protoxilema (PX), periciclo (PE), endodermis (EN), corteza (C), la epidermis (E), y el floema (PH) (Freeling y Walbot, 1994). (C) sección longitudinal en donde se indican las zonas de desarrollo del lado derecho. D, división; E, elongación; M, la maduración. Las imágenes en A y C son fotografías microscópicas de luz que han sido coloreadas (Hochholdinger *et al.*, 2004).

En la sección longitudinal, la región más distintiva de la raíz es la cofia de 2-3 mm; después se encuentra el meristemo apical, luego la zona de elongación (Freeling y Walbot, 1994) y por último la zona de maduración (Ishikawa *et al.*, 1995). La cofia cubre la punta de la raíz y secreta mucílago que facilita el movimiento de las raíces que crecen en el suelo. Proximal a la cofia está el ápice de la raíz subterminal, que consiste en el centro quiescente (QC), una región mitóticamente poco activa y formado de 800 a 1200 células en maíz y está rodeado por los

extremos de los meristemos proximal y distal. Las células meristemáticas son células morfológicamente indiferenciadas, pero especializadas en la función de dividirse ordenadamente; su estructura y fisiología son muy diferentes a las de cualquier otra célula del cuerpo de la planta.

Junto al meristemo proximal esta la zona de elongación distal en el que las células recién generadas comienzan a alargarse. La zona de elongación distal es una zona de transición entre la zona meristemática y la zona de elongación en el que las células son difíciles de clasificar de acuerdo a su actividad mitótica o coeficiente alométrico de la expansión. Esta zona juega un papel importante en la respuesta de las raíces del maíz a una variedad de señales ambientales exógenas. La zona de elongación distal está bordeada por la zona de elongación, donde las células no se dividen más pero se alargan al máximo. Además, proximal a la zona de alargamiento es la zona de la maduración, donde ocurre la formación los pelos radicales (Hochholdinger *et al.*, 2004).

La función de las raíces como ya se mencionó es la de servir de sostén, de aportar sales, de mover el agua del suelo hacia los tejidos en la superficie del suelo y también tiene un papel relevante en contribuir con señales de la presencia de microorganismos o plantas competidoras en el suelo. En las raíces la presencia del sistema vascular le permite hidratar y nutrir a la planta, sin embargo, también depende de los azúcares y aminoácidos que provienen de las hojas para mantener su crecimiento y también para exportarlos, función necesaria para reclutar microorganismos benéficos y que ha sido pobremente investigado.

1.5. Transporte vascular en plantas.

Para el transporte de solutos y agua las plantas tienen dos tejidos vasculares, el xilema y el floema, que se encuentran en todos los tejidos independientemente de su estadio y etapa del desarrollo de la planta. Ambos tejidos forman un sistema continuo de tejido vascular que se extiende por todo el cuerpo vegetal. El xilema es el principal tejido conductor de agua y minerales en las plantas vasculares,

cuyo movimiento es unidireccional desde el suelo hacia las partes aéreas. Mientras que, el floema se encarga del movimiento de solutos como sacarosa, aminoácidos, hormonas entre otros, moviéndolos desde las hojas, el lugar donde se sintetizan, o de lugares de almacenamiento hacia todas las partes de la planta (Lemoine *et al.*, 2013).

1.6. Transporte de agua en la raíz.

La vida de la planta depende de manera importante de la absorción por parte de las raíces de iones y agua, bases para las múltiples reacciones metabólicas (Escaso-Santos *et al.*, 2010). El agua entra en la raíz más fácilmente cerca de la punta de la raíz. Las regiones más maduras de la raíz a menudo tienen una capa exterior de tejido protector, llamado exodermis o hipodermis, que contiene materiales hidrófobos en sus paredes y es relativamente impermeable al agua.

En el suelo, el agua es transportada predominantemente por el flujo másico. Sin embargo, cuando el agua entra en contacto con la raíz, la naturaleza del transporte del agua se vuelve más compleja. Desde la epidermis hasta la endodermis de la raíz, existen tres vías por las cuales el agua puede fluir: el apoplasto, simplasto y vía transmembrana, las cuales se describen a continuación (Taiz y Zeiger, 2006):

1. El apoplasto es un sistema continuo de paredes celulares, espacios aéreos intracelulares y lumen de células que han perdido su citoplasma. En la ruta del apoplasto, el agua se mueve a través de paredes celulares.
2. El simplasto está formado por una red continua de citoplasmas de diferentes células interconectados por plasmodesmata, que son conductos formados de proteínas, retículo endoplásmico y membrana. En la ruta simplástica el agua viaja de célula a célula a través de plasmodesmata.
3. La vía transmembrana es la ruta que generalmente usa proteínas transportadoras localizadas en las membranas plasmáticas para moverse

célula a célula, desde el citoplasma hacia el apoplasto y de este al citoplasma de otra célula y así sucesivamente.

En todos estos mecanismos el movimiento del agua es difusional, es decir, que el transporte depende de la concentración de agua, es espontáneo ya que no requiere de energía para su transporte (Jiménez-García y Ruíz-Gutiérrez 2007). El proceso de difusión también depende de la naturaleza fisicoquímica del agua. Cuando el agua se mueve por los apoplastos entre las diferentes células o bien por plasmodesmata, no atraviesa ninguna membrana mientras que, cuando necesita atravesar la membrana puede hacerlo a una velocidad baja debido a que es una molécula polar. Para moverse más rápidamente necesita de una proteína, es decir por difusión facilitada, el cual es un proceso que no requiere consumo de energía y, por lo tanto es incapaz de dar lugar a gradientes de concentración a través de la membrana. Con frecuencia, los canales sirven como conductores de iones selectivos, sin embargo, muchos otros sustratos hidrófilos e hidrófobos también son transportados a menudo por transportadores, acarreadores, permeasas, porinas o canales, en el caso del agua hay porinas específicas que la transportan y se denominan acuaporinas (Conde *et al.*, 2011).

1.7. Transporte de azúcares en el floema.

El floema constituye un sistema de transporte intercelular a larga distancia, que moviliza los azúcares producidos por la fotosíntesis, moléculas mensajeras (RNA), así como otras sustancias, hacia las zonas de crecimiento y diferenciación. El floema utiliza la vía de comunicación simplástica que proporcionan los plasmodesmata, aunque la combinación de los sistemas simplásticos y transmembranales permite la movilización de fotosintatos y moléculas mensajeras, a corta y larga distancia en la planta. El sitio de producción o síntesis recibe el nombre de fuente y el sitio de consumo (áreas de crecimiento) o almacenamiento (raíces, tubérculos, frutos, semillas) se denomina demanda.

El concepto más ampliamente aceptado para explicar el transporte de azúcares en el floema es el de flujo de masa, donde por la diferencia de presión hidrostática en el floema entre el tejido fuente (alta presión) y el de demanda (baja presión) representa el movimiento de la savia. Para su supervivencia y crecimiento, la planta requiere producir y transportar nutrientes a los lugares correctos y en el tiempo correcto. Los fotosintatos son producidos mayormente en el mesófilo de las hoja y transportados hasta las venas menores, gracias a la actividad de las células de transferencia del floema que colectan, transportan los azúcares hasta el tubo criboso, remueven y reciclan los solutos que ingresan en el apoplasto de la hoja con la corriente transpiratoria (Flores-Vindas, 2013).

Las hojas superiores proveen la mayor parte de los nutrientes que consume el ápice, mientras que las inferiores suplen al sistema radical. Las hojas intermedias movilizan fotosintatos en ambas direcciones; la tasa de movimiento depende del vigor de los tejidos demanda. Cuando se remueve una fuente de producción o de demanda, se altera el patrón de movimiento que trata de compensar la pérdida (Flores-Vindas, 2013)

Entre los azúcares sintetizados en una planta, sólo unos pocos son transportados por el floema, cualquiera que sea la especie y el tipo de carga del floema, la sacarosa es la principal forma de carbono transportado. Además de sacarosa, se pueden también encontrar polioles (principalmente sorbitol y manitol) y oligosacáridos de la familia de la rafinosa. En muchas etapas a lo largo de la vida de la planta, transportadores específicos están implicados en el movimiento de célula a célula de sacarosa o en la compartimentación intracelular entre el citoplasma y orgánulos (Lemoine *et al.*, 2013).

Actualmente se tienen identificados tres familias de transportadores de azúcares involucrados en la nutrición de la planta. Dos de estas familias son transportadores secundarios o co-transportadores con protón: los transportadores de hexosas (STP) y de sacarosa (SUT) (Doidy *et al.*, 2012). STP y SUT se encargan de concentrar los azúcares en el citoplasma o en las vacuolas a expensas de los protones que se mueven de manera difusional a esos compartimentos.

Recientemente se describió un nuevo tipo de transportadores llamados SWEET, que transportan sacarosa o hexosas de manera difusional, y que se localizan tanto en la membrana plasmática como en las vacuolas (Chen *et al.*, 2015a; Eom *et al.*, 2015).

1.8. Transportadores tipo SWEETs.

Los SWEET están conservados filogenéticamente, se encuentran desde las arqueobacterias pasando por las plantas y los seres humanos. En las bases de datos de ARAMEMNON se encuentran los números de acceso de los transportadores de varias especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Vitis vinífera*, *Zea mays*, *Populus trichocarpa*, *Brachypodium distachyon*, *Solanum lycopersicum*, *Cucumis melo* y *Musa acuminata*. Se conoce que los SWEETs son familias multigénicas con 15 a 24 miembros en cada especie, excepto en humano que solo tiene 1 SWEET (Eom *et al.*, 2015).

Los SWEETs fueron descubiertos en *Arabidopsis* usando una herramienta que permite detectar a los azúcares en compartimentos específicos: los sensores FRET de glucosa o sacarosa (Chen *et al.*, 2010). A diferencia de los SUT y STP, los SWEETs son más pequeños ya que estos últimos tienen siete dominios transmembranales (Fig. 4), mientras que los primeros cruzan la membrana 12 veces (Chen *et al.*, 2015a).

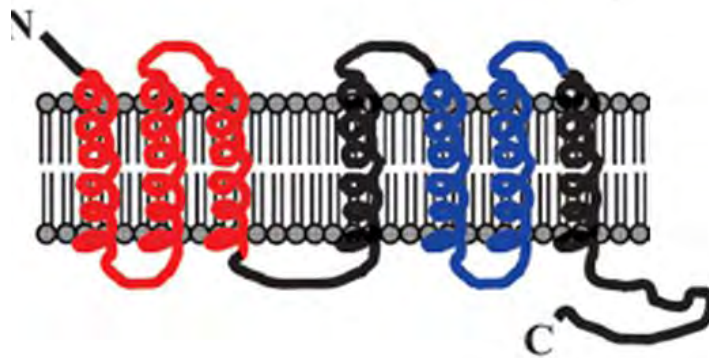


Figura 4. Estructura dimensional de SWEET en la membrana.
OsSWEET11 de *O. sativa* (Yuan y Wang, 2013).

Los SWEET son transportadores difusionales bidireccionales lo que significa que no sólo pueden catalizar el flujo de salida de los azúcares, sino también su absorción. Son transportadores de baja afinidad por glucosa o sacarosa, baja afinidad que puede ser interpretada como una función de los transportadores especializados en altas tasas de recambio (Yuan y Wang, 2013; Chen *et al.*, 2015a).

1.8.1. Papel fisiológico de los SWEETs.

Antes de la caracterización de los SWEET se desconocía como se transportaban los azúcares hacia el floema siendo que hay células que están aisladas simplásticamente, es decir que carecen de plasmodesmata. Se demostró en *Arabidopsis* que AtSWEET11 y 12 se expresan en las hojas en el parénquima cercano a las células del floema. La carencia de ambos SWEETs llevó a la acumulación de almidón en las hojas, lo que demostró que los SWEETs son necesarios para el llenado del floema con azúcares (Chen *et al.*, 2010; 2012).

Sin embargo, la exportación de azúcares es necesaria en otros procesos fisiológicos. Por ejemplo, mutantes en AtSWEET9 dieron evidencia de la participación de los SWEETs en la formación del néctar, el cual es necesario para la atracción de polinizadores. AtSWEET9 está localizado en la membrana plasmática y exporta sacarosa, lo que acoplado a la actividad parcial de la invertasa sobre la sacarosa lleva a que el nectario contenga sacarosa, glucosa y fructosa. Además, se ha demostrado que parálogos de AtSWEET9 en *Brassica rapa* y *Nicotiana tabacum* también participan en la salida de azúcares del parénquima del nectario hacia el apoplasto (Lin *et al.*, 2014).

Durante el proceso de llenado de la semilla es necesario un gran aporte de carbono para la acumulación de las reservas que serán usadas en la siguiente etapa de la vida de la planta, la germinación. Se encontró que AtSWEET11, AtSWEET12 y AtSWEET15, se expresan en las semillas en desarrollo de *Arabidopsis*, en particular los tejidos maternos. Triples mutantes en AtSWEET11,

12 y 15 presentaron un desarrollo incompleto de la semilla con una reducción en la acumulación de lípidos (Chen *et al.*, 2015b). En maíz se describió que la mutante SWEET4c acumuló 1/3 del almidón, con un patrón morfológico similar al de las mutantes miniatura, que carecen de actividad de invertasa en los 2/3 del endospermo (Sosso *et al.*, 2015).

Además, los SWEET pueden ser manipulados por agentes patógenos de plantas. Algunos SWEET de arroz presentan regiones promotoras que son blanco de varios efectores TAL (Transcriptional Activator-Like proteins). Los efectores TAL son proteínas con capacidad de factores de transcripción secretados por algunos microorganismos y entregados en el citoplasma de la planta a través de un sistema tipo jeringa denominado sistema de secreción tipo III. Los TAL entran al núcleo para inducir la expresión de SWEET específicos, garantizando la entrega de sacarosa en el apoplasto de las células colonizadas. *Xanthomonas oryzae* es capaz de manipular a 5 de los 21 SWEETs de arroz (Cohn *et al.* 2014; Streubel *et al.*, 2013). La manipulación de la expresión de los SWEETs a través de modificar a los efectores TAL es una propuesta interesante para alterar el flujo de carbono de la planta. Aunque, hasta ahora no se ha dilucidado el mecanismo, se sabe que muchos microorganismos incluyendo bacterias simbióticas, micorrizas y oomicetos inducen la expresión de SWEETs durante la colonización de la planta (Chen *et al.*, 2015a). Por lo tanto, es tentador especular que la evolución convergente podría haber hecho que el promotor de algunos SWEET sea objetivo muy atractivo para los organismos biotróficos (Cohn *et al.* 2014; Streubel *et al.*, 2013, Manck-Götzenberger y Requena, 2016).

1.9. *Trichoderma* como organismo promotor del crecimiento vegetal en plantas.

La mayor parte de las plantas presentan microorganismos endofíticos, sobre todo en la raíz, los cuales en su mayoría son benéficos. Un ejemplo de estos son las

micorrizas que al descomponer la materia muerta permiten el reciclaje y recaptura de estos nutrientes que al donarlos a la planta le permiten mejorar su crecimiento (Qi y Zhao, 2012). A cambio la planta provee de carbono y otros nutrientes para que el microorganismo se mantenga en la planta.

El hongo *Trichoderma spp.* pertenece a la subdivisión *Deuteromycete*, que se caracteriza por la formación de conidios; es un hongo anaerobio facultativo, de reproducción asexual y anamorfo que puede estar presente en la materia orgánica de suelos y residuos de cultivos, ya que es un hongo de vida libre en el ecosistema de raíz y en suelos (Rincón, 1992; Cupull *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004a).

La morfología microscópica del género *Trichoderma* incluye conidios, conidióforos, hifas hialinas septadas y fialides. Los conidios son unicelulares de forma redonda o elipsoidal, con diámetro de 3 μm aproximadamente, que tienen una pigmentación verdosa (Kubicek *et al.*, 1998). Su morfología macroscópica se caracteriza en colonias de aspecto algodonoso con tonalidades verdosas, dando la apariencia de anillos en forma concéntrica. Sus condiciones óptimas de crecimiento son temperatura de 25°C, humedad 70%, pH 6-6.5.

Las propiedades del género *Trichoderma spp.*, son de gran importancia económica para la industria, ya que se puede utilizar como biofungicida comercial, como estimulante del crecimiento vegetal y también para la degradación de xenobióticos. Muchas cepas de *Trichoderma* no sólo son capaces de controlar los patógenos que causan enfermedades de las plantas, sino que también son capaces de promover el crecimiento y desarrollo de la planta, así como estimular sus vías de defensa (Fig. 5; Singh *et al.* 2014).

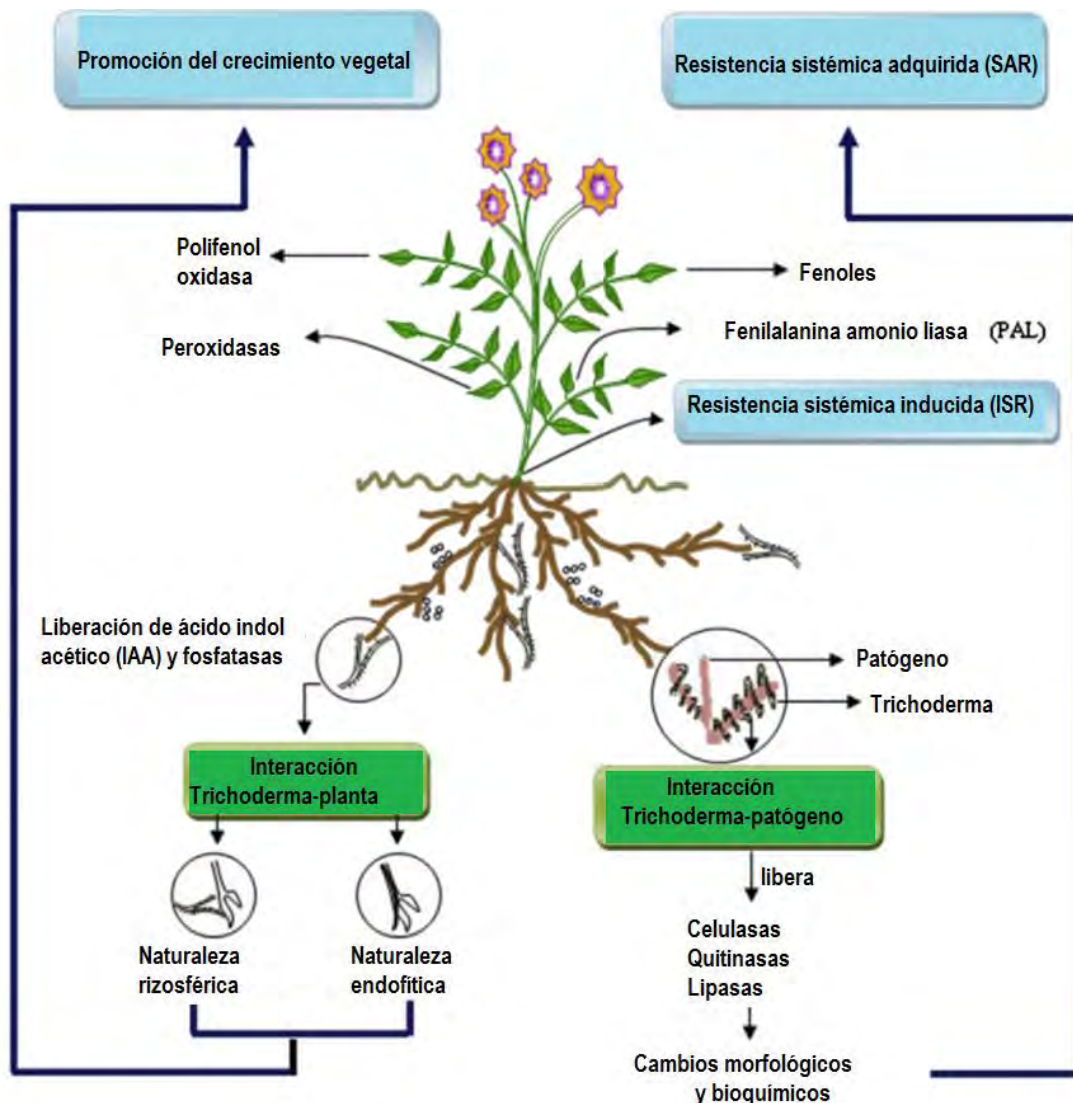


Figura 5. Actividades multifacéticas de *Trichoderma*.
Tomado y modificado de Singh *et al.* 2014.

