



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

EFFECTO DEL HONGO TRICHODERMA SOBRE LA EXPRESIÓN DE
LOS TRANSPORTADORES ZMSWEET EN TEJIDO AÉREO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

Moisés Méndez Ramírez

MÉXICO, CD.MX., JUNIO, 2018





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: Francisco Javier Plasencia de la Parra
SECRETARIO: Profesor: Lilian González Segura
1er. SUPLENTE: Profesor: Verónica Garrocho Villegas
2º SUPLENTE: Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Beatriz King Díaz

SUSTENTANTE (S):

Moisés Méndez Ramírez

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de tesis **“Efecto del hongo Trichoderma sobre la expresión de los transportadores ZmSWEET en tejido aéreo”** realizado por **Moisés Méndez Ramírez** fue desarrollado 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.

A la Q. Laurel E. Fabila Ibarra se agradece su apoyo técnico en el mantenimiento de los equipos que se usaron en la realización del proyecto.

El trabajo de tesis recibió financiamiento a través de:

- DGAPA-PAPIIT proyectos PAPIIT IN217214 e IN220217.
- Beca para realizar tesis de licenciatura por PAPIIT IN217214
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125

ÍNDICE GENERAL

I.	ABREVIATURAS	12
II.	RESUMEN	13
III.	INTRODUCCIÓN	14
	a. <i>Trichoderma</i> : género de hongos benéficos para las plantas.	
	b.	14
	c. Características de crecimiento y morfología de <i>Trichoderma</i>	15
	d. <i>Trichoderma</i> como agente biocontrol y promotor del crecimiento de las plantas.....	18
	e. Aplicaciones del género <i>Trichoderma</i>	20
	f. Transporte de azúcares en plantas.....	21
	g. Función de los SWEETs en las plantas.....	23
	h. Transportadores de azúcares y la interacción con microorganismos.....	26
	i. El maíz y el transporte de carbohidratos.....	29
IV.	JUSTIFICACIÓN	31
V.	HIPÓTESIS	32
VI.	OBJETIVO GENERAL	32
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES	32
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	a. Material Biológico.....	35
	1. Extracción y determinación de la concentración de conidios de <i>Trichoderma</i> spp.....	35
	b. Obtención del material vegetal.....	35
	1. Desinfección de semillas de maíz.....	35
	2. Biopriming, germinación y crecimiento de plántulas.....	36
	c. Efecto fisiológico de los hongos del género <i>Trichoderma</i> sobre las plantas de maíz.....	37
	d. Determinación de la expresión de los SWEET en la parte aérea de las plantas de maíz mediante PCR punto final y qPCR.....	37

1. Extracción de RNA.....	37
2. Obtención de cDNA.....	37
3. Reacción de PCR punto final.....	38
4. Reacción de PCR tiempo real.....	41
IX. RESULTADOS.....	44
a. Comparación del crecimiento de los hongos <i>T. atroviride</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. virens</i>	44
b. Efecto del biopriming con los hongos <i>T. atroviride</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. virens</i> en la fisiología de las plantas de 72 h de crecimiento.....	45
c. Efecto del biopriming con los hongos del género <i>Trichoderma</i> en la expresión de los SWEETs de la parte aérea de plantas de maíz de 72 h de crecimiento.....	48
d. Efecto del biopriming con los hongos <i>T. atroviride</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. virens</i> en la fisiología de las plantas de 14 días de crecimiento.....	50
e. Efecto del biopriming con los hongos del género <i>Trichoderma</i> en la expresión de los SWEETs de la parte aérea de plantas de 14 días de crecimiento.....	55
X. DISCUSIÓN.....	59
a. Efectos fisiológicos inducidos por <i>Trichoderma</i>	59
b. Efecto de <i>T. atroviride</i> , <i>T. asperellum</i> y <i>T. virens</i> en la expresión de los ZmSWEETs en los coleóptilos de plantas de 72 h de crecimiento y en las hojas de plantas de 14 días.....	61
XI. CONCLUSIONES.....	66
XII. PERSPECTIVAS.....	67
XIII. REFERENCIAS.....	68
ANEXOS.....	77
Anexo 1. Imagen de cultivo triple de las cepas de <i>Trichoderma</i> de 3 días de desarrollo en medio PDA 1X a 29°C en oscuridad.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>Trichoderma asperellum</i> y su morfología microscópica.....	16
Figura 2. Transporte de azúcares en plantas.....	22
Figura 3. Reparto de azúcares durante las interacciones planta-hongo.....	28
Figura 4. Esquema general de trabajo para el análisis de la influencia de <i>Trichoderma sp.</i> en la expresión de los SWEETs en hojas de maíz.....	34
Figura 5. Cepas de <i>Trichoderma</i> en placas de agar PDA 1X a 14 días de desarrollo.....	44
Figura 6. Plántulas de 72 h de crecimiento mostrando el desarrollo del micelio de <i>Trichoderma</i>	45
Figura 7. Plántulas de 72 h de crecimiento provenientes de semillas de maíz Chalqueño tratadas con hongos del género <i>Trichoderma</i>	46
Figura 8. Efecto de los hongos del género <i>Trichoderma</i> en la longitud de la radícula (A) y del coleóptilo (B) de plántulas de 72 h de crecimiento.....	47
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA extraído del tejido aéreo de plántulas de 72 h tratado con los hongos del género <i>Trichoderma</i>	48
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por RT-PCR de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 en tejido aéreo de plántulas de 72 h de germinación.....	49
Figura 11. Perfil de expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plántulas de 72 h por PCR punto final.....	50
Figura 12. Aspecto de las plantas de 14 días con el tratamiento con los hongos del género <i>Trichoderma</i> y acercamiento al tejido aéreo.....	52
Figura 13. Contenido de clorofila (A), grosor del tallo (B) altura (C) de plantas con 14 días del biopriming con <i>Trichoderma</i>	54
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA extraído del tejido aéreo de plantas de 14 días de crecimiento.....	55

Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por RT-PCR de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 en tejido aéreo de plantas de 14 días de crecimiento.....56

Figura 16. Perfil de expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plántulas de 14 días por PCR punto final.....57

Figura 17. Análisis de la expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plantas de 14 días por qPCR.....58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lotes de plantas usados en el trabajo.....	36
Tabla 2. Reactivos usados para la reacción de RT-PCR.....	38
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar los transcritos de SWEETs de hoja.....	39
Tabla 4. Reactivos empleados para reacción PCR punto final.....	39
Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR punto final.....	40
Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar los transcritos de los genes endógenos.....	40
Tabla 7. Reactivos usados para la reacción de RT-qPCR.....	41
Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar por qPCR los transcritos de SWEETs de hoja.....	42