El género *Trichoderma* secreta gliotoxina, acetaldehídos y viridina entre otros antibióticos (Dennis y Webster, 1971), así como producción de sustancias volátiles con un pronunciado aroma a coco de naturaleza biocida que presentan las α -pironas, terpenos, derivados de isocianuro, (Keszler *et al.*, 2000; Howell *et al.*, 1993; Stefanova *et al.*, 1999). Además inhiben o promueven la germinación en condiciones *in vitro* dependiendo de la concentración de hongos, y promueven el crecimiento radicular en semillas de dicotiledóneas, así como también en monocotiledóneas, por ejemplo maíz (Bailey y Lumsden, 2004; Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria, 2015).

Las moléculas producidas por *Trichoderma* y/o su actividad metabólica también promueven el crecimiento de la planta (Yedidia *et al.*, 1999), la colonización del sistema radicular resulta en un mayor desarrollo de la raíz y/o sistemas aéreos (Kubicek y Harman, 1998), mejora la asimilación de humedad y nutrientes (Harman, 2006; Vinale *et al.*, 2008), además de acelerar el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios los cuales aumentan la germinación, el volumen, la altura, así como el peso de la planta (Moity, 1982; Cupull *et al.*, 2003), puesto que este género secreta fitohormonas y también produce reguladores del crecimiento (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Además de la producción del néctar (Lin *et al.*, 2014) hay otros procesos en los que la exudación de azúcares es necesaria, por ejemplo, la salida de azúcares en las raíces para reclutar microorganismos benéficos. Las raíces de maíz exudan ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas, sales y azúcares, con una pérdida de 7-11 % de los fotosintatos fijados y corresponde al 25% del carbono transportado a las raíces (Haller y Stolp, 1985; Carvalhais *et al.*, 2011). Durante la interacción planta-microorganismo aumenta la diversidad de compuestos químicos en la rizósfera, encontrándose fitoalexinas, proteínas de defensa entre otras moléculas secretadas por la planta. Los microorganismos por su parte también contribuyen con una variedad de moléculas entre ellos: péptidos, proteínas, compuestos fenólicos y una gran gama de quimo-atrayentes que les permite agregarse en o cercano a las raíces (Walker *et al.*, 2003).

Los transportadores que podrían encargarse de la salida de los azúcares de la planta son los tipo SWEET, que en maíz se presume existen 23 sin embargo sólo uno de ellos ha sido caracterizado: ZmSWEET4c (Sosso *et al.*, 2015). Es por ello que el primer paso para la evaluación del papel de los transportadores del tipo SWEET en la exudación de azúcares es identificar aquellos que se están expresando.

En los estudios previos en el laboratorio se demostró que la imbibición de semillas de maíz con el hongo *Trichoderma*, tratamiento denominado de biopriming, modificó el crecimiento de la raíz (Figura 6A) y mejoró el crecimiento de la parte aérea (Figura 6B; Guzmán-Chávez, 2013); además de inducir la expresión de ZmSWEET13a en hojas de plantas de 7 días de crecimiento (Figura 6C, Carvente-García, 2014; López-Coria, 2015). Un aumento transitorio y mayor se produjo cuando se realizó la infección con el hongo patógeno *F. verticillioides* (Carvente-García, 2014).

Por lo que como continuación a los trabajos mencionados, en el presente estudio se utilizaron plantas de maíz que fueron tratadas con el hongo *T. asperellum* y se evaluó la expresión de los transportadores tipo SWEET en las raíces de maíz. Si

bien el estudio es descriptivo en términos de identificar cuáles SWEETs se expresan más en presencia del hongo en las raíces, era necesario realizarlo para posteriormente decidir cuáles de estos habría que clonar y caracterizar funcionalmente para determinar cómo ocurre la regulación del transportador en la planta; lo que podría ayudar al entendimiento del flujo de carbono y ser usado para aumentar el rendimiento de los cultivos de maíz.

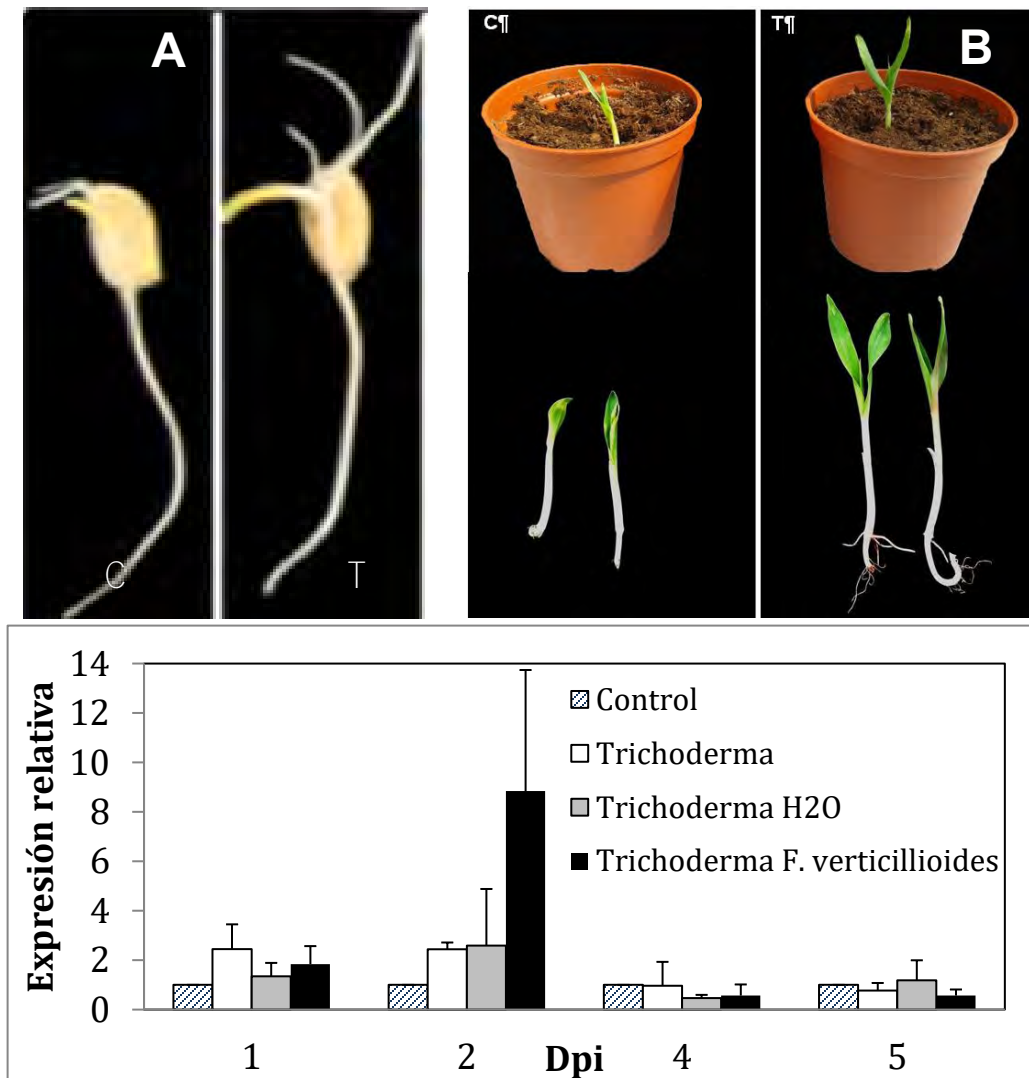


Figura 6. Efecto del bioprimering con *T. asperellum* en el crecimiento de las plántulas de maíz y en la expresión del SWEET13a en hojas.

A. Plántulas de 72 h de crecimiento con o sin tratamiento con *T. asperellum* (Tomado de López-Coria, 2015); **B.** Plántulas de maíz de 15 días de crecimiento con o sin tratamiento con *T. asperellum* (Tomado de Guzmán-Chávez, 2013). **C.** Expresión relativa del SWEET13a en las hojas de plántulas que provienen del tratamiento de bioprimering y la posterior infiltración del hongo patógeno *Fusarium verticillioides*. Dpi, días post-infección con *F. verticillioides* o agua (Tomado de Carvente-García, 2014).

3. HIPÓTESIS

Si *T. asperellum* es un hongo que coloniza las raíces de maíz, mejora el crecimiento de la planta y aumenta la expresión de ZmSWEET13a en las hojas, entonces los SWEETs de las raíces también aumentarán su expresión para permitir el crecimiento del hongo en las raíces.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de *T. asperellum* sobre la expresión de los presuntos SWEETs que se expresan mayoritariamente en las raíces de plántulas de maíz.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar a los presuntos SWEETs que se expresan preferencialmente en las raíces mediante análisis *in silico*.
2. Diseñar oligonucleótidos para determinar los niveles de transcritos para los presuntos SWEET mediante PCR semicuantitativo y cuantitativo.
3. Determinar los niveles de mRNA para los presuntos SWEETs de las raíces de plántulas de maíz mediante PCR semicuantitativo y cuantitativo.
4. Analizar el efecto que *T. asperellum* tiene sobre la expresión de los presuntos SWEETs en las raíces del maíz.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para responder a los objetivos, se dividió el trabajo en dos partes: La primera incluyó el análisis *in silico* de las secuencias de los SWEET para establecer que transcritos se iban a analizar y el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de dichos transcritos. Mientras que, la segunda parte comprendió el proceso experimental que se esquematiza en la Fig. 7 y que llevó a obtener los perfiles de expresión de los SWEETs de raíces de plántulas tratadas con el hongo benéfico *T. asperellum*.

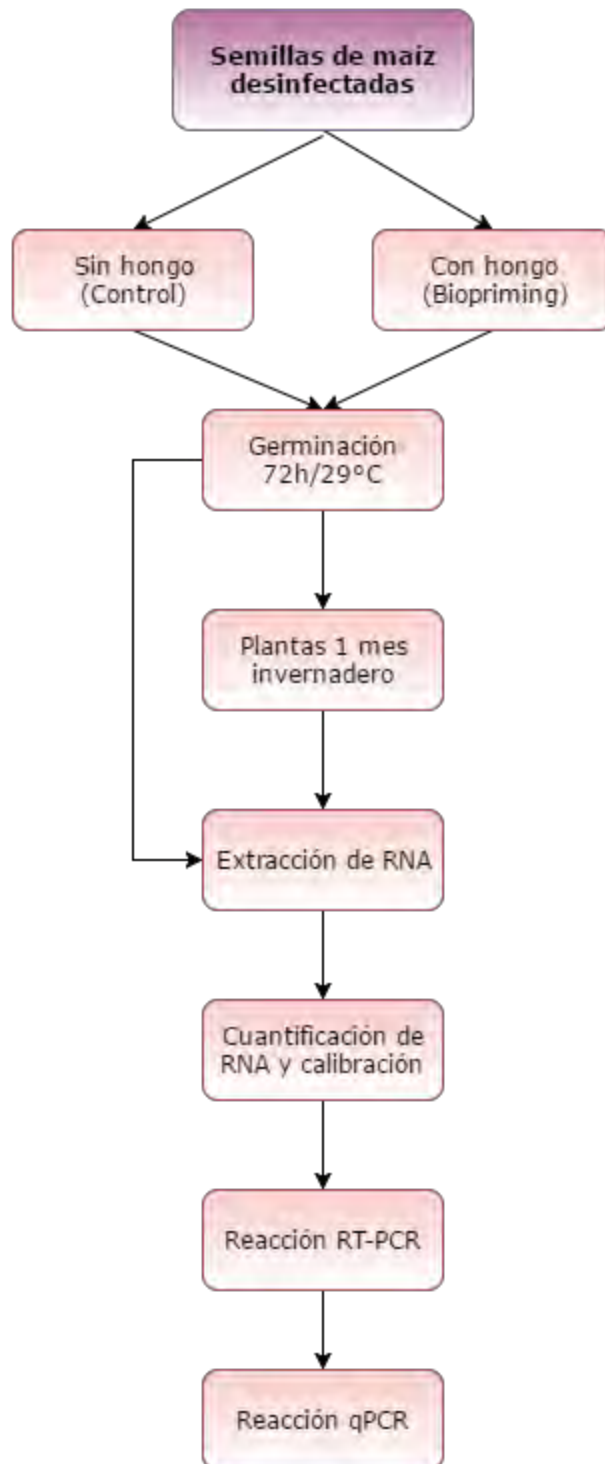


Figura 7. Diseño general para el análisis de la expresión de los SWEETs de raíces de maíz que pasaron o no por el biopriming con *T. asperellum*.

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO

5.2.1. Preparación y calibración del inóculo de *T. asperellum*.

Se realizó de acuerdo a lo descrito por Guzmán-Chávez (2013). En condiciones de esterilidad, se agregaron 5 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *T. asperellum* de dos semanas de crecimiento, el cual se encontraba en una caja Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) al 1X. Posteriormente, la caja se colocó en agitación constante y moderada por 30 min a temperatura ambiente. Se recolectó la “suspensión de conidios” en microtubos estériles de 1.5 mL y se centrifugaron a 13000 g, por un lapso de 15 min a 4°C en una centrífuga Universal 320 R Heittich Zentrifugen. Se desecharon las tres cuartas partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones obtenidos, se mezclaron las suspensiones de los botones en un solo microtubo aforándolo a 1.5 mL. Nuevamente, se centrifugó a 13000 g por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1mL de agua estéril desionizada, obteniéndose así una suspensión concentrada de conidios.

Para su cuantificación, en un microtubo no estéril de 1.5 mL, se agregaron 990 µL de agua estéril desionizada y 10 µL de la suspensión concentrada de conidios, dilución 1:100, de la cual se tomaron 20 µL para cargar la Cámara de Neubauer y realizar el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes con el microscopio óptico Olympus CH30 (Véase A 1). Finalmente, para mantener al hongo, se sembraron 10 µL de la suspensión concentrada de conidios en cajas Petri con PDA 1.0X y todo el material que estuvo en contacto con el hongo se dejó en hipoclorito de sodio comercial (5%) por una noche.

5.2.2. Desinfección de semillas de maíz.

Lotes de 80 semillas se lavaron con una solución al 2% de Cloralex (0.12% NaOCl) 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.

5.2.3. Obtención de plántulas control de 72 h de imbibición.

Se colocaron 80 semillas previamente desinfectadas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 80 mL de agua estéril desionizada. Después, las semillas se embebieron en cajas cuadradas de plástico, de 30 X 30 cm con 1% Agar (40 semillas por caja) a 29°C en obscuridad por 72h, utilizando para ello la incubadora Incubator Lab-Line. Pasado ese tiempo se cortaron las raíces y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2.4. Tratamiento de biopriming con imbibición germinación.

Se colocaron 80 semillas de maíz en 80 mL de agua estéril desionizada inoculada con una suspensión de conidios de *T. asperellum* para obtener una concentración final de 1000 conidios/mL. Se colocaron en cajas cuadradas de plástico, de 30 X 30 cm, sobre 1% Agar (40 semillas por caja) a 29°C en obscuridad por 72h. Pasado ese tiempo se cortaron las raíces y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2.5. Plantas maduras.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento de imbibición antes descrito para las semillas control y biopriming, pero después de las 72 h a 29°C de incubación, las plántulas se trasplantaron para crecer en hidroponía. Las plántulas se colocaron en un recipiente de plástico que contenía medio de Hoagland necesario para que se desarrollarán y se incubaron en condiciones de invernadero durante 3 semanas, para completar un tiempo de crecimiento de 4 semanas (Fig. 8). Transcurrido este tiempo, se cortaron las raíces se les quitó el exceso de agua con papel absorbente y posteriormente se almacenaron a -70°C.



Figura 8. Crecimiento hidropónico de plantas de maíz en presencia de *T. asperellum*. Las plantas estuvieron en medio de Hoagland por un mes. Se muestran los lotes de plantas usados.

5.3. MÉTODOS

5.3.1. *Extracción de RNA.*

Se probaron varios métodos, el siguiente es el que produjo RNA de alta calidad, rendimiento y en corto tiempo. Para la extracción de RNA, se colocó el tejido en un mortero libre de RNAsas (A 2) previamente enfriado, pulverizando el tejido con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Después se colocaron 500 mg del polvo en un microtubo y se agregó 1 mL de Trizol, se mezcló en vórtex hasta que la muestra se resuspendió y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Al concluir este tiempo, se agregaron 200 µL de cloroformo, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 min 4°C en una centrifuga Universal 320 R Heittich Zentrifugen. El sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se agregaron 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C y se decantó para lavar el botón con 1 mL de 70% etanol frío. La muestra se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4°C, se decantó y secó a temperatura ambiente. Finalmente el botón fue disuelto en 30 o 60 µL de agua libre de RNAsas.

5.3.2. Corrimiento en gel de RNA y calibración.

La cuantificación de RNA se realizó mediante el equipo Nanodrop de la marca Thermo Scientific, modelo 2000. Se calculó el volumen requerido para tener 1 µg de RNA y este se mezcló con 2 µL de amortiguador de carga Blue/Orange 6X y se completó el volumen con H₂O-DEPC c.b.p. 10 µL. Posteriormente para visualizar la integridad del RNA, este se corrió en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris Acetato EDTA) 1x y bromuro de etidio 0.5 µg/mL, para lo cual se usó una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT. La electroforesis se realizó usando amortiguador TAE 1X, y aplicando 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.

Para la calibración, el RNA de las raíces control y biopriming se separaron en un gel de agarosa bajo las condiciones antes descritas, después del corrimiento se visualizó bajo la luz UV en un transiluminador y se midió la densitometría de la banda del 28S RNA ribosomal con el equipo KODAK Image Station, modelo 400R-PRO, si la intensidad de la banda del RNA ribosomal 28S no era similar entre las diferentes muestras entonces se variaba el volumen hasta que se logrará obtener una intensidad similar, lo que indicaría que estarían a una concentración similar (Fig. 9). Después de la calibración se obtuvo el cDNA y con este se realizó la PCR.

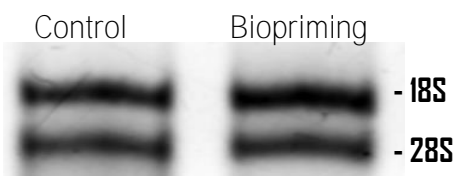


Figura 9. Gel de agarosa que muestra la calibración de los RNA ribosomales de radículas de 72 h de imbibición en 1% agar. Control y biopriming de un lote de 5 plántulas por cada tratamiento.

5.3.3. RT-PCR (*Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa*).

Reacción RT (*Transcriptasa reversa*).- En un tubo de microfuga se agregó el volumen de RNA que resultó de la calibración, 1 μ L de OligodT (20 μ M) y se completó con H₂O DEPC a 10 μ L. Este tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 90°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo, se colocó en hielo por 5 min y se le agregaron 10 μ L de la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 1, entonces se calentó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento, a 42°C por 1 h y por último a 70°C por 15 min para inactivar a la enzima. Esto se realizó en el Termociclador 2720 ThermalCycler Applied Biosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla 1.- Mezcla de reacción empleada en la reacción de Transcriptasa Reversa

Reactivo	Volumen (μL)
Amortiguador ImProm-II 5X (Promega)	4.0
MgCl ₂ 25 mM	2.4
dNTP's 10mM	1.0
RT (<i>Transcriptasa reversa</i>)	1.0
H ₂ O-DEPC	1.6

Reacción de PCR punto final.- Para la PCR se mezclaron 12.5 μ L de PCR Buffer Master Mix 2X, 0.25 μ L de cada oligonucléotido (20 μ M; Tabla 2), 1 μ L de cDNA como templado y H₂O libre de DNAsas (c.b.p. 25 μ L). Las condiciones de amplificación incluyeron la pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación en el que cada ciclo comprendía la desnaturalización a 94°C por 40 seg, el alineamiento a 57°C por 60 seg y la extensión a 72°C por 40 seg. La amplificación concluyó con la extensión final a 72°C por 7 min.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR punto final de los SWEET de raíces de maíz.

Nombre de SWEET	Dirección de la amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Peso molecular esperado
ZmSWEET2	Sentido	CCGAATTGTTTTGCTCCTGT	188
	Antisentido	TGATGAAGTTCACGGAACCA	
ZmSWEET3b	Sentido	TACATCCTAGCGCTGCTCAA	179
	Antisentido	TGCAAGGCAAACCTCTTCTT	
ZmSWEET12a	Sentido	ATTCTTGGTCACCCTTGAC	166
	Antisentido	GGTGTTGATGGAGAGGAGGA	
ZmSWEET12b	Sentido	TCCTCCTCTCCATCAACACC	171
	Antisentido	TGTCGACGACGTAGAACTGC	
ZmSWEET14b	Sentido	GGATCTACTACGCGCTGCTC	128
	Antisentido	GAACAGCTTTGCCTTCTTGG	

Las secuencias de los SWEETs fueron obtenidas de las bases de datos del GeneBank y de Ensemble. Las secuencias blanco y el sitio de amplificación se muestra en A 3.

Al final de la PCR a los 25 μ L de la reacción se les agregaron 5.0 μ L de amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). Asimismo se corrió en el mismo gel la mezcla de 2 μ L del marcador de peso molecular de 100 pb con 4 μ L amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de UV, posteriormente las imágenes se capturaron y se midió la densitometría de la banda con el equipo ChemiDoc, modelo MP System.

5.3.4. qRT-PCR (Transcriptasa Reversa. Reacción en cadena de la polímera en tiempo real).

Se realizó la estandarización de la técnica de qRT-PCR que consistió en: 1) evaluar la especificidad de la reacción y 2) establecer la eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad del método. Para ello se utilizaron oligonucleótidos con las siguientes características: que produjeran amplicones de 100-300 pb, un

contenido de GC de 50-60 %, 18-21 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 y Primer Designing Tool y se utilizó como gen endógeno a la ubiquitina (UBQ).

- 1) Evaluación de la especificidad de la reacción. Análisis de los cebadores empleados para cada gen a amplificar con el fin de verificar que no formaran dímeros ni productos inespecíficos. Para cada SWEET se encontró un solo pico en la curva de disociación así como en el gen endógeno (Ubiquitina), el cual es un gen de expresión constante que actúa como control.
- 2) Establecimiento de la eficiencia del método. El ensayo de PCR se validó mediante una curva estándar a partir de las muestras de cDNA diluidas en serie, la cual se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada apareciera la curva típica de amplificación. La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido en serie), donde la pendiente debe ser cercana a -3.32, lo cual corresponde a una eficiencia de amplificación del 100 %. La fórmula para calcular el % de eficiencia de amplificación (% E) es :

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

Dónde:

m= Pendiente de la curva Ct vs Log Concentración. Considerándose como aceptable una eficiencia mayor al 90%

5.3.5. Cuantificación de la expresión de los diferentes ZmSWEETs mediante qPCR.

Para cuantificar la expresión en raíces de maíz de ZmSWEET2, ZmSWEET3b, ZmSWEET12a y ZmSWEET14b, se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla 3, empleando como gen endógeno UBQ. Cabe aclarar que se sintetizaron siete juegos distintos de oligonucleótidos para amplificar de manera específica al SWEET12b, sin embargo no se logró amplificar la banda esperada o se obtuvo más de un producto amplificado. La cuantificación de los niveles de los mensajeros de cada muestra de RNA se realizó por triplicado en un termociclador AppliedBiosystems 7500 Real-Time PCR System.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los SWEET de raíces de maíz y del gen endógeno por qPCR.

Nombre de SWEET	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido
ZmSWEET2	Sentido	AGGCTCAAGGTCTCTGCTCT
	Antisentido	TGACGATTGACATGGGGGAC
ZmSWEET3b	Sentido	CAGGAGAATCCCTTGTGCGT
	Antisentido	AACAGTTGGGTCGCTGCTAT
ZmSWEET12a	Sentido	GACCTGACTATGATTGCTGC
	Antisentido	GCGTCTACTTGTACCGTGGT
ZmSWEET12b_1*	Sentido	TCCTCCTCTCCATCAACACC
	Antisentido	TGTCGACGACGTAGAAGTGC
ZmSWEET12b_2*	Sentido	GCGATGATGAGACACGCTGA
	Antisentido	CCTCGATGCTCCTCCCTAA
ZmSWEET12b_3*	Sentido	ATTCTGGTCATCCTTGCAC
	Antisentido	GAGGTAGACGGCGAGGTAGA
ZmSWEET12b_4*	Sentido	CCTGTCATTCTGGTCATCC
	Antisentido	ACGGTGTTGATGGAGAGGAG
ZmSWEET12b_5*	Sentido	TTAGGGGAGGAGCATCGAGG
	Antisentido	GCCGAGCACCCAGGCGTTTT
ZmSWEET12b_6*	Sentido	TCCTCCTCTCCATCAACACC
	Antisentido	GAGGTAGACGGCGAGGTAGA
ZmSWEET12b_7*	Sentido	CCTGTCATTCTGGTCATCC
	Antisentido	GAGGTAGACGGCGAGGTAGA
ZmSWEET14b	Sentido	GTCATCGAGACCCTCTAC
	Antisentido	ACGAAGACGCTAACGGAGAA
Ubiquitina	Sentido	ATCTTTGTGAAGACCCTCAC
	Antisentido	CCTAAGGCGCAGCACCAAGT

Las secuencias de los SWEETs fueron obtenidas de las bases de datos del GeneBank y de Ensemble. *Se probaron siete pares de oligonucleótidos distintos para amplificar específicamente al SWEET12b, pero no se logró amplificar el producto deseado o bien, se

obtenían dos bandas amplificadas. Las secuencias blanco y el sitio de amplificación se muestra en A 3.

La reacción de qRT-PCR se realizó en un volumen final de 20 µL con los componentes que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para la técnica qRT-PCR para los 5 pares de oligonucleótidos empleados.

Reactivo	Volumen (µL)
SYB Green PCR Master Mix	10.0
Oligonucleótido sentido (20 µM)	0.15
Oligonucleótido antisentido (20 µM)	0.15
cDNA	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 25 µL)	7.7

Se empleó el Método de Pfaffl (2001) para realizar la cuantificación relativa de una muestra en comparación con un gen de referencia, en este caso UBQ, el cual emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E \text{ muestra})^{\Delta CP (\text{control} - \text{muestra})}}{(E \text{ referencia})^{\Delta CP \text{ referencia} (\text{control} - \text{referencia})}}$$

Dónde:

E muestra= Eficiencia de muestra.

E referencia= Eficiencia de gen de referencia.

ΔCP= Ct gen control- Ct gen muestra.

ΔCP referencia= Ct gen control - Ct gen calibrador.

6. RESULTADOS

6.1. Análisis *in silico* de la expresión de los SWEETs de maíz.

Los SWEETs son familias multigénicas en plantas, en las bases de datos de ARAMEMNON se encuentran los datos predictivos de localización de las secuencias de nucleótidos para los SWEETs de cinco dicotiledóneas: *S. lycopersicum* (32 miembros), *P. trichocarpa* (28 miembros), *A. thaliana* (18 miembros), *C. melo* (18 miembros), *V. vinífera* (16 miembros) y de cuatro monocotiledóneas: *O. sativa* (23 miembros), *M. acuminata* (26 miembros), *B. distachyon* (19 miembros) y *Zea mays* (22 miembros). En vista de que uno de los objetivos del trabajo era determinar el efecto del hongo *T. asperellum* en la expresión de los SWEETs de maíz, y sabiendo que este coloniza las raíces, se buscaron las secuencias de SWEETs que se expresan preferentemente en este tejido. Para encontrarlos se tomó el número de acceso del gen que proporciona Arammenon y se buscaron los datos de los niveles de transcritos en la base de datos del MaizGDB (Sekhon *et al.*, 2011), en donde están vertidos los datos de expresión diferencial de cada una de las secuencias de genes de maíz.

El Atlas de expresión de los genes de maíz lo realizaron Sekhon y colaboradores en el 2011. Para construir el atlas de genes se utilizaron los tejidos en varios estadios de la planta de maíz B73, se realizaron tres réplicas biológicas para cada tipo de tejido excepto semillas en germinación. Para las semillas en germinación, se combinaron diez semillas elegidas al azar para formar una réplica biológica. El RNA total se extrajo usando el reactivo trizol, el aislamiento de mRNA, la síntesis de cDNA y el marcaje de la sonda necesaria para la hibridación se realizó por Roche NimbleGen Inc. La expresión constitutiva de genes se consideró con un valor de la expresión lineal de 200 o más en los 60 tejidos. Entre los genes expresados de forma constitutiva, los que tuvieron un coeficiente de variación ($CV = S / X_{mean}$, donde S representan la desviación estándar y X_{mean} indica la media de expresión de un gen en todos los tejidos) $\leq 15\%$ se consideraron como genes que se expresa de forma estable (Sekhon *et al.*, 2011). Recientemente, se ha incorporado más información al Atlas, el transcriptoma de 17 muestras de

plántulas de maíz y sistema radicular adulto. La base de datos contiene 4.6 billones de datos leídos con un promedio de 20.5 millones de réplicas para detectar transcritos de baja abundancia (Stelpflug *et al.*, 2015).

En la Fig. 10 se presentan los histogramas de los SWEET que se expresan más en las raíces, mientras que, los diagramas de calor que representan la expresión en los diferentes tejidos se encuentran en el A 4. El resumen de los datos encontrados se enlista en la Tabla 5. Cinco secuencias de presuntos SWEET se expresan en las raíces maíz, ZmSWEET2, 3b ,12a y 14b, y son mencionados como presuntos ya que aún no se ha caracterizado su actividad de transporte. Aunque también se analizó el 12b ya que de acuerdo al diagrama de calor que presenta la página del MaizeGDB se observa expresión en las raíces (A 4).

Tabla 5. Datos de los genes que codifican para los presuntos SWEETs de localización radicular.

Número de acceso de EnsemblPlants	Localización MaizeGDB	Nombre asignado
GRMZM2G324903	ZEAMMB73_310680 Raíz primaria	ZmSWEET2
GRMZM2G060974	ZEAMMB73_109200 Raíz primaria	ZmSWEET3b
GRMZM2G133322	ZEAMMB73_015350 Raíz primaria	ZmSWEET12a
GRMZM2G099609	ZEAMMB73_358130 Raíz primaria	ZmSWEET12b
GRMZM2G015976	ZEAMMB73_254262 Raíz primaria	ZmSWEET14b

Número de acceso del Genbank, la localización de la expresión de acuerdo a MaizeGDB y el nombre asignado al compararse con la familia de SWEETs de *A. thaliana*.

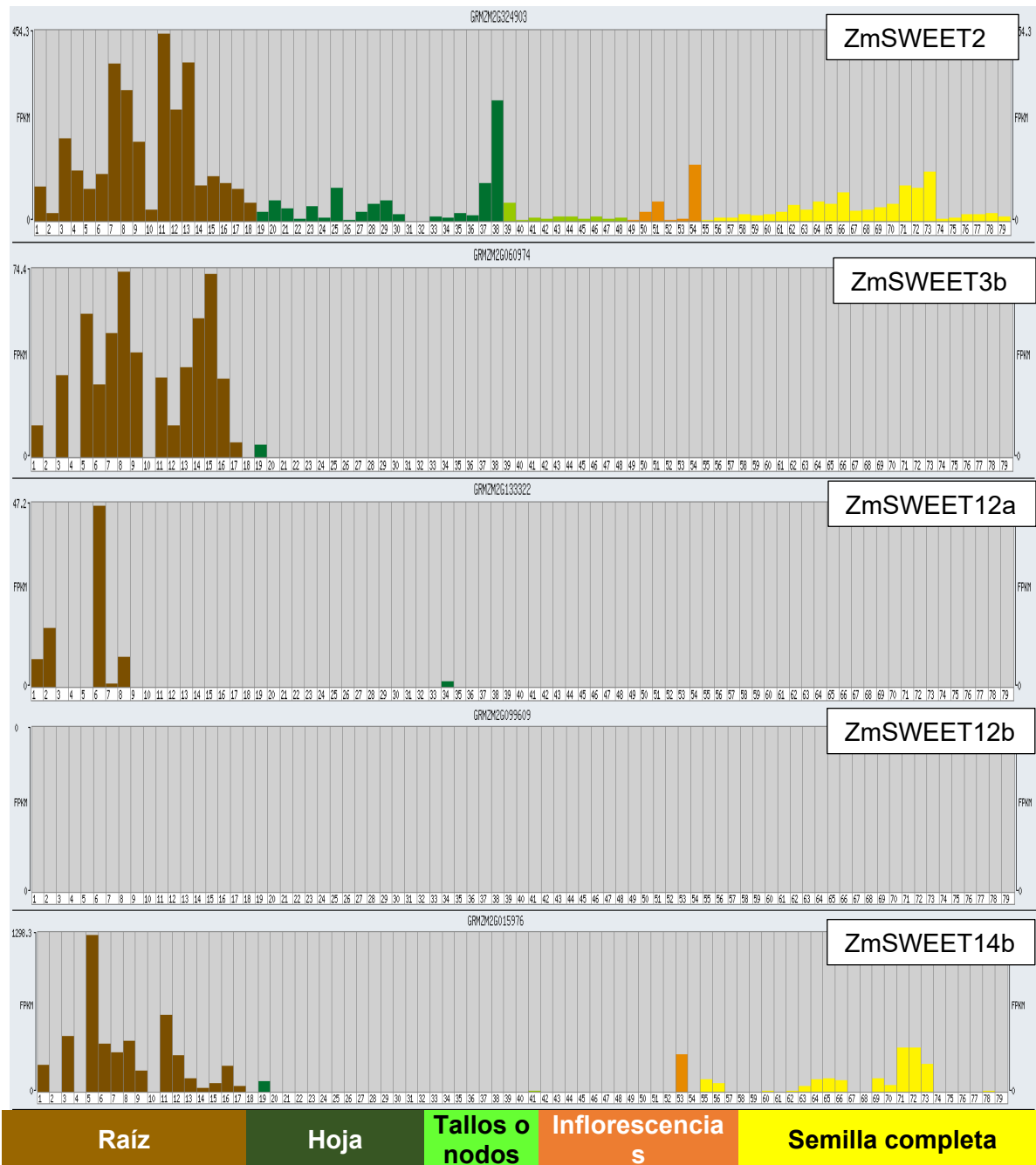


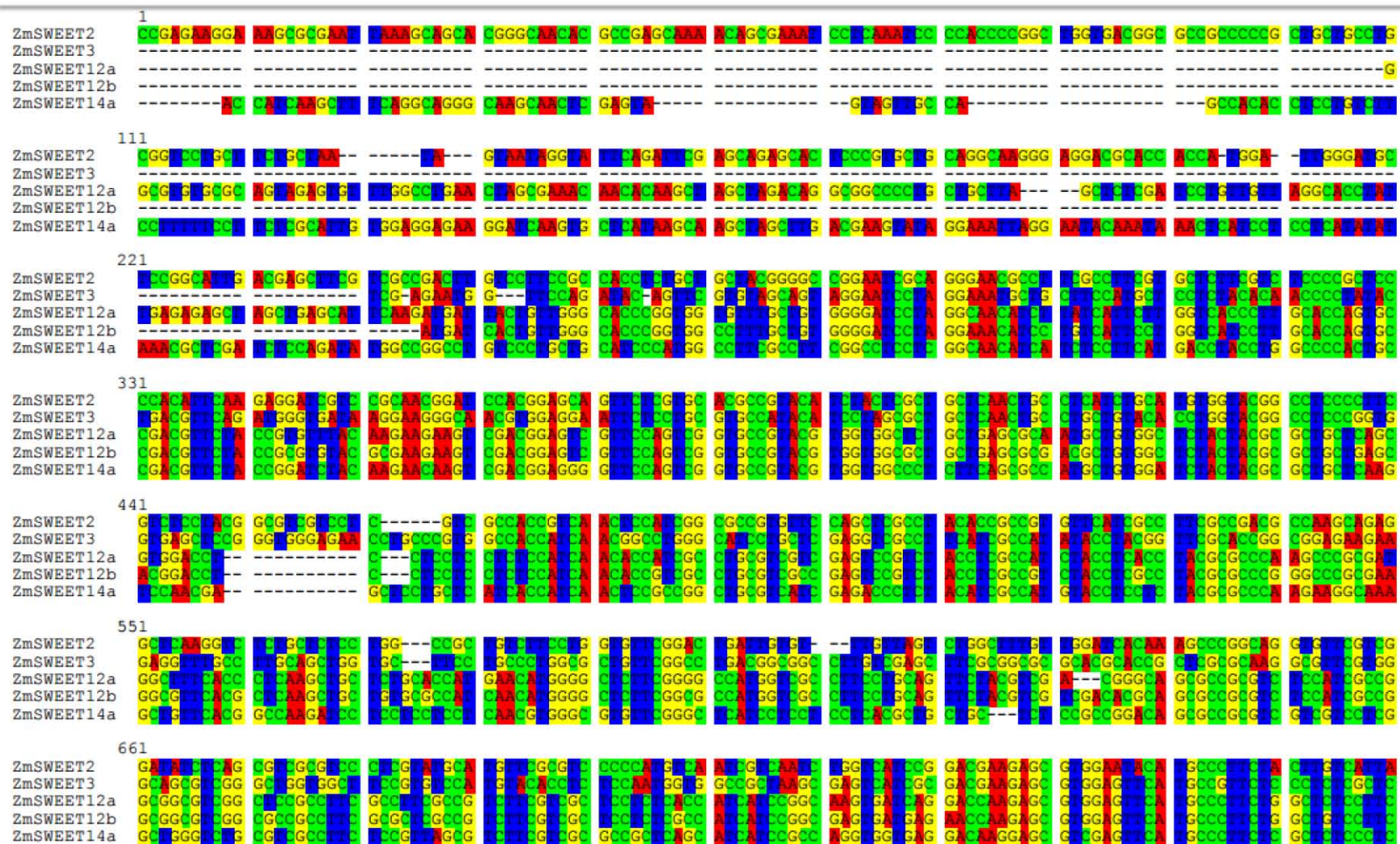
Figura 10. Histogramas modificados de expresión diferencial de los mRNA de los SWEETs elegidos en los diferentes tejidos del maíz.

Los números debajo de cada histograma corresponden a diferentes tejidos del maíz. 1 al 18 raíces; del 19 al 38 hojas; del 39 al 48 tallos o nodos; del 49 al 50 las inflorescencias masculina y femenina; del 55 al 66 la semilla completa a diferentes días post-polinización; del 67 al 78 el embrión a diferentes días post-polinización y 79 el pericarpio. (maizegdb.com).

Para determinar el porcentaje de identidad se utilizó el programa ClustalOmega disponible en línea, con el que se realiza un alineamiento entre cada una de las secuencias seleccionadas, el cual lleva a cabo una estrategia progresiva para realizar el alineamiento múltiple haciendo uso de algoritmos para ello (Tabla 6; Figura 11). Como se observa las secuencias son muy similares entre sí. Por lo que, en el diseño de los oligonucleótidos para amplificar específicamente cada uno de los SWEETs se prefirió utilizar las zonas dentro del gen pero hacia los extremos del 5' y el 3' de cada gen en donde difieren, así como en las uniones entre exones solamente, esto con el fin de hacer más específico el diseño, el caso de los SWEETs 12a y 12b que al tener un 84.50% de identidad entre ellos, dificultó el diseño de oligonucleótidos exclusivos para cada uno.

Tabla 6. Porcentaje de identidad de los 5 ZmSWEET creado por Clustal2.1

<i>ZmSWEET</i>	<i>2</i>	<i>3b</i>	<i>14b</i>	<i>12a</i>	<i>12b</i>
<i>2</i>	100.00	56.59	51.91	50.29	51.90
<i>3b</i>	56.59	100.00	55.10	57.11	56.64
<i>14b</i>	51.91	55.10	100.00	63.83	67.33
<i>12a</i>	50.29	57.11	63.83	100.00	84.50
<i>12b</i>	51.90	56.64	67.33	84.50	100.00



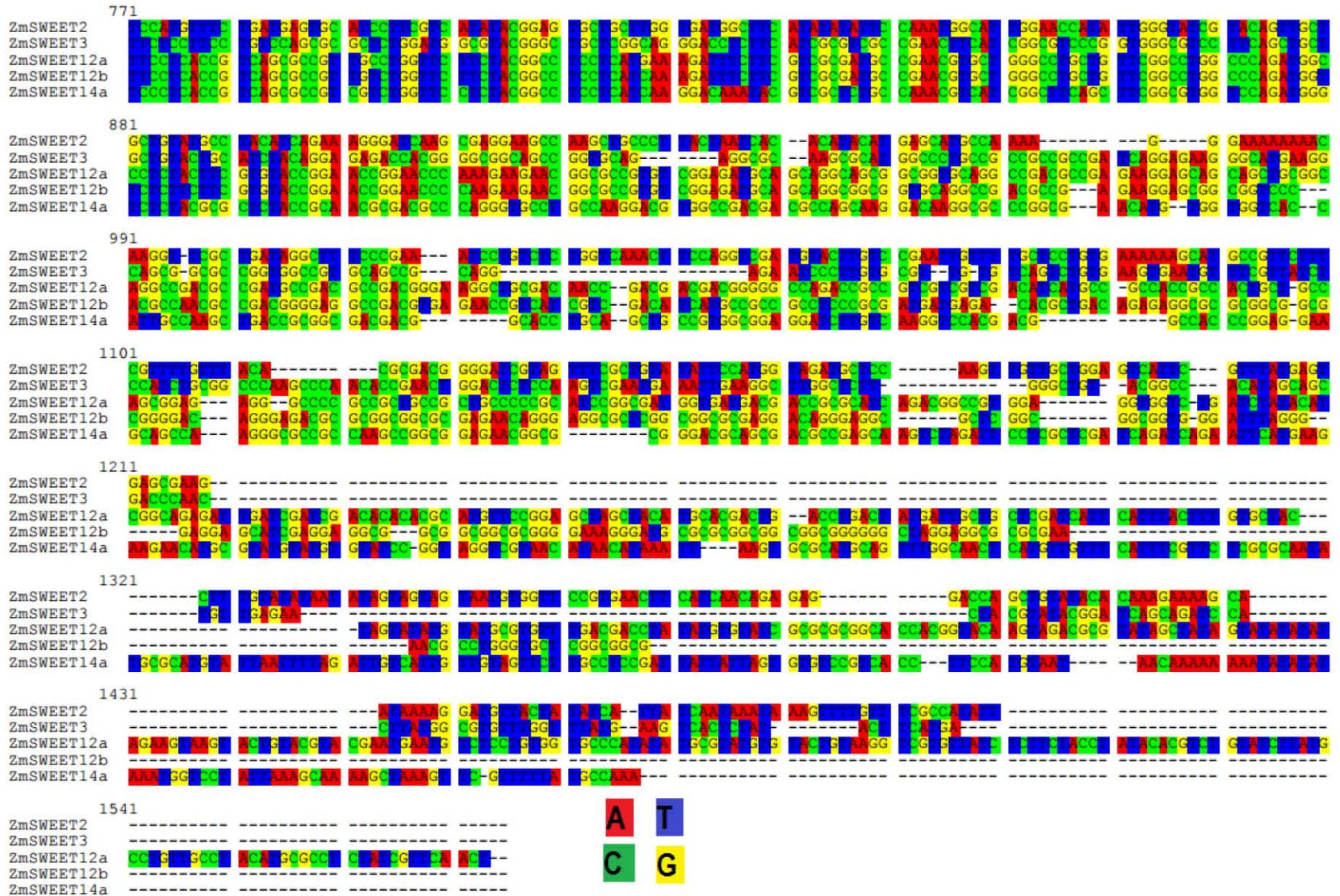


Figura 11. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los presuntos SWEETs de raíces de maíz. (Seaview4).