I. ABREVIATURAS

6-PP	6-pentil-2H-piran-2-ona
AIA	Ácido indol acético
ASR	Resistencia sistémica adquirida
BC	Agentes biocontroles
cDNA	DNA templado
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
dNTP	Desoxinucleóticos trifosfato
FAO	Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization)
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia Forster
HEK	Células embrionarias de riñón humano
ISR	Resistencia sistémica inducida
ITS	Regiones espaciadoras internas transcritas
MBP	Proteína de unión a maltosa
MST	Transportador de monosacáridos
NaClO	Hipoclorito de sodio
PDA	Papa-Dextrosa-Agar
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RT	Transcriptasa reversa
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
Srt1	Proteína transportadora de sacarosa
SUT	Transportador de Sacarosa
SWEET	Transportador difusional de azúcares
TAL	Transcription activator-like
TvInv	Invertasa Intracelular de <i>Trichoderma virens</i>

II. RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* son considerados benéficos ya que mejoran el crecimiento de las plantas e inducen las respuestas de defensa de estas. El hongo coloniza las raíces y permanece sin causar daños, pero para crecer debe tomar los nutrimentos de los apoplastos de las raíces, sin embargo, las hojas son la fuente azúcares para todos los tejidos u organismos demanda. Por ello en este trabajo se evaluó si la colonización de tres especies diferentes de *Trichoderma*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* en plantas de maíz afectaban la expresión de la familia de transportadores de azúcares tipo SWEET en la parte aérea de las plantas. Los transportadores SWEET que mueven difusionalmente a monosacáridos y disacáridos, han sido descritos en algunas plantas como *Arabidopsis* y arroz, e interesantemente su expresión es manipulada por patógenos, al introducir proteínas que actúan como factores de transcripción. Se analizó el crecimiento de plantas que provenían de semillas que fueron tratadas con los hongos del género *Trichoderma*. Se encontró que los tres hongos, a pesar de aumentar el crecimiento de la planta a las 72 h, no afectaron la expresión de los SWEETs de la parte aérea. De manera opuesta a los 14 días de crecimiento el tratamiento con *Trichoderma* redujo el crecimiento de las plantas, aunque presentaban un contenido de clorofila similar al de las plantas control. En cuanto a la expresión de los SWEETs, la colonización por *T. asperellum* redujo la expresión de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17; mientras *T. virens* indujo la expresión de ZmSWEET13a, 13b y 17; y *T. atroviride* no modificó la expresión de los SWEETs. ZmSWEET13a y 13b son transportadores de sacarosa, por lo que la reducción en la transcripción de los SWEETs por *T. asperellum* podría explicarse como una forma de controlar el carbono que se le dona al hongo, aunque la planta se ve afectada reduciendo su crecimiento. *T. virens* de manera opuesta induce una salida de sacarosa al floema, probablemente por la mayor demanda de este carbohidrato por el hongo. Aún es necesario profundizar en los cambios metabólicos que inducen los tres hongos y caracterizar la actividad de transporte de algunos SWEETs para explicar sus efectos en la fisiología de las plantas.

III. INTRODUCCIÓN

a. *Trichoderma*: género de hongos benéficos para las plantas

El reino *Fungae* representa un gran conjunto de organismos eucariontes macro y microscópicos muy diverso (Whitaker, 1969). En México, se estima un total de 200,000 especies de hongos de las cuales sólo se ha estudiado alrededor de un 5 % (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Cabe mencionar que muchos de ellos han despertado interés en cuanto a su función y aplicaciones biotecnológicas en el área de la medicina, industria alimenticia, biorremediación y agricultura; siendo agrupados por algunos investigadores como hongos ornamentales, alimenticios, venenosos o tóxicos, alucinógenos, medicinales, contaminantes, biocontroles y patógenos (Bonifaz, 2015).

Partiendo de un enfoque ecológico y ambiental, los hongos tienen un papel importante en la descomposición de materia orgánica y aunque algunos son causantes de enfermedades en plantas (hongos patógenos), otros pueden ser usados como hongos benéficos en la agricultura, considerados agentes biocontroles (BC), éstos son capaces de reducir los efectos negativos de los patógenos y algunos incluso promueven el crecimiento de las plantas (Harman, 2006). Muchos hongos pueden ser empleados como BC, incluyendo a los micorrízicos: *Rhizoctonia spp.*, *Piridomaspora indica*, *Rhizophagus irregularis*, *Glomus intraradices* entre otros (Harman, 2011).

Un género de hongos BC no micorrízicos que ha sido ampliamente estudiado es *Trichoderma spp.*, que son hongos filamentosos pertenecientes a los *Sordariomycetes* (Nawrocka & Malolepsza, 2013) y que recientemente se ha descrito como de la familia de los *Sebacinales spp* (Shoresh *et al.*, 2010; Moretti & Sarrocco, 2016).

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 y posteriormente agrupado por Rifai en 1969 (Martínez et al. 2013). Entre 1932 y 1934 Weindling demostró que los miembros del género *Trichoderma* presentaban características como micoparásito y productor de antibióticos, mientras que hasta 1970 se reconoció el papel de *Trichoderma* como agente biocontrol de enfermedades de las plantas (Mukherjee et al., 2013). Por al menos 80 años, diversos grupos se han dedicado a dilucidar sus características, efectos y mecanismos de acción y el impacto biotecnológico que tiene para el hombre.

b. Características de crecimiento y morfología de *Trichoderma*

La descripción de *Trichoderma* fue dada por Persoon en 1794, basándose en el descubrimiento de cuatro especies en Alemania. De las cuales, únicamente una, *Trichoderma viride*, correspondía al género (Samuels, 2006). En 1969, Rifai publicó un trabajo monográfico de *Trichoderma* en el cual identifica nueve especies, algunas aisladas de especies de *Hypocrea*. Éstas fueron identificadas de acuerdo con sus diferencias morfológicas y fisiológicas, como tipo de ramificación del conidióforo, forma del conidio, crecimiento y coloración de la colonia, entre otros (Martínez et al., 2013). Si bien la correcta identificación de especies dentro del género ha sido difícil basándose únicamente en criterios morfológicos. Druzhinina y Kubicek (2005) establecieron que aproximadamente la mitad de las especies identificadas por un análisis morfológico en colecciones de *Trichoderma* se encontraban agregadas con un nombre de especie incorrecto. Por lo que, se han empleado otras metodologías para identificar las características suplementarias de los hongos, por ejemplo, la producción de metabolitos secundarios, perfiles de enzimas o isoenzimas, su capacidad como biocontrol y de infección a humanos y filogenia molecular (Atanasova et al., 2013b).

La diferenciación de especies se logró a través de su secuencia de DNA, su amplificación específica de las regiones espaciadoras internas transcritas ITS (del inglés Internal Transcribed Spacer) de rDNA y el factor de elongación de la

traducción 1 α , características que se encuentran anotadas en diferentes bancos como el GenBank y Trichoblast, éste último tiene exclusivamente al género *Trichoderma* o *Hypocrea*, la forma telomórfica (Samuels, 2006; Martínez et al., 2013). De esta forma, taxonómicamente *Trichoderma* queda clasificado dentro de la familia *Hypocreaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*; filogenéticamente agrupado dentro de 16 clados¹ basados en el alineamiento de secuencias disponibles en NCBI GenBank (Atanasova et al., 2013b): *Longibrachiatum*, *Harzianum*, *Virens*, *Chlorospora*, *Spinulosa*, *Strictipilosa*, *Ceramica*, *Gelatinosa*, *Stromaticum*, *Semiorbis*, *Hypocreanum*, *Psychrophila*, *Brevicompectum*, *Lutea*, *Pachybasium* y *Trichoderma*.

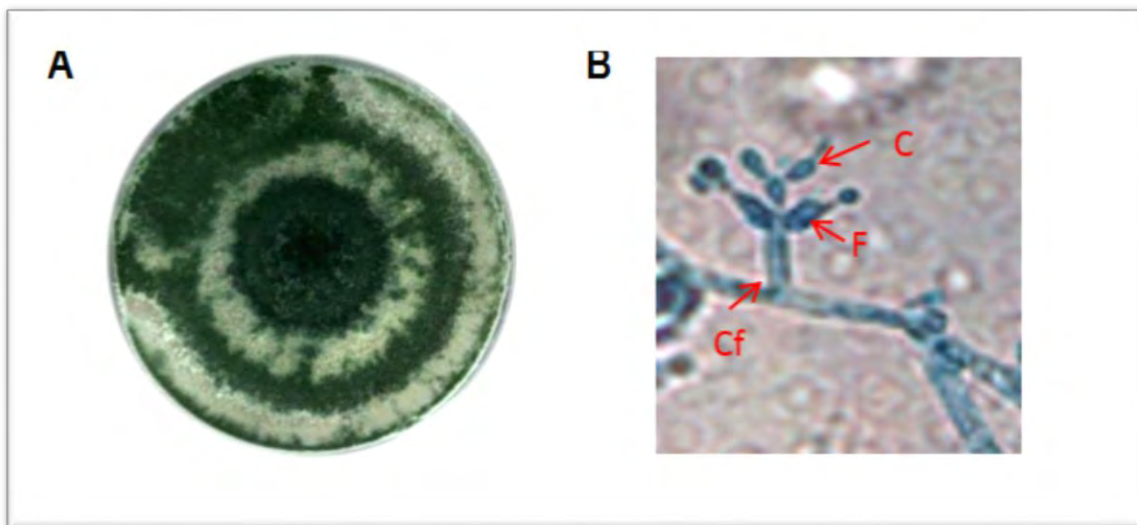


Figura 1. Cultivo de *Trichoderma asperellum* y su morfología microscópica. Crecimiento de 15 días a 29 °C de *T. asperellum* en medio 1X PDA, se observan los anillos concéntricos en verde y blanco. Microscópicamente se logran observar los conidióforos (Cf), fiálide (F) y los conidios (C). Tomado de Arciniega-Ruíz, 2012.

¹ Clado. Grupo de organismos o taxón que contiene a un ancestro común y a todas las especies o variaciones descendientes de este antepasado (Griffiths, 2006).

Fisiológicamente, *Trichoderma* es un hongo aeróbico haploide que en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples cuya pared está compuesta por quitina y glucano. Las colonias esporuladas de *Trichoderma* presentan alto desarrollo con la formación de anillos concéntricos con una coloración verde o blanca. Algunas especies de *Trichoderma* producen pigmento amarillo en el medio o un aroma característico (Samuels, 2006; Brotman et al., 2017; Sandle, 2014). La producción sexual de conidios con forma ovalada de 3-5 μm , usualmente verdes, forman conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos y pueden producir clamidiosporas unicelulares, según se observa en la Figura 1 (Martínez et al., 2013).

Debido que el género *Trichoderma* es capaz de producir una cantidad apreciable de metabolitos secundarios útiles para la industria farmacéutica (antibióticos), la de alimentos (colorantes), la de mejora de las plantas (compuestos secundarios promotores del crecimiento o antifúngicos), se han evaluado diversas condiciones de crecimiento con la finalidad de optimizar la producción de metabolitos y biomasa, entre ellas, la temperatura, luz y pH. *Trichoderma spp.* presenta desarrollo en un amplio intervalo de temperaturas, siendo el óptimo de 25 a 30°C. Mientras que a 40°C o más no se reporta desarrollo. La influencia del pH en el desarrollo del micelio ha demostrado que la producción de biomasa aumenta en un medio ácido. Siendo que varias especies fúngicas presentan un buen desarrollo a pH 5.5 (Singh et al. 2014), puede considerarse como un pH cercano al óptimo. Respecto a las condiciones de luz, varias especies de *Trichoderma* presentan un incremento en la conidiación al ser expuestas a pulsaciones de luz a diferentes longitudes de onda, teniendo mayor respuesta a la incidencia de luz azul, observando colonias con halos céntricos de conidios maduros (Steyaert et al. 2010; Schmoll et al. 2010).