6.2. Raíces embrionarias y post-embrionarias de maíz Chalqueño.

Debido a la variada composición de raíces del maíz se determinó obtenerlas en dos estados del desarrollo, las raíces denominadas embrionarias, provenientes de plántulas de 72 h de imbibición, y las raíces post-embrionarias obtenidas a partir de plantas con 30 días de imbibición (Hochholdinger *et al.*, 2004)(Fig. 12). Adicionalmente, se obtuvieron ambos tipos de raíces provenientes de semillas que pasaron por el tratamiento de bioprimering con *T. asperillum*.

Inicialmente, se obtuvieron raíces de plantas crecidas en Peat Moss, sin embargo el RNA extraído obtuvo un cociente de A_{260}/A_{280} alrededor de 1.3, es decir, fue de mala calidad, o bien se encontraba degradado y por lo tanto no se obtuvieron amplicones en la reacción de PCR. Usualmente el Peat moss es usado en nuestro grupo como sustrato para crecer a las plantas, sin embargo, este sustrato contiene ácidos húmicos que se sabe interfieren con reacciones enzimáticas como la actividad de endonucleasa, DNAsa y RNAsa, alterando los resultados, disminuyendo la detección de los ácidos nucleicos o la amplificación por PCR (Wang *et al.*, 2012). En contraste, el RNA obtenido de las raíces de plantas crecidas en hidroponía fue de mejor calidad.

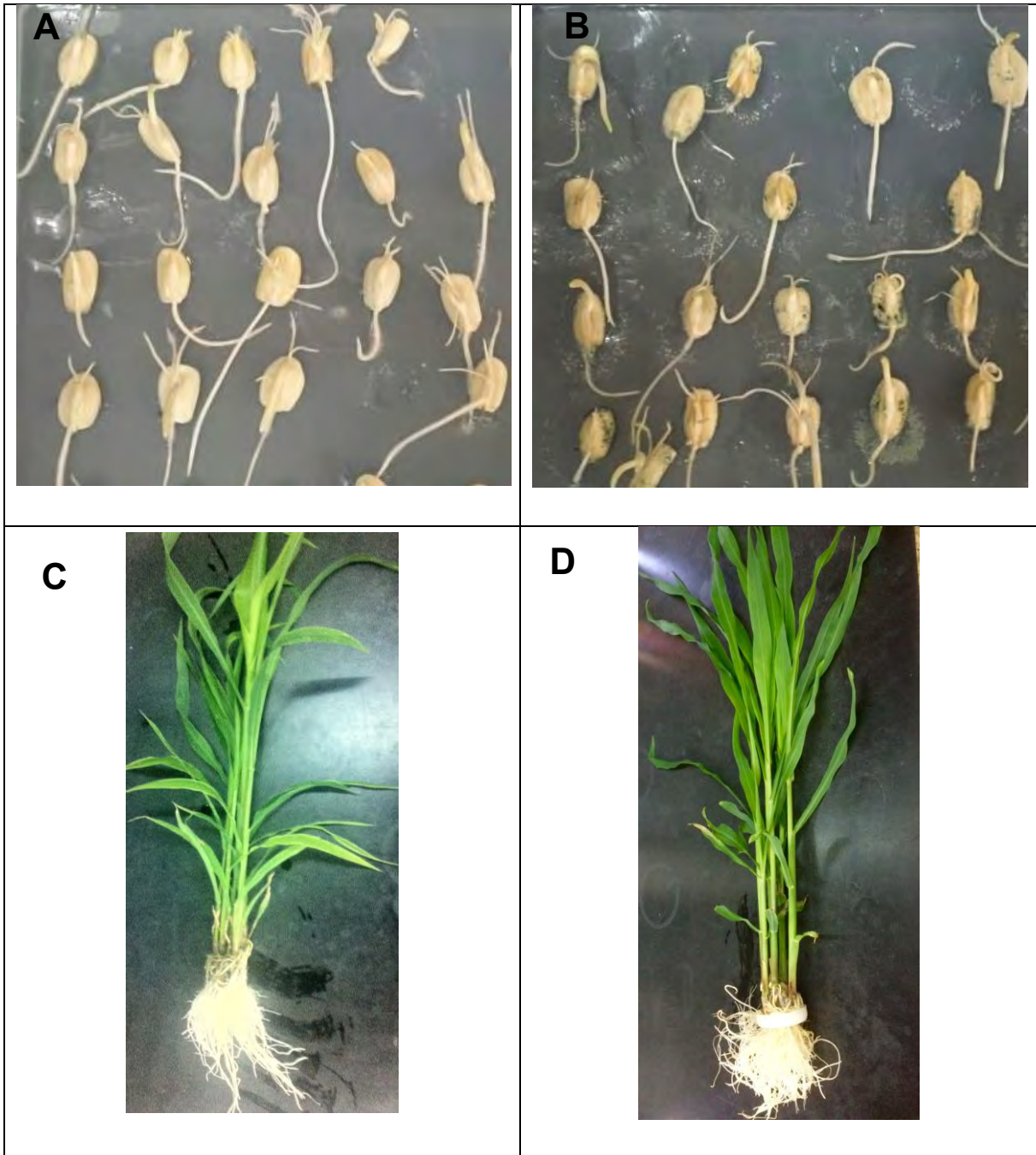
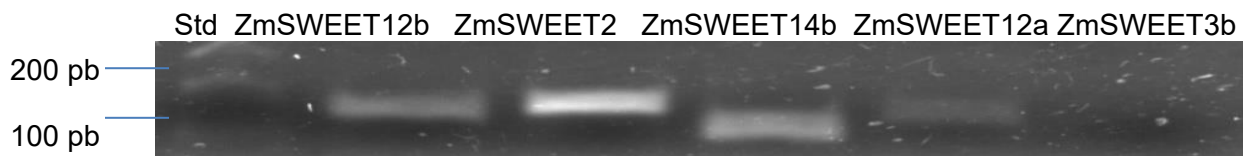


Figura 12. Efecto de *T. asperellum* en el crecimiento de las plántulas de maíz.

A. Plántulas control con 72 h de imbibición en 1 % Agar. **B.** Plántulas que pasaron por el tratamiento con biopriming por y 72 h de imbibición en 1 % Agar; el crecimiento del hongo fue visible tanto en la superficie como por debajo de las semillas. **C.** Plantas control de 1 mes de edad crecidas en un sistema hidropónico con medio Hoagland. **D.** Plantas de 1 mes de edad, crecidas en hidroponía y provenientes de semillas tratadas con *T. asperellum*.

6.3. Condiciones óptimas de expresión de los SWEET en raíces de maíz: Análisis por PCR punto final.

Para determinar los niveles de expresión del mRNA de ZmSWEET2, 3, 12a, 12b y 14a en las radículas se obtuvieron las condiciones óptimas de concentración de cDNA y de oligonucleótidos. Al usar cDNA de raíces embrionarias se encontró que las condiciones óptimas de amplificación fueron 2 μ L de cDNA y 1 μ L de cada par de oligonucleótidos (Stock 20 μ M). Como se puede observar, bajo estas condiciones no se logró amplificación del ZmSWEET3b (Fig. 13), aun cuando se probaron diferentes concentraciones de cDNA, oligonucleótidos y tipo de oligonucleótidos.



PM (pb): 171 188 128 166 179
Figura 13. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los SWEETs de maíz seleccionados: 2, 3b, 12a, 12b y 14b, usando como templado cDNA de raíces embrionarias. Std: marcador de peso molecular, PM: peso molecular esperado.

Debido a la anterior, se decidió utilizar como templado cDNA obtenido a partir de raíces post-embrionarias. En este tejido sí se logró obtener un amplicón, coincidiendo con el mapa de expresión (A 4), más adelante se presenta el resultado de la amplificación.

6.4. Análisis por PCR punto final del efecto de *T. asperellum* sobre la expresión del mRNA de *ZmSWEET2*, *12a*, *12b* y *14b* en raíces embrionarias.

Para evaluar el efecto del biopriming en las raíces embrionarias, se obtuvieron las raíces embrionarias de cuatro lotes control y cuatro lotes con biopriming, con 80 plántulas por lote. Se obtuvo el RNA de los cuatro lotes, se calibró, es decir se

ajustaron los volúmenes para que la cantidad de RNA visualizado en el gel de agarosa fuera similar entre los lotes, y después se generó el cDNA. Este cDNA se utilizó como templado para las reacciones de amplificación de cada uno de los SWEETs (A 5).

Las plántulas tratadas con biopriming presentaron un aumento en la expresión de ZmSWEET2, 12a y 12b, mientras que la expresión de ZmSWEET14b no se afectó. Sin embargo, los niveles de expresión de este último SWEET fueron mucho más altos respecto a los de los otros SWEETs (Fig. 14). Además, cabe que mencionar que para el SWEET12b se encontró una banda tenue por debajo del peso esperado, por lo que se eliminó del análisis ya que no fue específico para amplificar al SWEET.

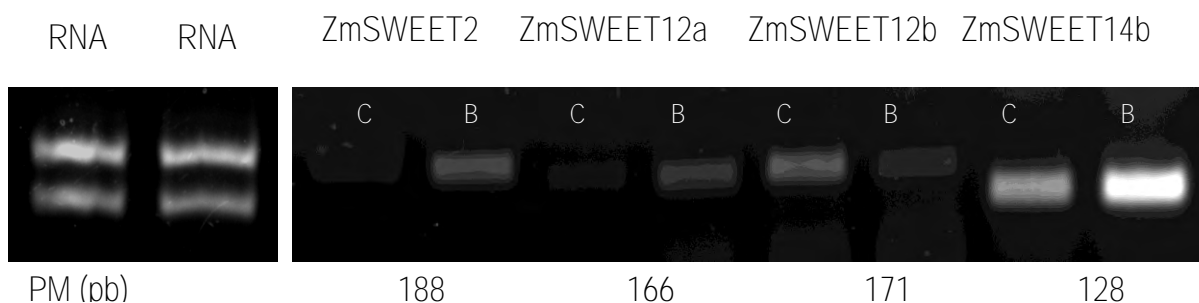


Figura 14. Efecto del biopriming con *T. asperellum* sobre la expresión del mRNA de los SWEETs en las raíces embrionarias de maíz.

Imagen representativa de los gels de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de ZmSWEET 2, 12a, 12b y 14b de raíces embrionarias. Las réplicas se encuentran en el Anexo 6. PM: peso molecular esperado.

6.5. Análisis por PCR punto final del efecto de *T. asperellum* sobre la expresión del mRNA de *ZmSWEET2*, *12a*, *12b* y *14b* en raíces post-embrionarias.

Debido a que los datos de expresión del banco de datos del MaizeGDB indicaban que ZmSWEET3b se expresa principalmente en raíces de plántulas de más de nueve días de crecimiento (Fig. 10; Sekhon *et al.*, 2011), se decidió obtener el

RNA de raíces de plantas de 1 mes de crecimiento, provenientes de semillas tratadas o no con biopriming. A estas raíces se les denominó post-embriónicas (Fig. 15).

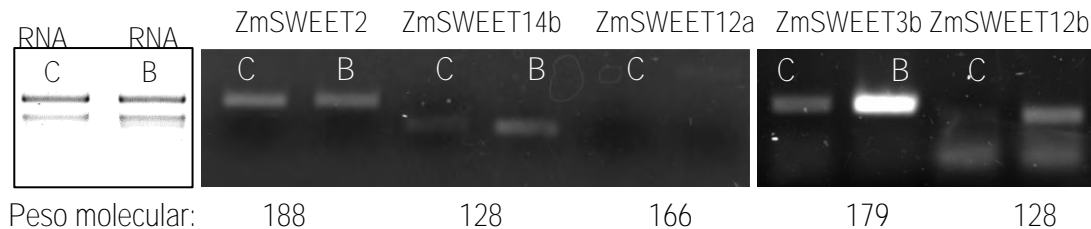


Figura 15. Niveles de expresión de los ZmSWEET2, 3b, 12a, 12b y 14b en raíces post-embriónicas. Imagen de gel de agarosa al 2 % revelando la presencia de los ZmSWEET 2, 3b, 12a, 12b y 14b en las raíces post-embriónicas. También se muestra el RNA como control de cargado.

Se analizó la presencia de los diferentes SWEETs en las raíces y se encontró que ZmSWEET3b sí se expresó en este tejido mientras que ZmSWEET12a no. Para el caso del ZmSWEET12b no fue posible determinar su presencia ya que con los diferentes pares de oligonucleótidos utilizados se produjeron en el mejor de los casos dos bandas de amplificación. Esto último también se observó en las raíces embriónicas aunque en menor grado (Fig. 13 y 15). En general, se pudo observar que el biopriming provocó un aumento en la expresión de ZmSWEET3b y 14b y una ligera reducción sobre la expresión de ZmSWEET2.

6.6. Obtención de las condiciones óptimas para el análisis de la expresión de *ZmSWEET2*, *3b*, *12a*, *12b* y *14b* mediante qRT-PCR.

La PCR permite la detección específica y la producción de grandes cantidades de DNA, es decir puede hacer billones de copias de un fragmento específico de DNA o gene, lo que permite detectar e identificar las secuencias usando técnicas visuales basadas en el tamaño y carga del producto, que es como se detecta mediante PCR punto final. Mientras que la detección cuantitativa de la expresión

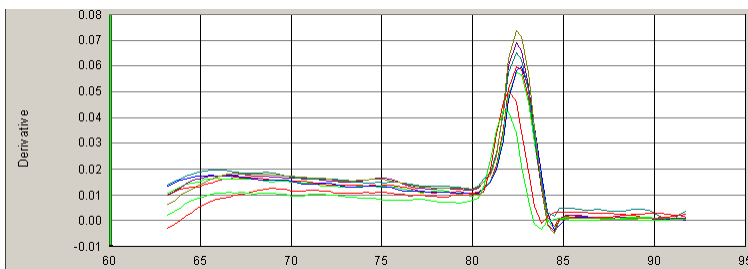
del producto o gene se realiza mediante PCR tiempo real utilizando productos fluorescentes que no se intercalan en el producto. En la PCR punto final el análisis de la secuencia blanco se realiza al final de los ciclos de PCR, mientras que en la técnica de qRT-PCR la cantidad de DNA templado presente en una muestra se puede cuantificar en cada ciclo, ya que el producto de amplificación se mide conforme transcurre la reacción. El término tiempo real hace referencia a la detección de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción y el gene es cuantificado en la fase exponencial de amplificación (Tamay de Dios *et al*, 2013). Es por ello que se procedió a la cuantificación de la expresión de los SWEETs en las raíces mediante tiempo real.

Se optimizaron las condiciones de PCR. Primeramente se corroboró que los oligonucleótidos utilizados solo generaran un producto de amplificación. Para ello, una vez realizada la amplificación del producto, este, se sometió a un gradiente de temperaturas desde 65 hasta 92°C. Los valores de fluorescencia obtenidos en cada una de las diferentes temperaturas se graficaron para elaborar las curvas de disociación (Fig. 16). Se obtuvieron las curvas de disociación para cada uno de los 5 SWEETs estudiados:

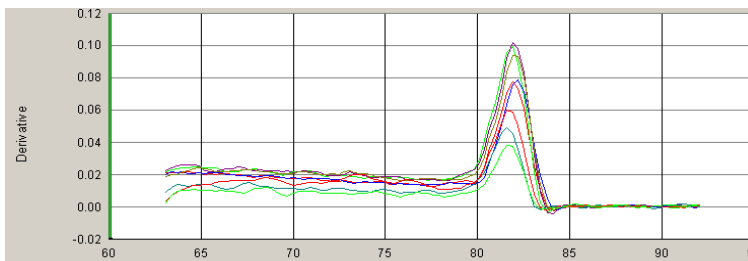
Puede observarse que en todos los casos se obtuvo un pico único de amplificación, independientemente de si se colocaron diferentes concentraciones de cDNA, lo que indicó que cada una de las reacciones fue específica. La temperatura a la cual se produjo el pico máximo corresponde a la temperatura de disociación del producto amplificado. Adicionalmente, se calculó el valor de eficiencia, recordando que se acepta como un valor adecuado de amplificación aquel que se encuentra entre 80-120%. Esto indica que el par de oligonucleótidos utilizado produce una amplificación lineal y reproducible de la secuencia de interés.

Por otro lado, se encontró que a diferencia de ZmSWEET2, 3b, 12a y 14b, ZmSWEET12b no produjo un solo pico de disociación (Fig. 17), lo que significa como se mencionó anteriormente que los oligonucleótidos se unen a más de una secuencia. Se desconoce cuál o cuáles fueron las secuencias que se amplificaron.

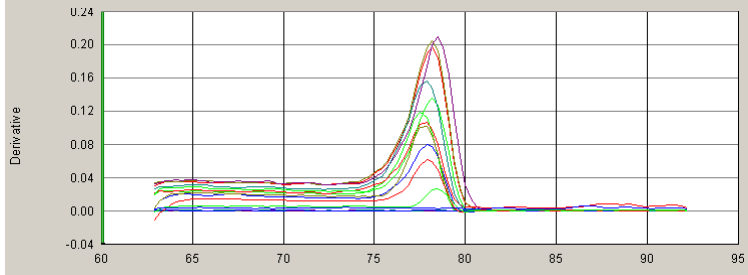
ZmSWEET2
Eficiencia: 94.59 %



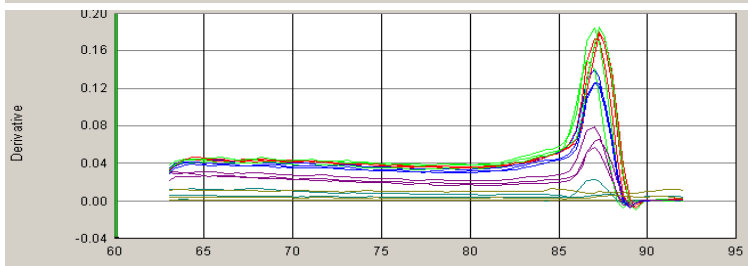
ZmSWEET3b
Eficiencia: 105.59 %



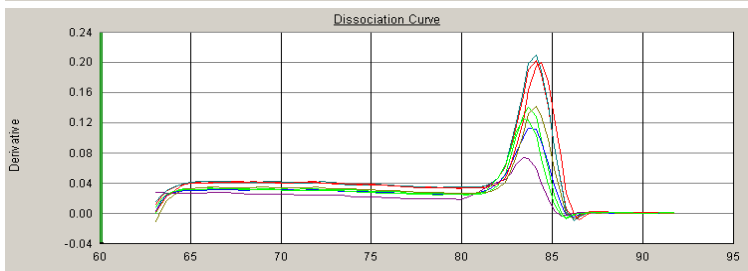
ZmSWEET12a
Eficiencia: 101.34 %



ZmSWEET14b
Eficiencia: 98 %



Ubiquitina
Eficiencia: 93.57%



Temperatura (°C)

Figura 16. Curvas de disociación para los ZmSWEET2, 3b, 12a y 14b con sus valores de eficiencia de amplificación. Se considera como aceptable una eficiencia mayor al 80%. Los colores de las curvas en cada gráfica corresponden a diferentes concentraciones del cDNA utilizado como templado.