Los trabajos de Kubicek y colaboradores (2003) en el sureste de Asia, y de Jaklitsch y Voglmayr (2015) al sur de Europa y Macaronesia y otros (Singh et al., 2016), han dado evidencia de que en vida libre *Trichoderma spp.* es capaz de

crecer en diferentes nichos. Esta capacidad se atribuye a que *Trichoderma* es capaz de utilizar una gran cantidad de sustratos como fuente de nutrimentos, por ejemplo, en madera, corteza, diferentes tipos de suelos, rizósfera, plantas, hongos, animales e incluso en esponjas marinas (Kubicek et al., 2008; Atanasova, 2014). Esto es debido a su vasta maquinaria enzimática que le permite degradar polímeros como celulosa, hemicelulosa, quitina, xilano, lignina (Rossi-Rodríguez et al., 2009), entre otros componentes de los sustratos donde habita. La variedad de especies en cada ecosistema, así como el fenotipo que éstas presentan, se ve determinada por la cantidad y tipo de macronutriente. Estos requerimientos se emplean como criterios de identificación de nuevas especies (Atanasova et al., 2013b).

Adicionalmente, la interacción de *Trichoderma* en cada sustrato es dependiente de la especie y del sustrato u hospedero, por lo que puede establecer relaciones saprofitas, como las descritas anteriormente, o bien simbióticas y de éstas pueden ser benéficas (endófitos en plantas) o perjudiciales (patógenos de animales) (Bailey et al., 2009; Atanasova et al., 2013a; Atanasova, 2014).

c. Trichoderma como agente biocontrol y promotor del crecimiento de las plantas.

La capacidad de *Trichoderma* como agente biocontrol se debe a que presenta varios mecanismos de acción y rutas metabólicas, las que involucran tanto la secreción de metabolitos secundarios del hongo, como cambios en la expresión fisiológica normal del hospedero para promover una respuesta de defensa ante microorganismos patógenos (Harman et al., 2004).

Una de las formas de ensayar el efecto de los hongos del género *Trichoderma* es el de realizar un pretratamiento de las semillas previo a su germinación, denominado priming o biopriming, en el que las semillas se colocan en contacto

con una concentración conocida de hongo, después se germinan y se determina el efecto del hongo (Guzmán-Chávez, 2013). La interacción *Trichoderma*-planta ocurre en la rizósfera, inicialmente con la colonización de las capas externas de la raíz sin provocar daño en la planta, por lo cual es considerado como hongo endófito (Bailey & Melnick, 2013). Posteriormente las hifas del hongo penetran la raíz, desarrollándose en el espacio intercelular, restringiéndose principalmente a la epidermis y la corteza externa (Yedidia et al., 1999). Este suceso desencadena la producción de metabolitos bioactivos, como péptidos, pequeñas proteínas y compuestos volátiles, estableciendo una comunicación química con la planta (Harman, 2011). De esta forma, el hospedero únicamente limita el desarrollo del hongo sin matarlo. Sin embargo, en la planta se ha desatado una señalización que induce efectos sistémicos que pueden observarse en toda la planta: hojas, tallo y raíz. Se induce la resistencia sistémica a enfermedades debido a la inducción de la resistencia sistémica (ISR) y la resistencia sistémica adquirida (ASR); resistencia al estrés hídrico (sequías), osmótico (suelos salinos) y al descenso en la temperatura (Guzmán-Chávez, 2013; Zeilinger & Omann, 2007).

En el mismo sentido, los BC son capaces de directamente antagonizar con microorganismos del medio, ya que algunos de los metabolitos, proteínas o enzimas secretadas presentan actividad bactericida, fungicida, proteolítica, quitinolítica entre otras actividades, por lo que la cantidad de microorganismos que pueden atacar a las plantas que están colonizadas por BC se reduce, propiciando que las plantas se mantengan sanas y continúen su crecimiento (Schuster & Schmoll, 2010; Karagiosis & Baker, 2013).

Adicionalmente, hay otros efectos que son benéficos para el crecimiento o establecimiento de la planta, como el mejorar la viabilidad de semillas de baja calidad; aumento en la eficiencia fotosintética, el incremento del desarrollo de la planta, especialmente las raíces; modificación en la arquitectura de la raíz a través del incremento en el número y densidad de pelos radiculares (Guzmán-Chávez, 2013; Harman et al., 2004; López-Coria et al., 2016). El aumento de la superficie

radicular supone un aumento en la capacidad de la planta para la toma de nutrientes.

Sin embargo, el efecto promotor del crecimiento vegetal puede ser debido a una combinación de metabolitos o ajustes metabólicos de la planta. Por ejemplo, hay especies de *Trichoderma* que producen auxinas o sus análogos, hormonas que son capaces de promover el crecimiento vegetal (Contreras-Cornejo et al., 2009). Mientras que los exudados del hongo con bajas concentraciones de auxinas podrían contener otros metabolitos que también induzcan el crecimiento vegetal (López-Coria et al., 2016).

d. Aplicaciones del género *Trichoderma*

Los hongos del género *Trichoderma* tienen una alta importancia biotecnológica tanto por su capacidad como BC, como de producción de metabolitos y enzimas (Mukherjee et al., 2013). *Trichoderma reesei* es el hongo más empleado en la industria debido a su alta capacidad de secreción y niveles de expresión enzimática, principalmente de celulasas y hemicelulasas, además de la producción de proteínas heterólogas (Druzhinina & Kubicek, 2016). Adicionalmente, es capaz de secretar una gran cantidad de metabolitos secundarios incluyendo peptaboloides, potenciales antibióticos y micotoxinas que juegan un papel importante en la adaptación y supervivencia de *Trichoderma* en diferentes condiciones ambientales, señalización e interacción con el medio (Schuster & Schmoll, 2010; Karagiosis & Baker, 2013). Mientras que *T. asperellum*, *T. virens*, *T. atroviride* y *T. harzianum* tienen importancia en la agricultura como BC, en la formulación de biofungicidas y producción compuestos con propiedad herbicida, como el viridol, metabolito secundario fitotóxico de *T. virens* (Howell, 2006; Verma et al., 2007; Mukherjee et al., 2013).

Por lo anterior hay muchos estudios encaminados a buscar la función de los metabolitos secundarios del género *Trichoderma*, así como de la búsqueda de los

blancos moleculares y los efectos fisiológicos de algunos de sus miembros en cultivos de importancia agronómica.

e. Transporte de azúcares en plantas

Los carbohidratos son de gran importancia en el desarrollo de los organismos como las plantas, ya que pueden ser empleados como fuente de carbono para la biosíntesis de otros compuestos celulares, como fuente de energía o participar en procesos osmóticos o también de señalización. En las plantas, los carbohidratos son producidos fotosintéticamente en hojas y transportados a diferentes tejidos especialmente raíces, semillas y frutos, ya que estos carecen de capacidad fotosintética.

Las vías usadas para la movilización de los fotosintatos son dos (Heldt, 2011): la vía simplástica, en la cual los solutos se mueven a través de un conducto especializado que conecta a dos o más células, los plasmodesmata, lo que permite que aquellas células que están conectadas presenten una concentración similar de algunos de los solutos, puesto que los plasmodesmata seleccionan que tipo de solutos mueven. Por otra parte, la vía apoplástica permite el paso de solutos entre células utilizando para ello proteínas membranales, transportadores que facilitan el paso de solutos hacia o por el espacio apoplástico (Figura 2).

Un porcentaje considerable de la maquinaria genética de las plantas está diseñada específicamente con el propósito de movilizar solutos mediante proteínas transportadoras a través de las membranas celulares. Siendo el transporte de compuestos de carbono (azúcares y ácidos orgánicos), el de mayor relevancia por su implicación en el crecimiento de la planta (Braun, 2012).

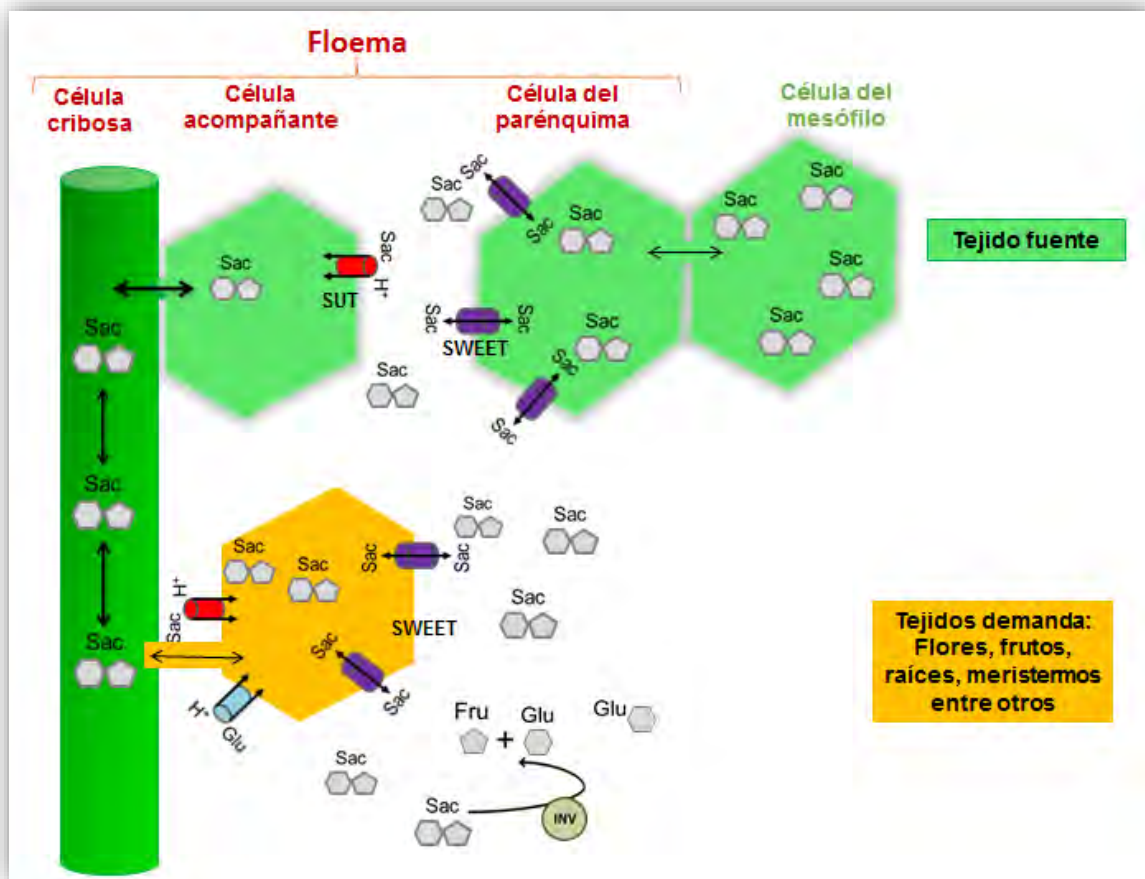


Figura 2. Transporte de azúcares en plantas. Los tejidos fuente de nutrientes como las hojas sintetizan más azúcares de los que usan, por lo que los exportan a los demás tejidos. Las células pueden transportar los azúcares mediante varias vías, cuando están conectados por plasmodesmata los azúcares viajan célula a célula por el simplasto por difusión, como es el caso del transporte entre las células del mesófilo y las del parénquima. Pero cuando las células no se encuentran conectadas por plasmodesmata, son los transportadores membranales los encargados del eflujo de azúcares (SWEETs) o del influjo de azúcares de manera independiente (SWEETs) o dependiente de la energía de la hidrólisis de ATP (simportadores de sacarosa, SUT, o de hexosas MST con protón). Modificado de Carvente-García, 2014.

Los principales grupos o familias de proteínas transportadoras en plantas comprenden a las que transportan sacarosa y monosacáridos (Figura 2). Las proteínas que se encargan de concentrar a los azúcares en la célula o compartimentos tienen una estructura en común de doce dominios transmembranales y funcionan como transportadores de tipo activo secundario, es decir, usan un gradiente iónico impuesto por una bomba primaria, para facilitar el movimiento de otro soluto. Un transportador que mueve dos solutos a la vez y hacia el mismo compartimento subcelular, es llamado simportador, en el caso de los transportadores de azúcares de esta categoría, lo hace moviendo un azúcar con protón, dos familias de simportadores los SUT (sucrose transporter) y MST (monosaccharide transporter), transportan sacarosa y hexosas, respectivamente, al interior celular. En las células acompañantes del floema son abundantes los SUT, permiten alcanzar una concentración alta de sacarosa para su eventual reparto a través de las células del tubo criboso como se muestra en la Figura 1 (Conde et al., 2011; Doidy et al., 2012).