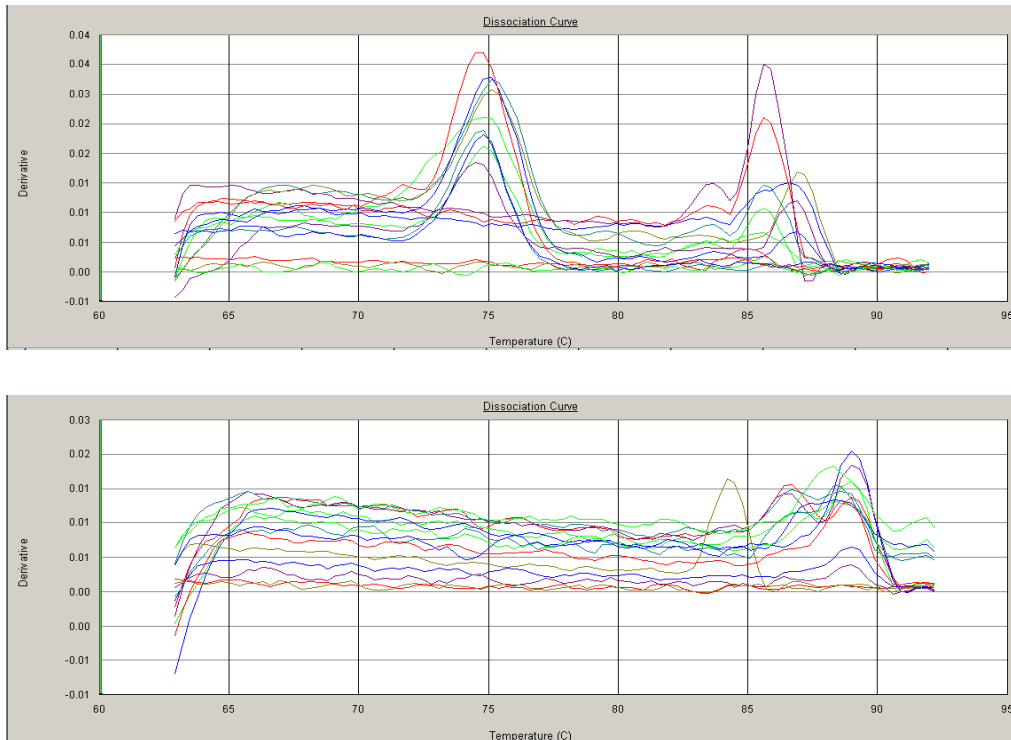


Figura 17. Curvas de disociación para ZmSWEET12b. Se presentan dos de los diseños de oligonucleótidos y sus respectivas curvas. Los colores de las curvas en cada gráfica corresponden a diferentes concentraciones del cDNA utilizado como templado

Con la finalidad de amplificar específicamente a ZmSWEET12b se diseñaron varios pares de oligonucleótidos, los cuales se probaron tanto por qRT-PCR como por punto final y como se observa en la Fig. 18, o bien se produjo más de un amplicón o el tamaño del mismo no correspondió al peso esperado. Por lo anterior, no se llevó a cabo el análisis de la expresión por qPCR para ZmSWEET12b.

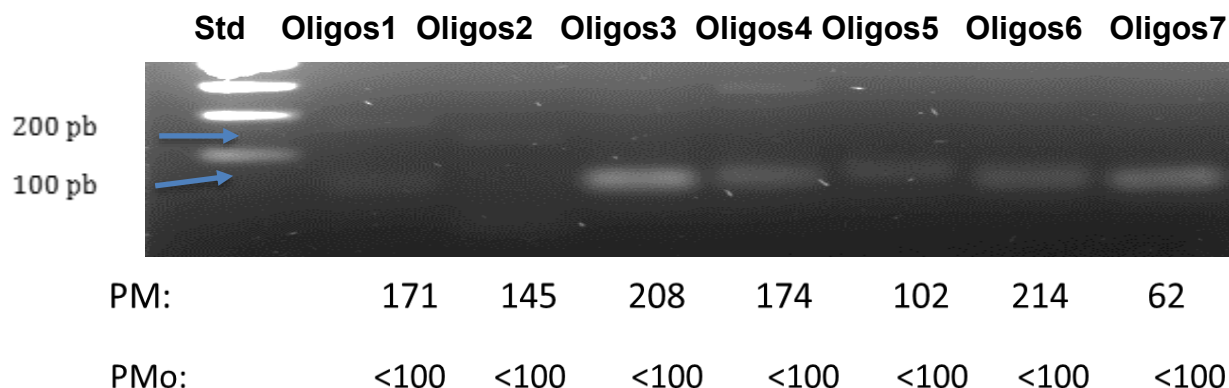


Figura 18. Reacciones de amplificación para ZmSWEET12b con diferentes pares de oligonucleótidos.

Imagen de gel de agarosa al 2% revelando la presencia del producto amplificado con siete diferentes pares de oligonucleótidos usando cDNA de raíz embrionaria (Tabla 5). PM, peso molecular esperado; PMo, peso molecular obtenido. Se observa que en los oligos 1, 2 y 4 hay dos bandas de amplificación, mientras que las demás no coinciden con el peso esperado, en el último diseño el peso obtenido es menor a 100 pb pero se presume que no pudo haber amplificación debido a que se encuentra al mismo nivel que otros oligos.

6.7. Efecto de *T. asperellum* sobre la expresión de los SWEETs de raíces de maíz.

La cuantificación de los cambios en la expresión de genes de los SWEETs respecto al control interno de RNA o gen endógeno (UBQ en este caso) se realizó mediante PCR tiempo real. Para ello, se utilizó el método comparativo de Ct o también denominado de umbral, en donde el valor de Ct se obtuvo cuando el nivel de fluorescencia fue constante, ya que se asume que todas las muestras tienen la misma concentración de cDNA a ese umbral de fluorescencia. Para que los datos fueran confiables se obtuvo el RNA de tres réplicas biológicas y la amplificación se realizó también por triplicado para cada réplica. El efecto de *T. asperellum* sobre la expresión de cada uno de los SWEETs seleccionados se determinó restando la amplificación obtenida del SWEET de interés en el tejido control, al valor de la amplificación obtenida en el tejido con hongo. Además se tomó en cuenta la eficiencia de amplificación de cada SWEET, según describe Pfaffl (2001).

Como se observa en la Fig. 19, la expresión de los cuatro SWEETs analizados se incrementó por efecto del biopriming; excepto para ZmSWEET12a en las raíces post-embrionarias donde no se encontró cambio con respecto al control (cero correspondería a un valor idéntico al control). En las raíces embrionarias el SWEET14b fue el que más se incrementó por efecto del biopriming, mientras que en las raíces post-embrionarias el SWEET3b fue el que mostró el incremento más grande.

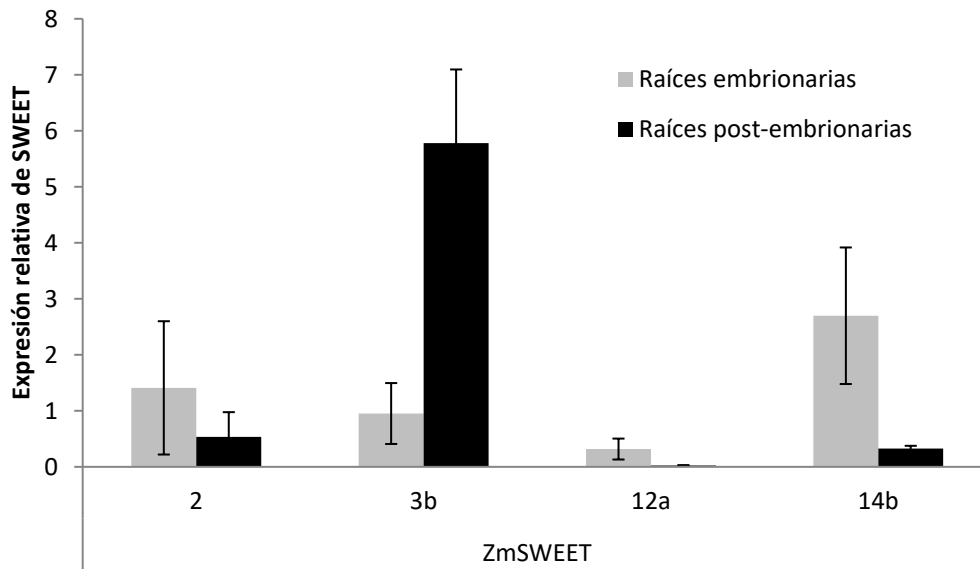


Figura 19. Efecto del biopriming en la expresión de SWEET2, 3b, 12a y 14a en raíces embrionarias y post-embrionarias de maíz. Estandarizado primero con UBQ y posteriormente con raíces control. Se muestra el promedio y la desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

7.1. Selección de secuencias de los presuntos SWEET de maíz que se expresan en raíces.

En la base de datos MaizeGDB se encontraron las 23 secuencias que codifican para los presuntos SWEETs de maíz. Se revisaron todas y se encontró que 5 de ellas tenían expresión preferencial por las raíces. Es común que a pesar de que una planta contenga una familia numerosa de genes (paralógos) que codifican para proteínas con función similar no todas se expresen en el mismo tejido. Ello permite que si la proteína tiene características funcionales diferentes como especificidad distinta por sustratos, capacidad de transporte diferente (V_{max}), expresión bajo ciertas circunstancias en las que el tejido este expuesto como cambios en la disponibilidad del soluto a transportar o de agua o presencia de microorganismos, pueda llevarse a cabo su regulación y por tanto su función particular.

También es frecuente encontrar en plantas que más de una proteína aparentemente con la misma función se presente en una misma célula o tejido, como si sobrelaparan en funciones, es decir podrían ser redundantes, aunque se sabe que cuando hay pérdida de función de alguna proteína por alguna causa, se compensa con la presencia de otra proteína con capacidad o características funcionales similares (Vieten *et al.*, 2005).

Por ejemplo, la familia de los transportadores de hexosas es aún mayor que la de los SWEETs, en *Arabidopsis* tiene 53 miembros, los cuales se han dividido en 7 subfamilias, por ejemplo, los miembros de la subfamilia SPT transportan glucosa, fructosa, galactosa, manosa y xilosa en la membrana plasmática con diferentes especificidades, mientras que la subfamilia EDR6 (early response to dehydration-like), transporta también monosacáridos, pero se especula que es a través de un transporte difusivo, dos de estos miembros exportan hexosas de la vacuola (Slewiniski, 2011).

Para corroborar que las secuencias elegidas codificaran para proteínas membranales similares a los SWEETs ya descritos, se realizó el análisis *in silico*, se alinearon las secuencias traducidas de los presuntos transportadores

SWEET de maíz junto con la secuencia de un transportador de maíz ya estudiado, el ZmSWEET4c (Fig. 20), se encontró que en todas las secuencias se predicen 7 cruces transmembrana (TM), como se ha encontrado en los transportadores tipo SWEET de Arabidopsis ya caracterizados (Chen *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 2015). Aunque en ZmSWEET14b podría existir otro TM más. La presencia de los TM permite sugerir que las secuencias seleccionadas podrían codificar para una proteína tipo SWEET.

Aunque se conservan los siete TM, las secuencias seleccionadas son muy distintas hacia la región del carboxilo terminal y tienen un grado de similitud bajo, ZmSWEET2 es 33% similar a ZmSWEET3b, que es con el SWEET que mayor similitud tiene. Mientras que los más parecidos entre sí son ZmSWEET12a y ZmSWEET12b con un 75% de similitud.

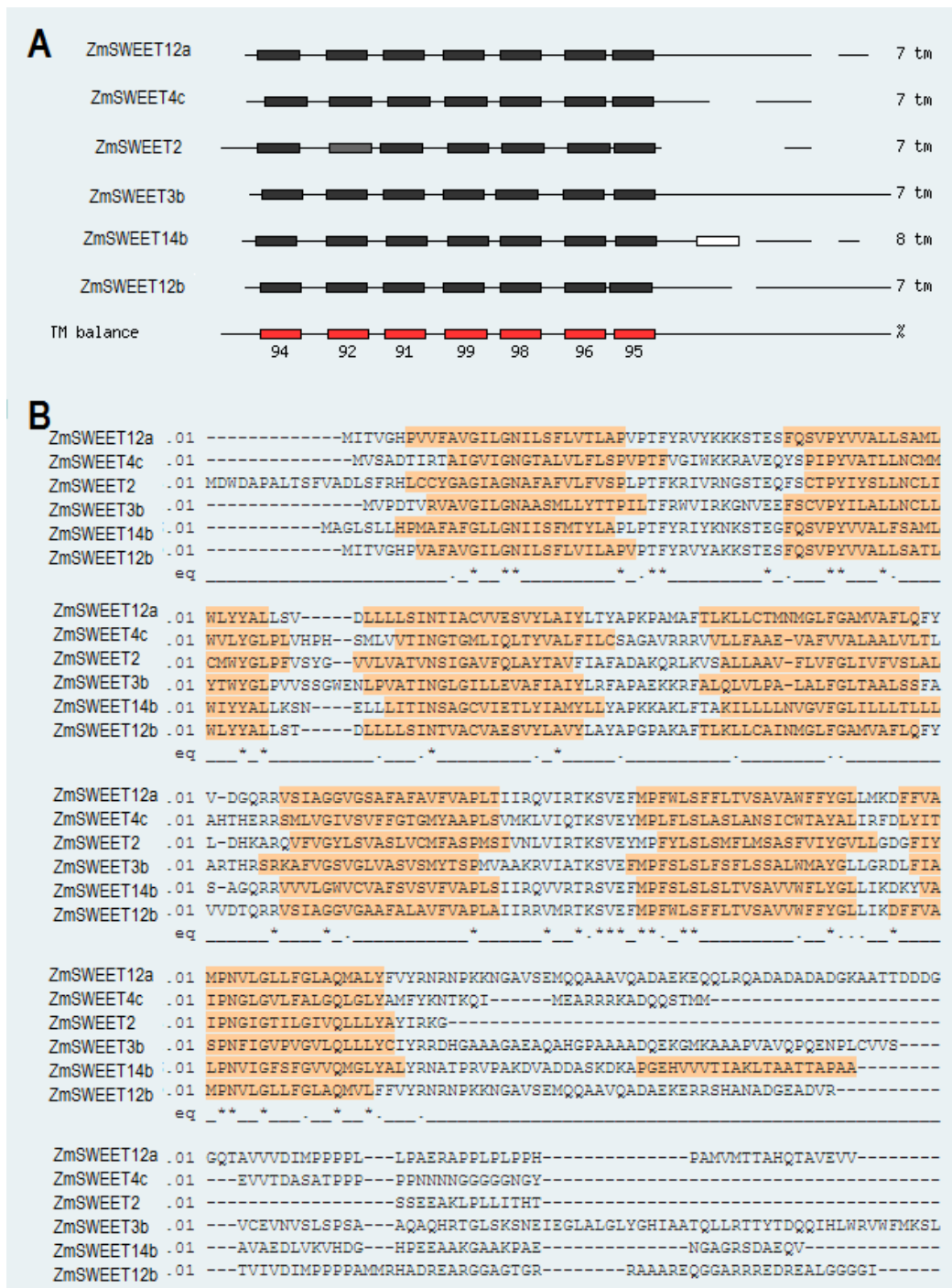


Figura 20. Predicción de cruces transmembrana de los presuntos transportadores SWEET de raíces de maíz. A. Caricatura que representa con cuadros los cruces transmembrana (TM) de cada secuencia de aminoácidos, así como el porcentaje de probabilidad de que sea un TM (TM balance). B. Alineamiento de las secuencia de aminoácidos de los presuntos SWEETs de raíces de maíz. En color naranja se muestran los posibles cruces transmembrana de la proteína. El alineamiento se hizo en la página de ARAMEMNON basado en Muscle_v3.6.

7.2. Expresión diferencial de los SWEET dependiente de la edad de las raíces.

La rizósfera representa un espacio dinámico en donde ocurren las interacciones entre las raíces y los microorganismos benéficos y patogénicos, los invertebrados y los competidores del sistema radicular como las raíces de otras plantas así como la competencia por los azúcares, la interferencia química, y/o el parasitismo, asociación con sus hospederos, así como el mantenimiento o aniquilación de poblaciones microbianas (Bais *et al.*, 2006). Los exudados de las raíces parecen mediar la compleja interacción en la rizósfera. Se ha estimado que entre el 20 y 80% de los fotosintatos entran a la rizósfera por los exudados de la raíz, que contienen azúcares simples y polisacáridos (arabinosa, fructosa, maltosa, manosa y oligosacáridos), aminoácidos (arginina, aspártico, cisteína, glutamina), ácidos orgánicos (los ácidos acético, ascórbico, benzoico, ferúlico y málico), fenoles, además de moléculas de alto peso molecular como los flavonoides, enzimas, ácidos grasos, hormonas, nucleótidos, taninos, algunos azúcares, esteroides, terpenoides, alcaloides, vitaminas entre otros (Rasmann y Turlings, 2016).

Los exudados de la planta claramente representan un costo significativo en carbono para la planta, y la magnitud de los fotosintatos exudados varía con el tipo de suelo, edad, estado fisiológico y disponibilidad de nutrientes. Aunque las funciones de todos los componentes del exudado no se han determinado. En el caso de los azúcares se conoce que la sustancia mucilaginososa que se exuda puede ayudar a la adherencia de microorganismos a las raíces o bien al movimiento de la raíz en el suelo. Durante una relación simbiótica de la planta con micorrizas, el simbionte incrementa la toma de nutrientes por la planta, mejorando el desarrollo de la planta, a cambio el hongo micorrízico extrae lípidos y azúcares del huésped (Bais *et al.*, 2006). En el caso del maíz se ha determinado que en plantas de 1 mes de edad exudan un 25% del carbono que la planta le dona a la raíz, mientras que en plantas de 3 meses los fotosintatos exudados se reducen a 15% (Haller y Stolp, 1985). Los exudados en maíz representan un 70% azúcares, compuestos fenólicos un 18%, ácidos orgánicos 7%, aminoácidos cerca del 3% entre otros compuestos (Lima *et al.*, 2014).

Una expresión diferencial en la salida de metabolitos de las raíces podría explicar la composición de los exudados en diferentes estadios del desarrollo de la planta o bien en condiciones ambientales cambiantes. En este estudio de los cinco SWEETs que más se expresan en las raíces se encontraron tres en las raíces embrionarias ZmSWEET2, 12a y 14b. Esto coincide con lo descrito por Sekhon *et al.* (2011) y Stelpflug *et al.* (2015) y Figura 10. Mientras que en las raíces post-embrionarias se expresaron tres: ZmSWEET2, 3b y 14b, estos resultados son nuevos ya que en MaizeGDB no se tiene reportada la expresión en raíces de un 1 mes. Como se observa la diferencia entre los dos tiempos estudiados son la presencia del SWEET12a y 3b. Se tendría que determinar cuál es la capacidad de toma de azúcares de estas proteínas así como su localización en la planta para esclarecer su papel en el desarrollo de las raíces.

Se consideró eliminar de la interpretación de resultados a ZmSWEET12b ya que a pesar de las diferencias en las regiones carboxilo terminal de la proteína y por lo tanto en la secuencia de nucleótidos en esta región, no fue posible encontrar un par de oligonucleótidos que nos permitiera de manera específica amplificar al ZmSWEET12b. Lo anterior podría tener varias razones:

- a)** a que la secuencia de nucleótidos en esa zona contenía un nivel alto de CG que hace que la Temperatura de fusión (T_m) del posible producto sea alto. Si la cantidad de G-C supera más del 55% de la secuencia, existe la posibilidad de la formación de dímeros de oligonucleótidos, es decir, productos inespecíficos. Esto implicaría que el rendimiento de la reacción sea bajo, así como la especificidad del producto esperado (Tamay de Dios *et al.*, 2013)
- b)** que cuando se conseguía amplificar el producto no fuera el SWEET12b sino otro SWEET, el candidato más probable es SWEET12a con quién tiene un porcentaje alto de homología (A 6), sin embargo para confirmarlo tendríamos que haber enviado a secuenciar los productos.
- c)** a que el SWEET12b no se encuentra muy representado en ese tejido como se predecía por el histograma de expresión (Fig. 10).