Otra familia de transportadores de azúcares son los SWEETs, que exhiben diferencias importantes con los SUT y MST, pues a diferencia de estos, presentan siete cruces transmembranales, dispuestos en dos dominios de tres hélices cada uno conectadas por una hélice transmembranal. Funcionalmente, la más importante es que los SWEETs son uniportadores bidireccionales, es decir, transportan carbohidratos a favor del gradiente de concentración y además pueden transportar tanto disacáridos como monosacáridos, aunque algunos SWEET presentan una afinidad preferencial por alguno de ellos (Doidy et al., 2012; Chen et al., 2015a; Eom et al., 2015).

f. Función de los SWEETs en las plantas

La identificación de los SWEETs se realizó gracias al desarrollo de una técnica para el monitoreo de la concentración de azúcares intracelulares. La sonda FLIP que permite determinar la concentración intracelular de un soluto, es una proteína

quimérica que contiene tres dominios, el dominio central se construyó a partir de la proteína de unión a maltosa o MBP (del inglés Maltose Binding Protein) y se modificó de tal manera que puede unir con diferente afinidad a distintos tipos de azúcares, así hay proteínas que reconocen fructosa, glucosa, sacarosa u otras moléculas. Los otros dos dominios se encuentran en los extremos de la proteína, una proteína fluorescente distinta en cada dominio, con intervalos de absorción y emisión distintos, pero la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. De tal manera que, si la proteína es por ejemplo afín a glucosa y ésta se encuentra disponible en el medio, al unir la glucosa a la proteína, sufrirá un movimiento conformacional en sus dominios amino y carboxilo terminal, lo que permite que las proteínas fluorescentes se acerquen a una distancia corta, pero apropiada para que ocurra la transferencia de energía entre ambas proteínas fluorescentes o FRET, registrando la emisión final. (Chen et al., 2010; Eom et al., 2015)

Para determinar que un gene que se presumía era un transportador de glucosa, el grupo del Dr. Frommer realizó la transfección de ese gene en conjunto con la sonda FLIP en células que carecían de transportadores de azúcares, las células embrionarias de riñón humano o HEK, así se descubrió que AtSWEET1 es un transportador de hexosas bidireccional (Chen et al., 2010). Aunque, también se usan otras técnicas para corroborar la capacidad de transporte de azúcares, como es la complementación funcional de organismos mutantes. Por ejemplo, la mutante de levadura EBY4000 carece de transportadores de hexosas por lo que es incapaz de crecer en hexosas como fuente de carbono, pero recupera el crecimiento al ser transfectada con un SWEET que es capaz de transportar hexosas. Ahora que ya se descubrieron a los SWEETs, se han producido o identificado mutantes en Arabidopsis que carecen de uno o más transportadores, lo que ha permitido esclarecer su función en la planta (Chen et al., 2015b).

Todos los transportadores SWEETs encontrados se han clasificado filogenéticamente en cinco clados de acuerdo con su secuencia de nucleótidos, de

los cuales 4 contienen exclusivamente genes de plantas, señalando la relevancia que pueden tener estos transportadores en el metabolismo de las plantas (Chen et al., 2010). Cabe mencionar que la pertenencia o agrupación a los clados no determina de forma estricta la actividad fisiológica del transportador SWEET en el organismo de estudio, aunque hay una correlación de que los SWEETs pertenecientes al clado I y II tienen mayor eficiencia en el transporte de hexosas, en comparación con el transporte de sacarosa en los SWEETs que pertenecen al clado III, o el de fructosa que prefieren los del clado IV (Eom et al., 2015).

El mecanismo de transporte de los SWEETs es independiente del pH, es un uniportador, es decir transporta solo un tipo de molécula o sustrato a través de la membrana (Nelson & Cox, 2008; Chen et al., 2015a). Su baja afinidad por sustratos, alrededor de 10 a 50 mM puede ser indicativo de que los SWEETs son transportadores especializados y eficientes a altas concentraciones de sustrato, siendo capaces de mediar tanto el eflujo como la toma de monosacáridos y disacáridos del medio (Chen et al., 2015a). Comparativamente los SUT tienen K_m entre 0.1 a 11 mM de sacarosa (Conde et al., 2011).

Chen y colaboradores (2015a) proponen que, de forma general, el genoma de las plantas codifica para un aproximado de 20 genes SWEETs, por ejemplo, en *Arabidopsis* hay 17 y en maíz 24, aunque a la fecha aún no se han caracterizado a todos los miembros. Diversas investigaciones están enfocadas en la búsqueda y funcionalidad de los SWEETs. Se ha encontrado que los SWEETs participan en varios procesos en los que la exudación de azúcares es necesaria. Un ejemplo de la importancia de los SWEET y que permitió completar el esquema del reparto de carbono en las plantas, fue el haber encontrado que SWEET11 y 12 en *Arabidopsis* son necesarios para movilizar sacarosa desde las células del parénquima hacia las células acompañantes del floema (Figura 2), su ausencia produce plantas con un tamaño reducido, que incrementan su contenido de almidón en las hojas debida a esa incapacidad de mover extracelularmente a los azúcares, por lo que acumula el carbono en forma de almidón (Chen et al., 2010).

Adicionalmente del papel de AtSWEET11 y 12 en el llenado del floema, se conoce que para el desarrollo del polen es necesaria la expresión de SWEET8 de *Arabidopsis*. La senescencia es inducida con la expresión del AtSWEET15, la producción de néctar con AtSWEET9, en la exudación de azúcares por las raíces con el OsSWEET2, o en la formación de la semilla con AtSWEET12, 13 y 15 en *Arabidopsis* y ZmSWEET4c en maíz (Lin et al., 2014; Eom et al., 2015; Sosso et al., 2015).

g. Transportadores de azúcares y la interacción con microorganismos

El transporte de sacarosa y hexosas ocurre en toda la planta dando, no solamente soporte vital a sus tejidos demanda, sino que, además es capaz de proporcionarles azúcares a los microorganismos colonizadores (Chen et al., 2010; Chen et al., 2015b). Una de las familias de transportadores de azúcares que son sujetos a regulación a nivel transcripcional por la presencia de microorganismos patogénicos en la planta son los SWEETs (Figura 3). Por ejemplo, *Pseudomonas syringae* induce la expresión de AtSWEET2, 4, 5, 7, 8, 10, 12 y 15, mientras que *Botrytis cinerea* aumenta la expresión de AtSWEET4, 15 y 17 y *Golovinomyces cichoracearum* solo induce a SWEET12, sugere de que los microorganismos aseguran su abasto de carbohidratos mediante el incremento de los niveles apoplásticos de azúcares (Chen et al., 2010; Baker et al., 2012; Doidy et al., 2012; Eom et al., 2015).

Interesantemente, se encontró que en la bacteria *Xanthomonas. oryzae pv oryzae* la cual produce la enfermedad del tizón de la hoja de arroz, lleva a la inducción de tres SWEET en arroz, OsSWEET11, 13 y 14. La expresión controlada por *X. oryzae pv oryzae* se debe a que produce efectores proteicos que son inyectados al interior de la célula vegetal, debido a su capacidad de unirse de manera eficiente a ciertas zonas del DNA vegetal y modificar la expresión de genes se les dio el nombre de efectores TAL, de "Transcription activator-like". Se ha encontrado que

el efector PthXo1 induce la expresión de OsSWEET11, que AvrXa7, PthXo3, TalC. Tal5 inducen la expresión de OsSWEET14 y PthXo2 es el efector se une al promotor de OsSWEET13 para inducir su expresión en una variedad de arroz IR24 que es sensible a la enfermedad (Zhou et al., 2015).

Entender la función de los SWEET en la enfermedad y el desarrollo y probar la hipótesis de que la epidemia de ceniza gris en raíz así como en otras enfermedades puede estar relacionada y entrelazada con la manipulación de la expresión de los SWEETs ha llevado a plantear la producción de efectores TAL artificiales que podrían unirse a alelos de genes que llevan a la resistencia o a la susceptibilidad de la enfermedad.

Por el otro lado, los microorganismos también responden ante la interacción con la planta con el aumento de transportadores en sus membranas. Vargas y colaboradores (2011) sugieren que el eflujo de sacarosa a la rizósfera proveniente de la raíz, favorece el desarrollo de microorganismos micorrízicos y no patogénicos, mediante una señalización de azúcares que se mantiene durante la simbiosis. Sus estudios realizados con *Trichoderma virens* evidencian que cuando el hongo crece en la planta se induce la expresión de un transportador de sacarosa en la membrana del hongo, TvSUT, con una Km por sacarosa de 1 mM. La inducción de la expresión depende de la concentración de sacarosa y no de hexosas. Simultáneamente, *T. virens* incrementa la síntesis de una invertasa intracelular (TvInv) para utilizar eficientemente la sacarosa que viene de la planta (Figura 3). La inducción de ambas proteínas, TvSUT y TvInv, en *T. virens* asegura la colonización en la raíz y su sobrevivencia sin desatar la señalización debida a un incremento en el contenido de Glu en los apoplastos (Chen, 2014). Sin embargo, se desconoce si durante la interacción de *Trichoderma* también se están induciendo la expresión de los SWEETs.

Ustilago maydis es un patógeno biotrófico que depende del tejido vivo de planta para desarrollarse. Está altamente adaptado al maíz, desarrollando tumores o

agallas en las mazorcas, produciendo una enfermedad conocida como carbón común o cuiltlacoche. *U. maydis* al interactuar con el maíz produce a la proteína UmSrt1, transportador de muy alta afinidad por sacarosa con una Km 26 μ M (Wahl et al., 2010) que le permite competir eficientemente con la planta por los fotosintatos. Aunque la supresión de *srt1* reduce la virulencia de *U. maydis*, no afecta la colonización al hospedero ni su crecimiento en placa, lo que supone que dependiendo de la capacidad de toma de azúcares del hospedero le permitirá o no a la planta continuar con su crecimiento o bien a desarrollar la enfermedad.

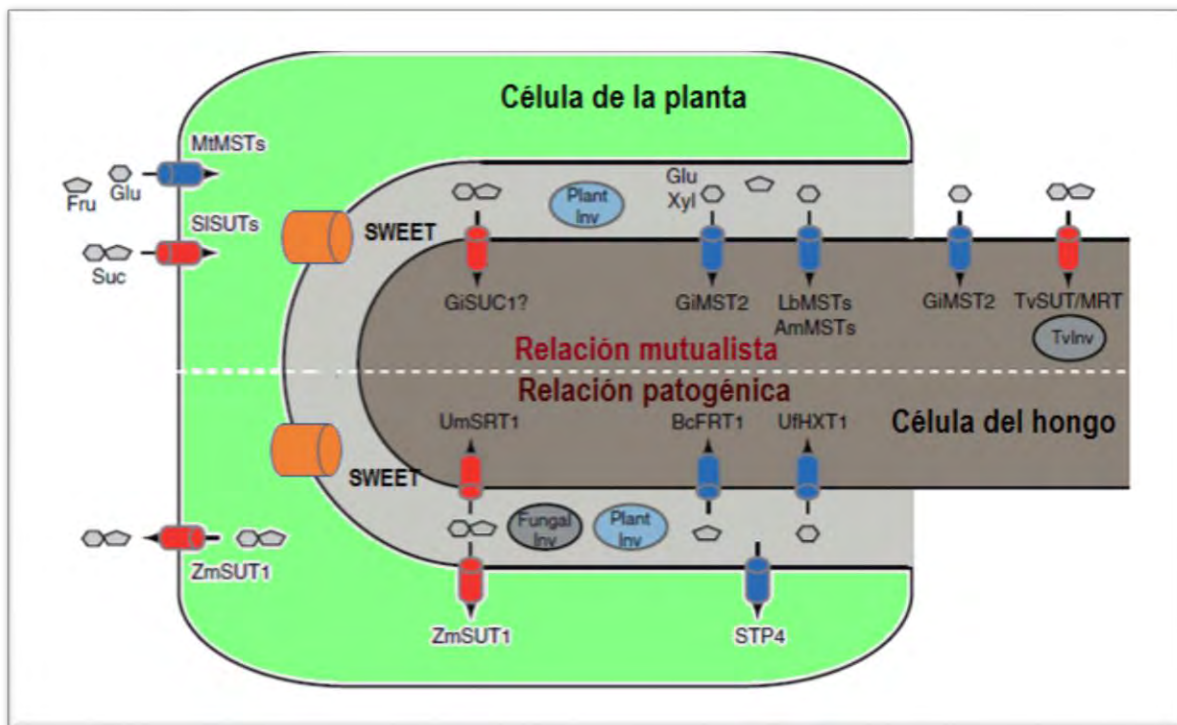


Figura 3. Reparto de azúcares durante las interacciones planta-hongo. Las plantas transportan azúcares tanto adentro como afuera de la célula dependiendo de las necesidades metabólicas y el tipo celular. Durante la interacción de la planta con microorganismos se ha encontrado que, tanto en el hongo como en la planta, hay un cambio en la expresión de los transportadores de azúcares. En cuanto al hongo se propone que hay una inducción de la expresión de sus transportadores para que puedan continuar su crecimiento. Mientras que en la

planta tiene que haber un balance entre cuanto entra y cuanto se dona puesto que de esto depende el desarrollo de la enfermedad o la sobrevivencia de la planta. Adaptado de Doidy et al., 2012.

h. El maíz y el transporte de carbohidratos.