En relación a los SWEETs que sí se encontraron en las raíces, encontramos que también en *Arabidopsis* el SWEET2 está muy expresado en ese tejido. La estrategia que usó para determinar sus perfiles de expresión fue la de generar una proteína de fusión. Dicha construcción estaba constituida por el promotor AtSWEET2, la proteína verde fluorescente y el gen completo de AtSWEET2. La expresión de la proteína se encontró en la cubierta de la raíz, en la punta, en los pelos radiculares y en la epidermis de las regiones maduras de la raíz (Chen *et al.*, 2015a). Adicionalmente, AtSWEET2 está localizado en el tonoplasto y aparentemente transporta hexosas en la vacuola. Plantas mutantes de pérdida de función para AtSWEET2 incrementaron su susceptibilidad a la infección por *Pythium*, un parásito oomiceto que pudre las raíces. Al parecer la presencia de AtSWEET2 en la vacuola favorece la entrada de azúcares a esta y disminuye las concentraciones de azúcares en el citosol, por lo que la salida de azúcares a los apoplastos es limitada y entonces el parásito no sobrevive.

En arroz también se demostró que OsSWEET2b es un transportador de glucosa vacuolar y además, esta proteína ya se cristalizó y se realizó el análisis estructural. La proteína consiste de un par asimétrico de tres hélices y asas conectadas por un cruce transmembrana (TM4). La hélice 4 invierte al segundo conjunto de tres hélices, lo que permite alinear en paralelo a los dos grupos de 3 hélices (Fig. 21A), se observa que el protómero es capaz de formar un canal o la vía de translocación del azúcar. El cruce transmembrana 4 interacciona fuertemente con el asa de las primeras tres hélices, con un protómero y establece contactos entre el siguiente protómero, ya que al parecer *in vitro* la proteína se puede asociar formando un oligómero de tres protómeros (Fig. 21B; Tao *et al.* 2015). El encontrar en las raíces de maíz a SWEET2 tanto en raíces embrionarias como post-embrionarias podría indicar que también es importante para la exudación de azúcares, puesto que en *Arabidopsis* presenta esa función.

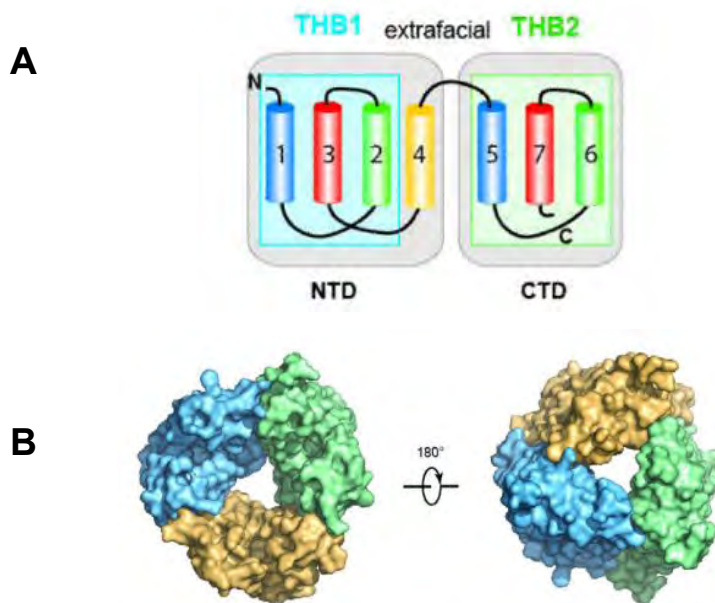


Figura 21. Estructura de SWEET2b. **A.** Modelo del acomodo de las hélices transmembranales de OsSWEET2b.

NTD se compone de las hélices transmembranales hacia el amino-terminal de la proteína, mientras que CTD corresponde a las tres hélices transmembranales hacia el carboxi-terminal. **B.** Representación de superficie de OsSWEET2b vista intrafacial (lado citosólico; izquierda) y lado extrafacial (derecha) (Tao *et al.*, 2015)

En la hoja se encuentran expresados varios SWEETs. Los más relevantes en *Arabidopsis* son el *SWEET11* y *12*, los cuales se localizan en la membrana plasmática de las células del floema y están involucrados en la salida de sacarosa al espacio apoplástico. Las mutantes de *AtSWEET12* y *11* acumulan almidón en las hojas, presentan un crecimiento reducido de la planta y el almidón acumulado durante el día no se moviliza en la noche para abastecer de carbono tanto a la hoja como a otros órganos (Chen *et al.*, 2012). La presencia de estos SWEETs en el floema vino a cerrar una etapa de búsqueda de cómo los azúcares salían de la célula del parénquima del floema y se dirigían a las células acompañantes, ya que estas carecían de conexiones plasmodesmata. Sin embargo, *AtSWEET12* y *11* no solo participan llenando el floema de azúcares sino también se ha demostrado que están presentes en los vasos del xilema y que no sólo transportan sacarosa sino también glucosa y fructosa. Esta flexibilidad en el sustrato que transportan fue demostrada usando el sistema heterólogo de expresión de ovocitos de *Xenopus laevis* y apoyado también por la complementación de la levadura EBY.VW4000 que es

deficiente en el sistema de transporte de hexosas (Le-Hir *et al.*, 2015). Además la presencia de ambas proteínas en el xilema resulta importante para la formación de las paredes celulares de los vasos del xilema, ya que las mutantes dobles tienen una severa modificación en las paredes celulares, aunque se desconoce de dónde provienen los azúcares que usan los SWEETs en un tejido con poca concentración de azúcares.

Adicional a lo anterior los *SWEET11* y *12*, junto con *SWEET15* están involucrados en la salida de sacarosa de los tejidos maternos de la semilla que son necesarios para que la semilla de *Arabidopsis* los almacene para su uso en la posterior etapa del desarrollo, la germinación (Chen *et al.*, 2015b). Otra cuestión importante de resaltar es que tanto *SWEET11* como *SWEET12* parecieran estar actuando sinérgicamente, ya que las mutantes simples y las dobles tienen fenotipos diferentes y ambas parecen estar involucradas en los mismos procesos (Le-Hir *et al.*, 2015). En maíz se encuentran anotadas dos versiones del *SWEET12*, *SWEET12a* y *b*, pero como se mencionó anteriormente en este trabajo no se logró determinar la presencia del *SWEET12b*, mientras que el *SWEET12a* parece solo estar presente en las raíces embrionarias. No buscamos a *SWEET11* ya que este es más abundante en semilla en formación y espiga (Sekhon *et al.*, 2011). Pero sería interesante determinar si *SWEET11* se expresa también en las raíces.

El *ZmSWEET14* se encuentra en el clado III que corresponde a los SWEET que transportan sacarosa y glucosa con baja afinidad y de localización en la membrana plasmática, sin embargo no se ha determinado su actividad, ni tampoco su localización intracelular. Pero el *SWEET14* de arroz se ha demostrado que se activa por los efectores TAL que secretan varias bacterias, de manera similar a *OsSWEET11* y *12* (Streubel *et al.*, 2013)

Respecto a *ZmSWEET3b* se tiene colocado en el clado I en donde se encuentran aquellos que transportan hexosas y en *Arabidopsis* se expresa en la flor, sin embargo al momento no hay nada reportado sobre este SWEET (Chen *et al.*, 2015a).

Resumiendo se encontró una expresión distinta de los SWEETs en las raíces dependiendo de su edad (Tabla 7), sin embargo, hasta no conocer la actividad

de transporte de los presuntos SWEET no es posible determinar su contribución a la poza de azúcares exudados.

El presente trabajo nos da un punto de partida para investigar sobre las características de estos transportadores, por ejemplo su localización específica tanto en alguna región de la raíz como en la célula, así como determinar su capacidad de transporte, con lo cual nos permitirá establecer cuál es su relevancia fisiológica.

Tabla 7. Resumen de la expresión, posible actividad y localización intracelular de los SWEETs de raíces de maíz.

SWEET de maíz	Localización celular del homólogo en Arabidopsis	Azúcar que transporta el homólogo en Arabidopsis	Expresión determinada por tiempo real			
			Raíz embrionaria		Raíz post-embrionaria	
			-T	+T	-T	+T
SWEET2	Vacuola	Glucosa	SI	+	SI	+
SWEET3b	No determinado	Hexosas predicho	ND	+	SI	+++
SWEET12a	Membrana plasmática	Sacarosa > Glucosa, Fructosa	SI	+	ND	ND
SWEET14b	Membrana plasmática predicho	Sacarosa y Glucosa predicho	SI	+++	SI	+

SI. Si detectado; ND. No detectado; -T sin bioprimering con *T. asperellum*; +T con bioprimering con *T. asperellum*. + significa el grado de aumento en la expresión en presencia de *T. asperellum*.

7.3. Efecto del bioprimering en la expresión de los SWEET en las raíces.

El bioprimering es el tratamiento pre-germinativo que se les da a las semillas para promover el crecimiento de planta. Hay varios microorganismos que tienen esa capacidad de promover el crecimiento como *Aspergillus ustus*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis* GB03, *Rhizophagus irregularis*, *Glomus mosseae*, *Piriformospora indica*, *Medicago truncatula* entre otros, y en

este trabajo se evaluó a una especie del género *Trichoderma*, *T. asperellum* (Sukumar *et al.*, 2013). En maíz, *Trichoderma* mejora el vigor de la planta y el crecimiento de la parte aérea (Guzmán-Chávez, 2013), modifica la arquitectura de la raíz al aumentar la densidad y longitud de los pelos radiculares (López-Coria, 2015) lo que sugiere que al aumentar la superficie en contacto con el suelo mejorará la captación de agua y nutrientes. Se conoce que las plantas se pueden aclimatar a la deficiencia nutrimental mediante la remodelación de su sistema de raíces, por ejemplo cuando hay un déficit de agua en el suelo el carbono es transportado a sus raíces para sostener su desarrollo (Durand *et al.*, 2016). Es posible que los transportadores tipo SWEET estén involucrados en este proceso.

En este trabajo examinamos el efecto de *T. asperellum* en la expresión de los transportadores SWEET en las raíces embrionarias y post-embrionarias del maíz Chalqueño. En raíces embrionarias el SWEET14b fue el que más se incrementó por efecto del tratamiento de biopriming; mientras que en las raíces post-embrionarias SWEET3b se incrementó más. Como se mencionó anteriormente ninguno de estas dos proteínas ha sido caracterizada (Tabla 7).

La expresión de los SWEET se afecta cuando la planta interacciona con microorganismos, se ha especulado que esto ocurre para que la planta le done carbono al microorganismo para su nutrición. Por ejemplo, en hojas de *Arabidopsis* después de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, se incrementó la expresión de *AtSWEET4, 5, 7, 8, 10, 12 y 15*. La infección con *Golovinomyces cichoracearum*, que produce podredumbre o cenicilla, indujo la expresión de *AtSWEET12*, mientras que *Botrytis cinérea* aumentó la expresión de *AtSWEET4, 15 y 17* (Chen *et al.*, 2010).

Se ha encontrado en otras especies de plantas que los patógenos alteran la expresión de los SWEETs, aunque no todos los SWEET responden a las proteínas secretadas por los microorganismos. Los efectores TAL, son proteínas que funcionan como factores transcripcionales y al ser inyectados en el citoplasma de las plantas por el microorganismo, se dirigen al núcleo y se unen a los promotores de varios genes, incluyendo a los SWEETs. Así se encontró que la expresión de *OsSWEET12 y OsSWET14* con *X. oryzae* pv.

oryzae aumentó sin embargo, hay otros SWEET que no se vieron afectados por estos efectores (Streubel *et al.*, 2013). Con la finalidad de manipular la expresión de los SWEETs se han diseñado efectores TAL artificiales con una alta similitud a los secretados por las cepas de *X. oryzae pv. Oryzae*, *OsSWEET13* y *15* se indujeron con los TAL artificiales, aunque de manera natural no se ha encontrado un efector que module su actividad (Streubel *et al.*, 2013; Eom *et al.*, 2015).

El encontrar que hay SWEETs que se expresan en presencia de un microorganismo benéfico como *Trichoderma* lleva a plantear que es necesario encontrar el mecanismo para entender como los microorganismos adquieren esa habilidad para cohabitar con la planta y como la planta distribuye el carbono de manera distinta ante diferentes circunstancias, ya sea benéficas o patogénicas.

Los microorganismos patogénicos manipulan la expresión de los transportadores SWEET de la membrana plasmática y es posible que la planta responda disminuyendo el efecto de pérdida de solutos incrementando la expresión de transportadores vacuolares lo que llevaría a secuestrar azúcares en la vacuola. El *SWEET2* es un ejemplo de lo anterior, al inducirse por la presencia del microorganismo disminuye la virulencia de *Pythium* (Chen *et al.*, 2015a). En el caso de maíz, *Trichoderma* induce la expresión en hojas del *ZmSWEET13a* (Carvente-García, 2014) que ahora sabemos que es un transportador vacuolar (pQFB Nancy Hernández-Chávez comunicación personal).

Adicionalmente, aunque se encontraron SWEETs que se expresan en ambos estadios del crecimiento de las raíces, como *ZmSWEET2* y *14b* ambos no se indujeron de igual manera ante la presencia de *T. asperellum*. Es posible que la planta se haya adaptado a la presencia de *T. asperellum* por lo que la inducción es distinta o bien que las necesidades metabólicas del hongo sean diferentes por lo que no induce al mismo nivel a estos SWEETs. Por lo que es necesario encontrar el mecanismo que induce la expresión de los SWEET en las raíces de maíz cuando la planta interacciona con *T. asperellum*.

8. CONCLUSIONES

Se encontró una expresión diferencial de los SWEET dependiendo del desarrollo de las raíces. Las raíces embrionarias expresaron a *ZmSWEET2*, *12a* y *14b*; y durante la interacción con *T. asperellum* la expresión del *ZmSWEET14b* fue la que más se incrementó. Mientras que en las raíces post-embrionarias los SWEETs que se encontraron presentes fueron *ZmSWEET2*, *3b* y *14b*, siendo el *ZmSWEET3b* el que más se expresó durante la interacción de la planta con *T. asperellum*. Lo anterior nos permite sugerir que la planta responde de manera diferente dependiendo de la edad de la planta ya que a pesar de expresar a *ZmSWEET2* y *14b* en las dos etapas estudiadas, la inducción en la expresión debida a *T. asperellum* no fue la misma.

9. Perspectivas

1. Comparar los contenidos de azúcares en los exudados de las raíces de plantas de maíz control con las que pasaron por el biopriming.
2. Localizar intracelularmente y caracterizar funcionalmente a ZmSWEET2, 3b y 14b, es decir determinar su especificidad por azúcares, para determinar su contribución a los exudados de las raíces de maíz en los dos estados del desarrollo estudiados.
3. Analizar el genoma de *Trichoderma* para buscar proteínas efectoras que pudieran funcionar como factores transcripcionales.
4. Fraccionar los exudados de *T. asperellum* y determinar si alguno de estas fracciones modifica la expresión de los SWEETs.

10. REFERENCIAS

- Aiken RM, Smucker AJM. 1996. Root system regulation of whole plant growth. *Annual Reviews of Phytopathology* 34, 325-346.
- Arredondo-Vega B, Voltolina D. (2007). CAPÍTULO 2 CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO. En Arredondo-Vega B & Voltolina D, *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (1st ed, 21-29). CiB. Recuperado a partir de: https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECuento_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO
- Bailey BA, Lumsden RD. 2004. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. En: Harman, GE; Kubicek CP. *Trichoderma and Gliocladium. Vol. 2 Enzymes, biological control and comertial applications*. Taylor and Francis. 185-204.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Reviews of Plant Biology* 57,233-266.
- Bennetzen J, Hake S. 2009. *Handbook of Maize: Genetics and Genomics*. USA. Springer.
- Carvalhois LC, Dennis PG, Fedoseyenko D, Hajirezae M-R, Rainer Borriss, Nicolaus von Wirén. 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174, 3–11.
- Carvente-García R. 2014. Clonación molecular y perfil de expresión del RNAm de un transportador de azúcares tipo SWEET durante la infección del maíz por los hongos *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. Posgrado de ciencias bioquímicas. UNAM.
- Chen H, Huh J, Yu Y, Ho L, Chen L, Tholl D, Frommer WB, Guo WJ. 2015. The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *The Plant Journal* 83 (6), 1046-1058.
- Chen L, Lin I, Qu X, Sosso D, McFarlane H, Londoño A, Samuels AL, Frommer WB. 2015b. A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters

- in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo. *The Plant Cell*, 27 (3), 607-619.
- Chen LQ , Qu XQ ,Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207–211.
- Chen LQ, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WF. 2015a. Transport of sugars. *Annual Review of Biochemistry* 84, 865–894.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White F, Somerville S, Mudgett MB, Frommer WB. 2010 Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468,527–532.
- Cohn M, Bart R, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou BH, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2014. *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator–like (TAL) effector–mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Mol. Plant-Microbe Interact* 27,1186–1198.
- Conde A, Martins V, Noronha H, Conde C, Fontes N, Gerós H. 2011. Solute transport across plant cell membranes. *Canal bq.* (8). 20-34.
- Contreras-Cornejo. HA, 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.
- Cupull SR, Andréu RCM, Pérez NC, Delgado PY, del C. Cupul SMI. 2003. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Centro Agrícola*, año 30, no. 1.
- Dennis C, Webster J. 1971. Antagonist properties of species groups of *Trichoderma*. III: hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society* 57,363-369.
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* 17 (7), 413-422.
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N. 2016. Water deficit enhances C export to the roots in *A. thaliana* plants

- with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiology* 170 (3), 1460-1479.
- Eom J, Chen L, Sosso D, Julius B, Lin I, Qu X, Braun D, Frommer WB. 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 53-62.
- Escaso-Santos F, Martínez-Guitarte J, Planelló-Carro M. 2010. *Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal*. Madrid: Pearson. 20-27.
- Flores-Vindas E. 2013. *La planta: estructura y función*. 4ta edición. Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- Freeling M, Walbot V. 1994. *The Maize handbook*. New York: Springer-Verlag.
- Gong Fangping, Wu Xiaolin, Zhang Huiyong, Chen Yanhui, Wang Wei. 2015. Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. *Frontiers in Plant Science* 6, 8-35.
- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra fusarium verticillioides. Tesis de maestría. Posgrado de Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Haller TH y Stolp H. 1985. Quantitative estimation of root exudation of maize plants. *Plant and Soil* 86, 207-216.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004a. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2, 43-56.
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. *Phytopathology* 96, 190-194.
- Herramientas del sitio: <http://www.maizegdb.org/>.
- Herramientas del sitio: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/.
- Hochholdinger F, Woll K, Sauer M, Dembinsky D. 2004. Genetic dissection of root formation in maize (*Zea mays*) reveals root-type specific developmental programmes. *Annals of Botany* 93, 359-368.
- Howell CR, Stipanovic RD, Lumsden R. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Science Technology* 3, 435-441.
- Ishikawa H, Evans ML. 1995. Specialized zones of development in roots. *Plant Physiology* 109, 725-727.

- Jiménez-García L, Ruíz-Gutiérrez, R. 2007. *Conocimientos fundamentales de biología*. México: UNAM, Secretaría de Desarrollo Institucional.
- Keszler A, Forgacs E, Kotal L, Vizcaíno J. A., Monte E., García-Acha I. 2000. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Chromatographic Science* 38, 421-424.
- Kubicek CP, Harman GE. 1998. Trichoderma and Gliocladium. *Basic biology, taxonomy and genetics vol. 1*, Taylor & Francis Ltd., London, UK ISBN 0-7484-0572-0.
- Le-Hir R, Spinner L, Klemens P, Chakraborti D, de Marco F, Vilaine F. 2015. Disruption of the sugar transporters AtSWEET11 and AtSWEET12 affects vascular development and freezing tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant* 8 (11), 1687-1690.
- Lemoine R, Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Grousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-22.
- Lima da Silva L, Lopes-olivares F, Rodrigues de Oliveira R, Garcia-Vega MR, Oliveira-Aguiar N, Pasqualoto-Canellas L. 2014. Root exudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2014, 1-23.
- Lin IW, Sosso D, Chen L Q, Gase K, Kim S G, Kessler D, Klinkenberg P M, Gorder M, Hou BH, Qu XQ, Carter C, Baldwin I, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* 508, 546–549.
- López-Coria M. 2015. *Trichoderma asperellum* induce el desarrollo de plántulas de maíz y aumenta la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática. Tesis de maestría. Posgrado de Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Manck-Götzenberger J, Requena N. 2016. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. *Frontiers in Plant Science* 7 (487), 1-14.

- Moity, T.H. 1982. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in Pea and Bean rhizospheres. *Phytopathology* 72 (1), 121-125.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9), 45e-45.
- Qi W, Zhao L. 2012. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of Basic Microbiology* 53 (4), 355-364.
- Rasmann S, Turlings TCJ. 2016. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Current Opinion in Plant Biology* 2016, 32, 62–68.
- Rincón, G. 1992. Control Biológico de *Rhizoctonia solani* con *Trichoderma* spp. en semilleros de café. *Cenicafé* 43 (3), 73-83.
- Salisbury, F. 1994. Fisiología vegetal. 4ta Edición. México: Grupo Editorial Iberoamericana.
- Sekhon R, Lin H, Childs K, Hansey C, Buell C, de Leon N, Kaeppler S. 2011. Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal* 66 (4), 553-563.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gobierno | [gob.mx](http://www.gob.mx). 2016. [Gob.mx](http://www.gob.mx). Recuperado 12 Septiembre 2016, a partir de <http://www.gob.mx/siap/>.
- Singh A, Sarma B, Singh H, Upadhyay RS. 2014. *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Tricoderma*. India 533-542.
- Slewinski TL. 2011. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: A physiological perspective. *Molecular Plant* 4 (4), 641-662.
- Sosso D, Luo D, Li QB, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch KE, McCarty DR, Chourey PS, Rogowsky PM, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer WB. 2015. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47 (12), 1489-1493.
- Stefanova M, Leiva A, Larrinaga L, Coronado MF. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad Agronomía (LUZ)* 16: 509-516.

- Stelpflug SC, Sekhon RS, Vaillancourt B, Hirsch CN, Buell CR, de Leon N, Kaeppler SM. 2015. An expanded maize gene expression atlas based on RNA-sequencing and its use to explore root development. *Plant Genome* 9, 1-16.
- Streubel J., Pesce C., Hutin M., Koebnik R., Boch J., Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* 200 (3), 808-819.
- Sukumar P, Legué V, Vayssieres A, Martin F, Tuskan GA. 2013. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant, Cell and Environment* 36, 909–919.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2(2), 70-78.
- Tao Y, Cheung LS, Li S, Eom J-S, Chen L-Q, Xu Y, Feng L. 2015. Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homo-trimeric complex. *Nature*, 527 (7577), 259–263.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132(20), 4521-4531.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti ML, Marra R, Woo SL, Lorito M. 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1- 10.
- Vincent P. 2012. *Zea Mays* (Maize, Corn). *Els*.
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco J. 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiology* 132 (1), 44-51.
- Wang Y, Hayatsu M, Fujii T. 2012. Extraction of Bacterial RNA from Soil: Challenges and Solutions. *Microbes and Environments* 27(2), 111–121.
- Yadav UP, Ayre BG, Bush DR .2015. Transgenic approaches to altering carbon and nitrogen partitioning in whole plants: assessing the potential to

improve crop yields and nutritional quality. *Frontiers in Plant Science* 6, 275.

Yedidia I, Benhamou N, Chen I. 1999. Induction of defense response in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology* 65, 1067-1070.

Yuan M, Wang S. 2013. Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant* 6(3), 665-674.

11. ANEXOS

A 1. Procedimiento para el cálculo de número de conidios de *Trichoderma asperellum*.

Fundamento

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen (Figura 20). Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 mm². La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm³, es decir 0.1 μL (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007).

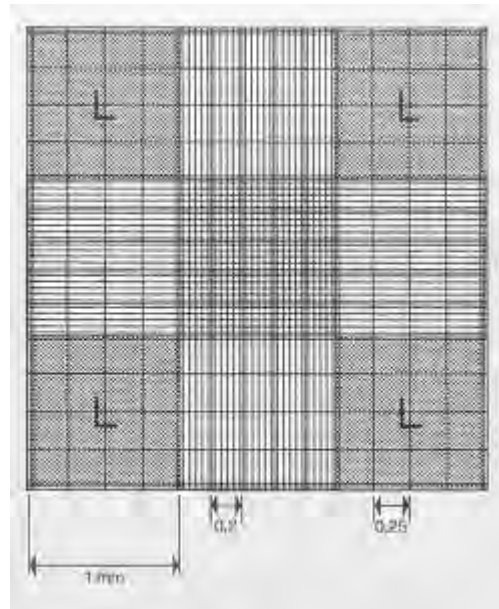


Figura 22. Vista de la Cámara de Neubauer 10X

Cálculos

Se realizó la cuenta de conidios y se obtuvo el número promedio de conidios que fueron contabilizados en los cuatro cuadrantes (áreas L de la Cámara de

Neubauer), los que fueron posteriormente aplicados en la siguiente relación matemática:

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

Donde el volumen del cuadrante es

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

Para convertidos a mL sería:

$$\left(\frac{1000 \text{ mL}}{1000000 \text{ mm}^3}\right) (0.1\text{mm}^3) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

Por tanto

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

↑
↓

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

Entonces, si se obtuvo lo siguiente:

Promedio = 52 conidios

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

Por tanto

$$(52 \text{ conidios}) \left(\frac{1000}{10}\right) (10^4) = 5.2 \times 10^7 \text{ conidios/mL}$$

Pasamos la concentración en términos de μL y queda:

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

Sabemos que cada semilla de maíz necesita 1,000 conidios por mL, si suponemos que inocularemos 80 semillas de maíz, entonces necesitamos 80,000 conidios, por lo que hacemos el siguiente cálculo:

$$80,000 \text{ conidios} \times \frac{\mu\text{L}}{52000 \text{ conidios}} = 1.53 \mu\text{L de suspensión de conidios}$$

Por tanto, se agregan 1.53 μL de suspensión concentrada de conidios a 80 semillas de maíz en 80 mL de agua.

A 2. Preparación del material para la obtención de RNA.

Consideraciones generales: Para extraer RNA siempre se deben mantener condiciones de esterilidad, 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 sólo sesión, y trabajar a lo máximo 6 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 y lavar con él las paredes del mortero ayudándose del pistilo, a continuación el mismo hipoclorito de sodio se deja reposar por 15 min. Al finalizar el tiempo enjuagar con abundante agua el recipiente, para secarlo voltearlos sobre papel y dejarlos hasta que se sequen, después enjuagar con H₂O-DEPC estéril, el mortero y el pistilo, para así poderlos secar y envolver en papel aluminio o meter en una bolsa de esterilización. Finalmente se esterilizan en el autoclave a 20 min y una vez tibios se almacenan a -70°C.

Puntas de micropipeta.- Las que se utilizan cuando se trabaja con RNA se esterilizan por 20 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm² (15 lb/in²).

Cámara de electroforesis.- La cámara y los peines de ésta, que se utilicen para correr las muestras de RNA, se deberán lavar previamente con agua y una solución de SDS al 10%. La cámara se deja 30 min en agitación constante y moderada con SDS al 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.

A 3. Secuencias de nucleótidos de los posibles SWEETs de raíces de maíz.

Secuencias de los cinco posibles SWEET de expresión en raíz. Sombreado en color amarillo el par de oligonucleótidos que se usaron para PCR punto final y en color azul los que se usaron para qPCR.

ZmSWEET2->GRMZM2G324903_T01

CCGAGAAGGAAAGCGCAATTAAGCAGCACGGGCAACACGCCGAGCAAACAGCGAAA
TCCTCAAATCCCCACCCGGCTGGTGACGGCGCCGCCCGCTGCTGCCTGCGGTCTCTG
CTTCTGCTAATAGTAATAGGTATTGAGATTCGAGCAGAGCACTCCCGTGTGCAGGCAAGG
GAGGACGCACCACCATGGATTGGGATGCTCCGGCATTGACGAGCTTCGTCGCCGACTTGT
CCTTCCGCCACCTCTGCTGCTACGGGGCCGGAATCGCAGGGAACGCCTTCGCCTTCGTG
CTCTTCGTCTCCCCGCTCCCCACATTCAAGAGGATCGTCCGCAACGGATCCACGGAGCAG
TTCTCGTGCACGCCGTACATCTACTCGCTGCTCAACTGCCTCATCTGCATGTGGTACGGCC
TCCCCTTCGTCTCCTACGGCGTCGTCTCGTCGCCACCGTCAACTCCATCGGCCGCCGTGT
TCCAGCTCGCCTACACCGCCGTGTTTCATCGCCTTCGCCGACGCCAAGCAGAGGCTCAAGG
TCTCTGCTCTCCTGGCCGCTGTCTTCCTGGTGTTCGGACTGATTGTGTTTGTAGTCTGGC
TTTGTGGATCACAAGCCCGGCAGGTGTTTCGTCCGATATCTCAGCGTCCGCTCCCTCGT
ATGCATGTTCCGCTCCCATGTCAATCGTCAATCTGGTCATCCGGACGAAGAGCGTGGA
ATACATGCCCTTCTACTTGTGATTATCCATGTTTCTGATGAGTGCATCCTTCGTATACG
GAGTGCTGCTTGGTGTGATGGCTTCATATATATCCAAATGGCATTGGAACCATATTGGGTAT
CGTACAGTTGCTGCTGTATGCCTACATCAGAAAGGGATCAAGCGAGGAAGCCAAGCTGCC
CTTACTAATCACACATACATGAGCATGCCAAAAGGGAAAAAAAACAAGGTTTCGCTGATAGG
CTTCCCGAAATCCTGTCTCTGGTCAAACCTCCAGGTGCATGTAATTTGTCGAATTGTTTTG
CTCCTGTGAAAAAGCATGCCGTTCTTTCTGTTTTGTTACACGCGACGGGGATCGTAGTTT
CGCTGTATATCCATGGTAGATGCTCCAAGTTGTTGCTGGAGTCATTCGTTTATGAGTGAG
CGAAGCTTTGTATATAATATAGTAGTAGTAATGTGGTCCGCTGAACCTCATCAACAGAGAGG
ACCAGCTGTATACACAAAAGCAATAAAAGGATGTTACTATATCATTATCAATAAATAAA
GTTTTGTTTCGCCATATT

ZmSWEET3b-> GRMZM2G060974

TCGAGAATGGTTCCAGATACAGTTCGTGTAGCAGTAGGAATCCTAGGAAATGCTGCTTCCA
TGCTCCTCTACACAACCCCTATACTGACGTTTCAGATGGGTGATAAGGAAGGGCAACGTGG
AGGAATTCTCCTGCGTGCCAACATCCTAGCGCTGCTCAAACCTGCCTGCTGTACACCTGGTA
CGGCCTCCCGGTGGTGTAGCTCCGGTGGGAGAACCTGCCCGTGGCCACCATCAACGGCC
TGGGCATCCTGCTCGAGGTGCCTTCATCGCCATATACCTACGGTTCGCACCGGCGGAGA
AGAAGAGGTTTGCCTTGCAAGCTGGTGTCTCCTGCCCTGGCGCTGTTCCGGCCTGACGGCG
GCCTTGTGAGCTTTCGCGGCGCGCACGCCGCTCGCGCAAGGCGTTTCGTGGGCAGCGT
CGGGCTGGTGGCTTCCGTGTCCATGTACACCTCTCCAATGGTGGCCGCTAAGCGAGTCAT
CGCGACGAAGAGCGTGGAGTTCATGCCGTTCTCCCTCTCGCTCTTCTCCTTCTGTCCAG
CGCGCTCTGGATGGCGTACGGGCTGCTCGGCAGGGACCTTTCATCGCGTCCGCGAACT
TCATCGGCGTCCCGGTGGGCGTCTTCAGCTGCTGCTGTACTGCATCTACAGGAGAGACC
ACGGGGCGGCAGCCGGTGCAGAGGCGCAAGCGCATGGCCCTGCCGCCGCCGCGGATCA
GGAGAAGGGCATGAAGGCAGCGGCGCCGGTGGCCGTGCAGCCGTCAGGAGAATCCCTTG
TCCGTGTGTGTCAGTCTGTGAAGTGAATGTTTTCGTTATCTCCATCTGCGGCCCAAGCCCAAC
ACCGAACTGGACTCTCCAAGTCAATGAAATTGAAGGCTTGGCTCTTGGGCTGTACGGCC
ACATAGCAGCGACCCAACCTGTTGAGAATACGTATACGGATCAGCAGATCCACTTATGGCG
GTTTTGTTTATGAAGTCACTCTATACTTTCATGA

ZmSWEET12a-> GRMZM2G133322

GGCGTGTGCGCAGTAGAGTGTGGCCTGAACTAGCGAAACAACACAAGCTAGCTAGACA
GGCGGCCCTGCTGCTTAGCTCTCGATCCTGTTGTTAGGCACCTATTGAGAGAGCTAGCT
GAGCATTCAAGATGATTACTGTTGGGCACCCGGTGGTGTGTTGCTGTGGGGATCCTAGGCA
ACATCTTATCATTCTTGGTCACCCCTGCACAGTGCCGACGTTCTACCGTGTGTTACAAGAA

GAAGTCGACGGAGTCGTTCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCTCTGCTGAGCGCAATGC
TGTGGCTCTACTACGCGCTGCTCAGCGTGGACCTCC**TCCTCCTCTCCATCAACACC**ATCG
CCTGCGTTCGTCGAGTCCGTCTACCTCGCCATCTACCTCACCTACGCGCCCAAGCCC
TGGCTTTACCCCTCAAGCTGCTCTGCACCATGAACATGGGGCTCTTCGGGGCCATGGT
CCTTCTGTCAGTTCTACGTCGACGGGACGCGCCGCTCTCCATCGCCGGCGGCGTCCGG
TCCGCCTTCGCCCTTCGCCGTCTTCGTGCTCCTCTCACCATCATCCGGCAAGTGATCAGG
ACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCCTTCTGGCTCTCCTTCTTCTCACCGTCAGCGCCGT
GCCTGGTCTTCTACGGCCTCCTCATGAAAGATTTCTTCGTGCGGATGCCGAACGTGCTGG
GCCTGCTGTTTCGGCCTGGCCAGATGGCCCTCTACTTCGTGTACCGGAACCGGAACCCAA
AGAAGAACGGCGCCGTGTCGGAGATGCAGCAGGCAGCGGCGGTGCAGGCCGACGCCGA
GAAGGACGACGAGTCCGGCAGGCCGACGCGCATGCCGACGCCGACGGGAAGGCTCGG
ACAACCGACGACGACGGGGCCAGACGCCGCTCGTCTGACATCATGCCGCCACCGCC
ACTGCTGCCAGCGGAGAGGGCCCCGCGCTGCCGCTGCCCGCATCCGGCGATGGTG
ATGACGACCGCGCATCAGACGGCCGTGGAGGTGGTCTGATCTATACATCGGCAGAGATTG
ATCGATCGACACACACGCATGTTCCGGAGCTAGCTACATGCACGACT**GACCTGACTATGAT**
TGCTGCTCGATCATTCACTTTGTGCTACTAGTATATGTATGCGTGTGTTGACGACAT
ATGTGTATCGCGCGCGGC**ACCACGGTACAAGTAGACGC**GTATAGCTATAGTATATATAG
AAGTAAGTACTGTACGTACGAATGAATGTCTCCTGTGGTGCCCATATATGCGTATGTGTAC
TGTAAGGTCGTGTTATCTCTTCTACCTATACACGTCTGTATCTTATGCCTGTTGCCTACATG
CGCCTCTATCGTTCAACT

ZmSWEET12b-> GRMZM2G099609

ATGATCACTGTTGGGCACCCGGTGGCCTTGTGCTGTTGGGATCCTAGGAAACATCCTGTCA
TTCCTGGTCATCCTTGCACCAAGTCCGACGTTCTACCGCGTGTACGCGAAGAAGTCGAC
GAGTCGTTCCAGTCGGTGCCGTACGTGGTGGCGCTGCTGAGCGCGACGCTGTGGCTCTA
CTACGCGCTGCTGAGCACGGACCTCC**TCCTCCTCTCCATCAACACC**GTGCGCTGCGTCGC
CGAGTCCGTCTACCTCGCCGTCTACCTCGCCTACGCGCCCGGGCCCGCAAGGCGTTCA
CGCTCAAGCTGCTGTGCGCCATCAACATGGGGCTCTTCGGCGCCATGGTGCCTTCT**GC**
AGTTCTACGTCGTCGACACGCAGCGCCGCGTCTCCATCGCCGGCGGCGTGGCGCCGCC
TTCGCGCTCGCCGTCTTCGTGCTCCTCTCGCCATCATCCGGCGAGTGATGAGAACCAAG
AGCGTGGAGTTCATGCCCTTCTGGCTGTCTTCTTCTCACCGTCAGCGCCGTTGTCTGGT
TCTTCTACGGCCTCCTCATCAAAGATTTCTTCGTGCGGATGCCGAACGTGCTGGGCCTGCT
GTTCCGGCCTGGCCAGATGGTCTCTTCTTCGTGTACCGGAACCGGAACCCCAAGAAGAA
CGGCGCCGTGTCGGAGATGCAGCAGGCAGCGGCGGTGCAGGCCGACGCCGAGAAGGAGCGG
CGGTCCCACGCCAACGCCGACGGGGAGGCCGACGTGAGAACCGTCATCGTCGACATCAT
GCCGCCGCTCCCGCGATGATGAGACACGCTGACAGAGAGGCGCGCGGCGGCGCGGGG
ACAGGGAGACGCGCGGCGGCGCGAGAACAGGGAGGCGCTCGGCGGCGCGAGGACAGG
GAGGCGCTCGGCGGCGGTGGGATTTAGGGGAGGAGCATCGAGGAGGCGGCGGCGGCG
CGGGGAAAGGGATGCGCGCGGCGGCGGCGGGGGCTAGGAGGCGCGCGAAAACGCCT
GGTGCTCGGCGGCG

ZmSWEET14b>GRMZM2G015976

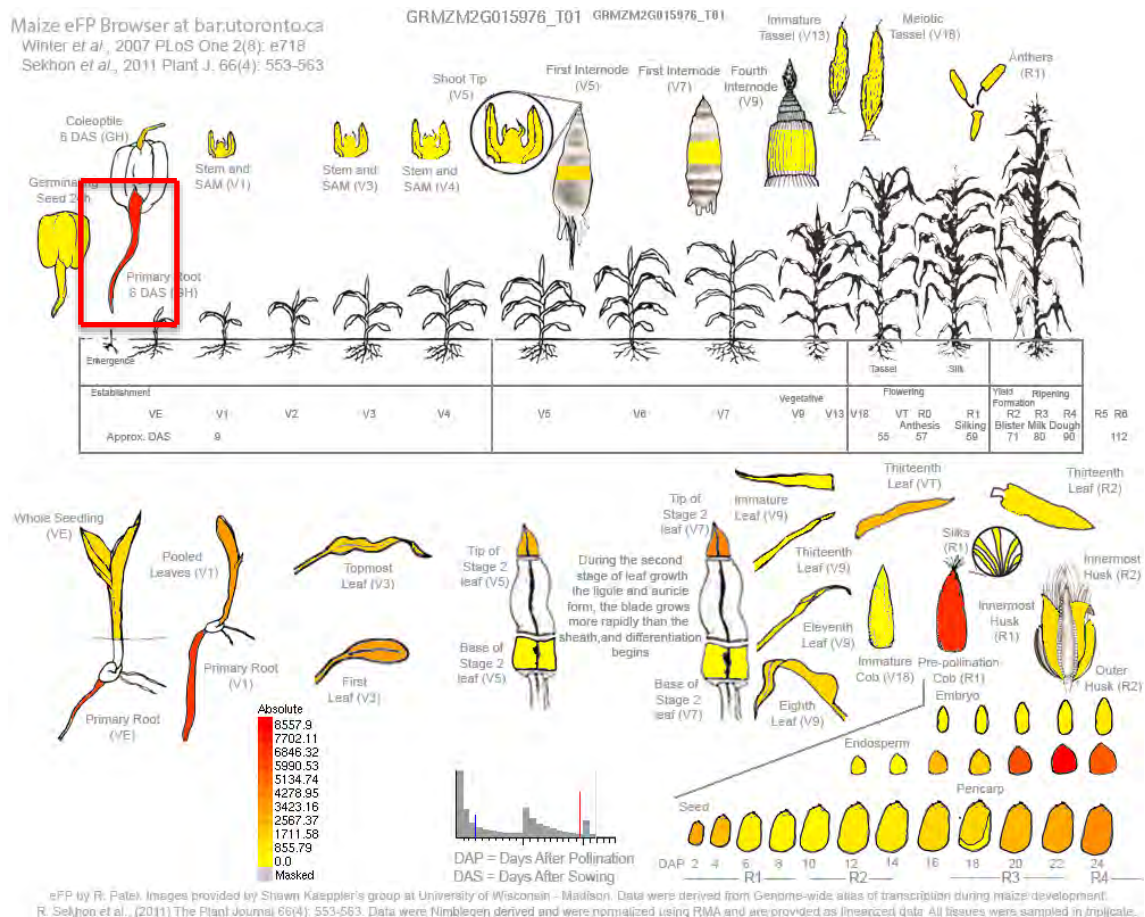
ACCATCAAGCTTTCAGGCAGGGCAAGCAACTCGAGTAGTAGTTGCCAGCCACACCTCCTG
TCTTCTTTTTCTTCTCGCATTGTGGAGGAGAAGGATCAAGTGCTCATAAGCAAGCTAGC
TTGACGAAGTATAGGAAATTAGGAATAAAATAAACTCATCCTCCTCATATATAAACGCTCG
ATCTCCAGATATGGCCGGCCTGTCCCTGCTGCATCCCATGGCCTTCGCCTTCGGCCTCCT
CGGCAACATCATCTCCTTCATGACCTACCTGGCCCCACTGCCGACGTTCTACCGGATCTAC
AAGAACAAGTCGACGGAGGGGTTCCAGTCGGTGGCGTACGTGGTGGCCCTCTTCAGCGC
CATGCTGT**GGATCTACTACGCGCTGCTC**AAGTCCAACGAGCTCCTGCTCATCACCATCAAC
TCCGCCGGCTGC**GTCATCGAGACCCTCTAC**ATCGCCATGTACCTCCTCTACGCGC**CCAAG**
AAGGCAAAGCTGTTTCACGGCCAAGATCCTCCTCCTCAACGTGGGCGTGTTCGGGCTC
ATCCTCCTCCTCACGCTGCTGCTCTCCGCCGGACAGCGCCGCGTGTGCTCCTCGGCTG
GGTCTGCGTGCCT**TTCTCCGTTAGCGTCTTCGT**CGCGCCGCTCAGCATCATCCGCCAGGT
GGTGAAGACAAGGAGCGTCGAGTTCATGCCCTTCTCGCTCTCCCTCTCCCTCACCGTCAG
CGCCGTGCTGTTCTCTACGGCCTCCTCATCAAGGACAAATACGTCGCTCTGCCAAA
CGTCATCGGCTTCAGCTTCGGCGTGGTCCAGATGGGTCTCTACGCGCTCTACCGCAACGC
GACGCCAGGGTGCCTGCCAAGGACGTGGCCGACGACGCCAGCAAGGACAAGGCGCCC

GGCGAACATGTGGTGGTCACCATTGCCAAGCTGACCGCGGGACGACGGCACCTGCAGC
TGCCGTGGCGGAGGATCTTGTCAAGGTCCACGACGGCCACCCGGAGGAAGCAGCCAAGG
GCGCCGCCAAGCCGGCGGAGAACGGCGCGGGACGCGAGCGACGCCGAGCAAGTCTAGAT
TCCTCGCTCGATCAGATCAGAATTCATGAAGAAGAACATGCGTATGTATGTGTATCCGGTA
GGTCGTAACATAACATAAATTAAGTGCGCATGCAGTTTGGCAACTCATGTTGTTTCATTTTCG
TTCTCGCGCAATATGCGCATGTATTAATTTAGATTGTCATTGTTGTAGTTCTTGCCTCCGA
TTATTATTAGTGTGTCCGTCACCTTCCATGTAATAACAAAAAATATATATAAATGGTCCTA
TTAAAGCAAAAGCTAAAGTTCGTTTTTATGCCAAA

A 4. Mapa de expresión que indica la presencia de cinco presuntos SWEET en las raíces. Datos obtenidos de la página MaizeGDB.

Los SWEETs 2, 3b, 12a, 12b y 14b se encuentran expresados mayoritariamente en las raíces primarias recuadro en rojo, mientras que el SWEET 3b se encuentra principalmente en la raíz post-embrionaria de plantas maduras (recuadro verde). La coloración amarilla indica poca expresión, mientras que la roja mayor expresión.

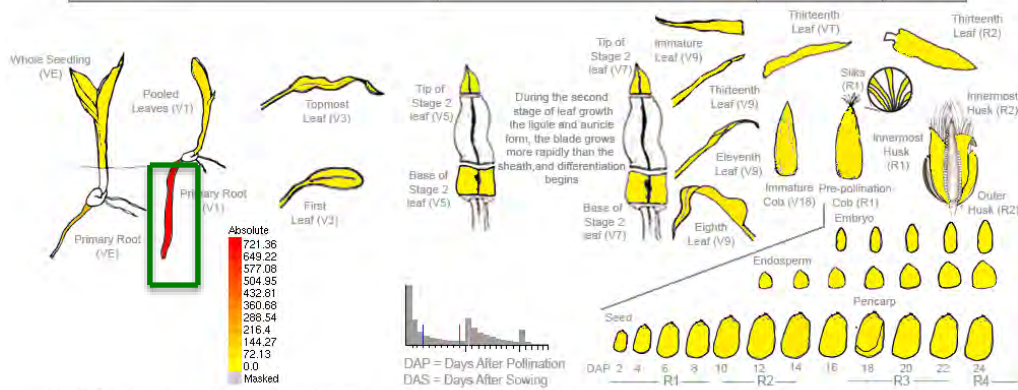
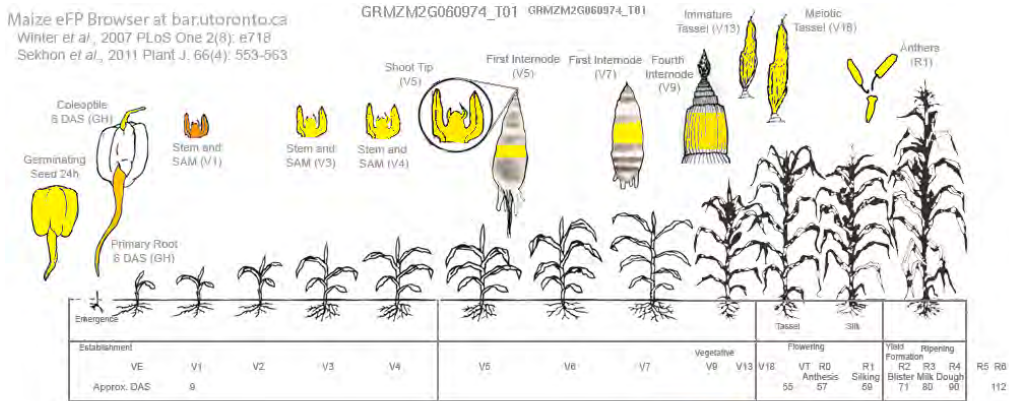
ZmSWEET2



ZmSWEET3b

Maize eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Winter et al., 2007 PLoS One 2(8): e718
 Sekhon et al., 2011 Plant J. 66(4): 553-563

GRMZM2G060974_T01 GRMZM2G060974_T01

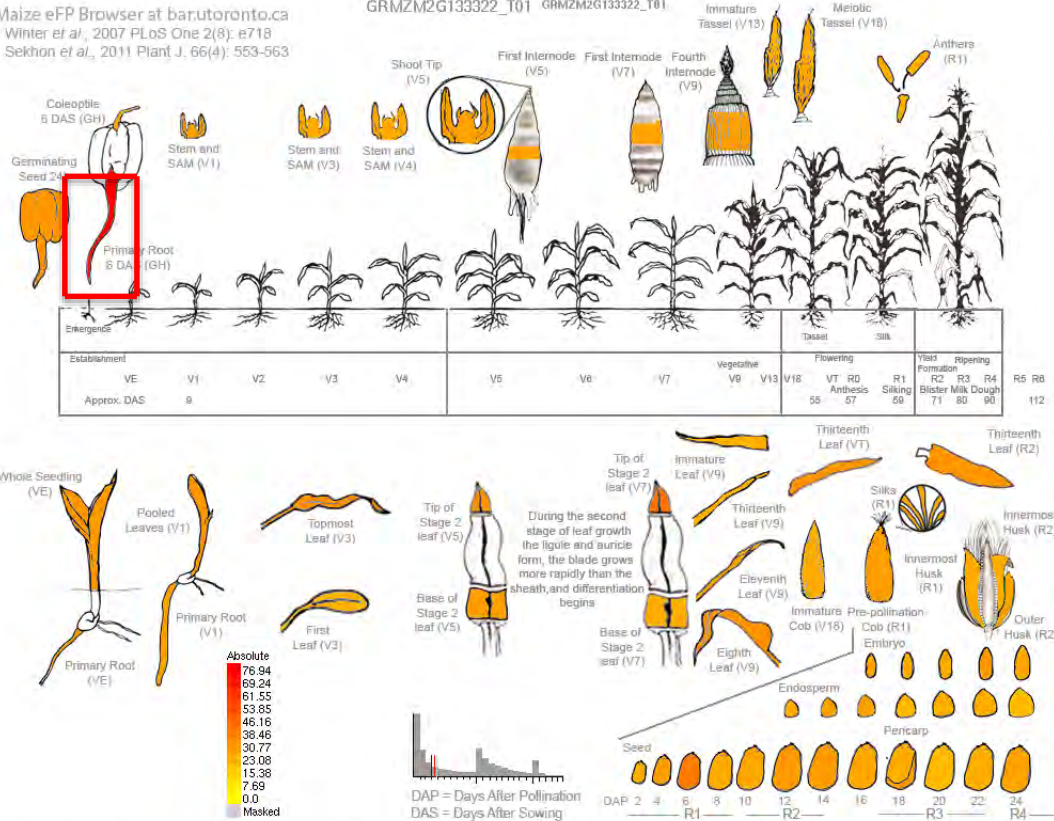


eFP by R. Patil. Images provided by Shawn Kaspller's group at University of Wisconsin - Madison. Data were derived from Genome-wide atlas of transcription during maize development. R. Sekhon et al., (2011) The Plant Journal 66(4): 553-563. Data were Nimblegen derived and were normalized using RMA and are provided as lineacced data. All tissues were sampled in triplicate.

ZmSWEET12a

Maize eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Winter *et al.*, 2007 PLoS One 2(8): e718
 Sekhon *et al.*, 2011 Plant J. 66(4): 553-563

GRMZM2G133322_T01 GRMZM2G133322_T01

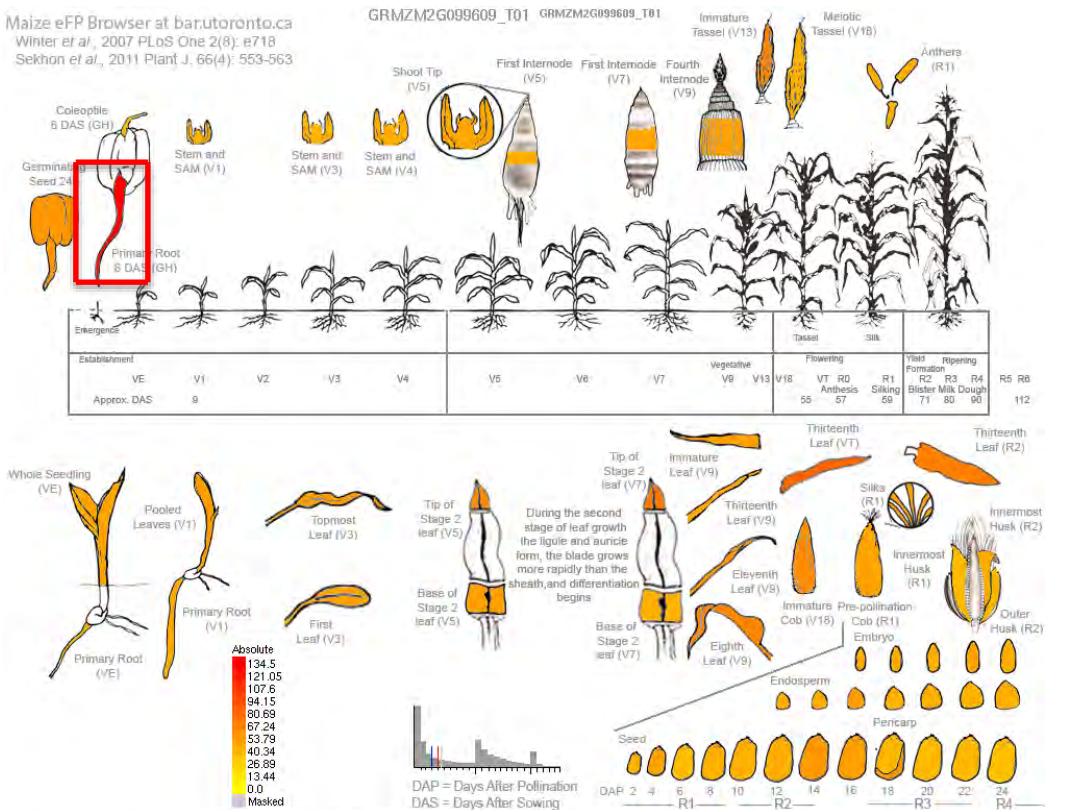


eFP by R. Patel. Images provided by Shawn Kaspieler's group at University of Wisconsin - Madison. Data were derived from Genome-wide atlas of transcription during maize development. R. Sekhon *et al.*, (2011) The Plant Journal 66(4): 553-563. Data were NimbleGen derived and were normalized using RMA and are provided as linearized data. All tissues were sampled in triplicate.

ZmSWEET12b

Maize eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Winter *et al.*, 2007 PLoS One 2(8): e718
 Sekhon *et al.*, 2011 Plant J. 66(4): 553-563

GRMZM2G099609_T01 GRMZM2G099609_T01

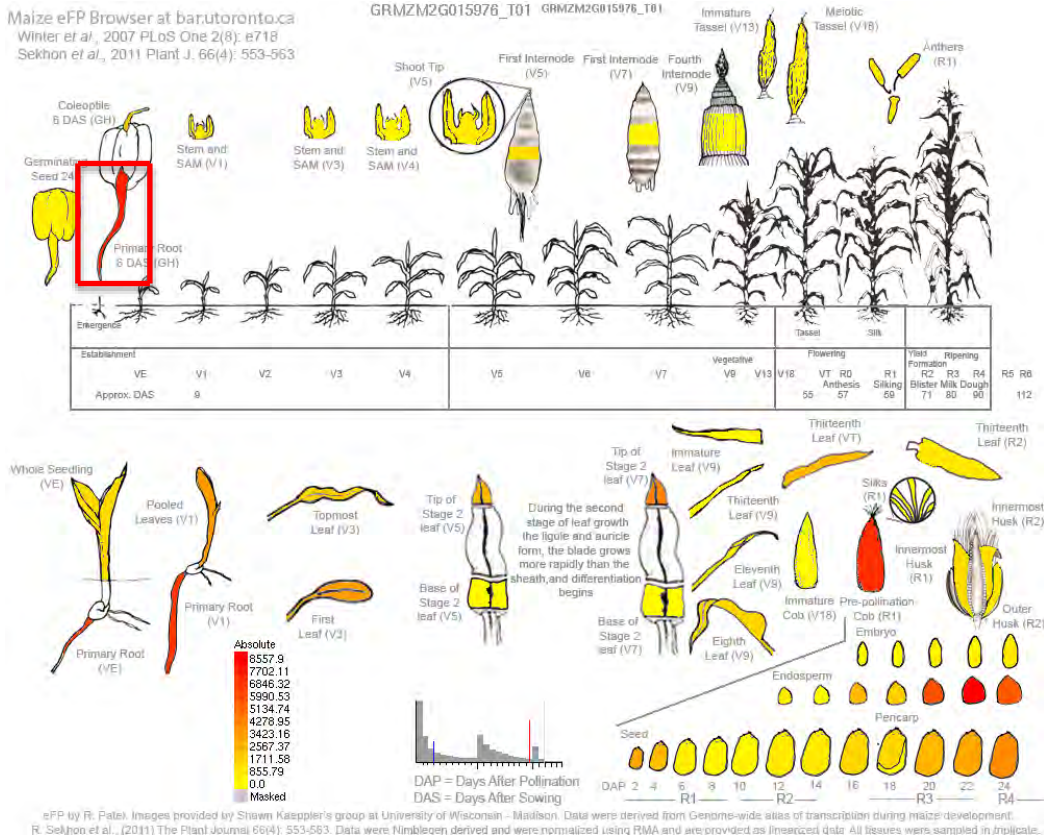


eFP by R. Patel. Images provided by Shawn Kaspieler's group at University of Wisconsin - Madison. Data were derived from Genome-wide atlas of transcription during maize development. R. Sekhon *et al.*, (2011) The Plant Journal 66(4): 553-563. Data were NimbleGen derived and were normalized using RMA and are provided as linearized data. All tissues were sampled in triplicate.

ZmSWEET14b

Maize eFP Browser at bar.utoronto.ca
 Winter *et al.*, 2007 PLoS One 2(8): e718
 Sekhon *et al.*, 2011 Plant J. 66(4): 553-563

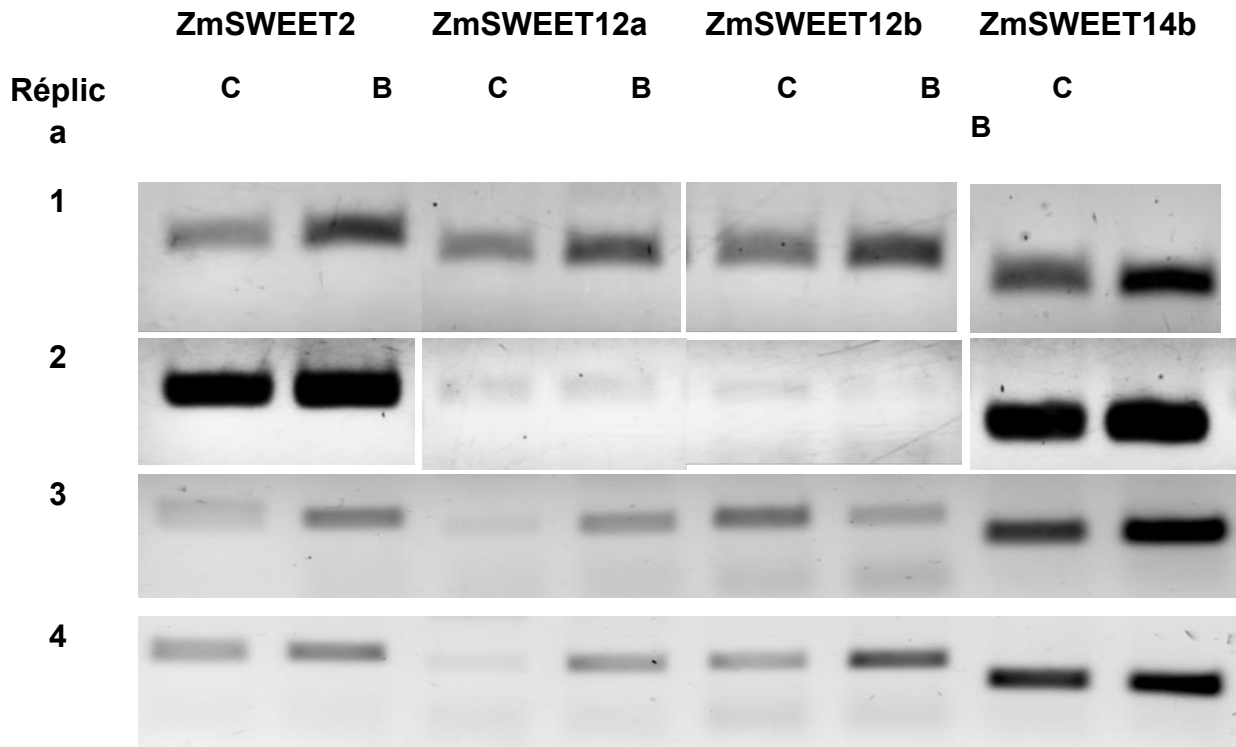
GRMZM2G015976_T01 GRMZM2G015976_T01



eFP by R. Patek. Images provided by Shawn Kaspller's group at University of Wisconsin - Madison. Data were derived from Genome-wide atlas of transcription during maize development. R. Sekhon *et al.*, (2011) The Plant Journal 66(4): 553-563. Data were Nimblegen derived and were normalized using RMA and are provided as limma2 data. All tissues were sampled in triplicate.

A 5. Imagen de los geles de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de *ZmSWEET2*, *12a*, *12b* y *14b* en cuatro lotes de raíces embrionarias.

La amplificación de cada SWEET se llevó a cabo con de 2 μ L cDNA y 1 μ L oligonucleótidos (Stock 20mM), para un volumen total de reacción de PCR de 25 μ L. C, control; B, bioprimering



A 6. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de los SWEETs12a y 12b de raíces de maíz.