El maíz (*Zea mays*) es uno de los principales cultivos en México y lo ha sido desde la antigüedad, siendo mencionado en varios códigos de culturas prehispánicas como alimento básico, además de darle otros atributos sociales, religiosos y económicos (De León y Rodríguez-Montessoro, 2010). En México, la diversidad del maíz comprende 59 razas² identificadas que están distribuidas en cuatro grupos de acuerdo con las características de la mazorca a lo largo del territorio nacional (Kato et al., 2009). Nutricionalmente, posee un gran valor, siendo una fuente importante de carbohidratos y también de proteínas debido a su alto consumo (FAO, 1993). Es empleado en la preparación de un sin número de platillos en la gastronomía mexicana, usando no solo el grano sino, las hojas y mazorca (CONABIO, 2018). Respecto a la producción nacional, tan solo en el 2017 se cosecharon 26,582,280 Ton de maíz de grano (SIAP, 2018). Dada su importancia, se han realizado varios estudios con la finalidad de desarrollar o implementar técnicas que mejoren su productividad.

Varios transportadores de azúcares han sido estudiados en maíz, buscando su participación en el desarrollo de la planta o bien teniendo como blanco el mejorar la productividad a través de incrementar el tamaño de la semilla. Así se ha encontrado que el simportador de sacarosa de la membrana plasmática, SUT1 es el que más se expresa en la planta de maíz y su ausencia lleva a una reducción importante en el crecimiento y desarrollo de la planta (Slewinski et al., 2010). En la semilla germinada, se encuentra principalmente en los escutelos, tejido de absorción de nutrientes y ruta de paso de los azúcares que van hacia el tejido que

² Raza. Grupo homogéneo, subespecífico, de individuos que poseen características externas definidas e identificables que permiten distinguirlos a simple vista, de otros grupos definidos de la misma manera en la misma especie (Turton, 1974)

se convierte en planta, el eje embrionario (Sánchez-Linares et al., 2012). Por su parte, ZmSUT2 es un transportador vacuolar de sacarosa que es importante para la demanda de carbono en la planta, zmsut2 es una planta con retardo en el desarrollo y en particular de los tejidos reproductivos, menor número de granos y acumula una gran cantidad de azúcares solubles y almidón en las hojas (Leach et al., 2017).

En 2015, Sosso y colaboradores caracterizaron un SWEET4c en maíz, es un transportador de hexosas localizado en la membrana plasmática y está involucrado en el proceso de llenado de la semilla, su presencia permite el almacenamiento de almidón en el endospermo. La coincidencia de la presencia de ese mismo SWEET en *O. sativa* sugiere que el eflujo de hexosas es importante y que es un rasgo que permanece a pesar de la variabilidad genética (Sosso et al., 2015). Mientras que, en las hojas del maíz, se ha encontrado que los miembros SWEET13a, b y c son abundantes en la vasculatura de las hojas e importantes para el llenado del floema (Bezruczyk et al., 2018).

IV. JUSTIFICACIÓN

Durante la colonización del maíz por *T. virens* se ha demostrado que se induce la síntesis de un transportador específico para sacarosa en el hongo, de manera simultánea a una invertasa intracelular, sugeriendo de que la sacarosa proviene de la planta y regula la asociación simbiótica *Trichoderma*-maíz (Vargas et al., 2009).

Incluso algunos patógenos presentan mecanismos relacionados con la toma de carbohidratos que aseguran su desarrollo en el hospedero ya que no evocan sus respuestas de defensa, tal es el caso de la proteína transportadora de sacarosa (Srt1) de *Ustilago maydis*, hongo patógeno biotrófico altamente adaptado a maíz, que posee una alta afinidad por sacarosa y permite el transporte directo del carbohidrato sin necesidad de la hidrólisis extracelular, evitando la formación de monosacáridos que induzcan la respuesta inmune (Wahl et al., 2010).

El eflujo de los azúcares de la planta durante su interacción con hongos como *Trichoderma* y *Ustilago* podría deberse al aumento en el número de transportadores de azúcares difusionales, los SWEETs. La modificación en la expresión de los SWEETs por microorganismos ha sido documentada en diferentes plantas, pero no en maíz (Chen et al., 2015b).

En nuestro grupo hemos explorado la expresión de los SWEET en raíces en presencia de *T. asperellum* y encontramos que dependiendo del estadio del desarrollo de la planta se inducen diferentes SWEETs (Palacios-Vargas, 2016), Sin embargo, son las hojas las que proporcionan el carbono a las raíces y también a los organismos que las colonizan. Con el objetivo de determinar si *Trichoderma* es capaz de modular la expresión de alguno de los SWEETs más abundantes en las hojas, en este trabajo se determinaron la expresión de los SWEETs de hojas durante la interacción del maíz con tres especies del género *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. virens* y *T. atroviride*,

V. HIPÓTESIS

En una interacción benéfica para la planta, el crecimiento de *Trichoderma* se favorecerá por la inducción de la expresión de los transportadores de azúcares tipo SWEET en las hojas lo que también impactará en el desarrollo de la planta.

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes especies del hongo *Trichoderma* en la expresión de los SWEETs en tejido aéreo de maíz.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de diferentes especies del hongo *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* en la fisiología de las plantas de maíz en dos distintos estadios del desarrollo.
2. Obtención el RNA de la parte aérea de las plantas que provienen de semillas con biopriming y de semillas control.
3. Analizar el efecto de los tres hongos del género *Trichoderma* en la expresión de los SWEETs de la parte aérea de la planta, SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental que se siguió para determinar el efecto de tres hongos del género *Trichoderma* en la expresión de SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 en la parte aérea de plantas de maíz con diferente edad se resume en la Figura 4.

El trabajo se dividió en 4 partes: 1) el cultivo y obtención de los conidios de las tres especies del género *Trichoderma*, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens*; 2) la obtención del material vegetal, parte aérea de plantas de 72 y 14 días de crecimiento. Para obtenerlas se sometieron las semillas de maíz a una suspensión de conidios de cada uno de los hongos, proceso de biopriming y posteriormente se germinaron por 72 h en agar, los lotes de plántulas se dividieron en dos, al primer lote se le cortó la parte aérea y el segundo lote se trasplantó en sustrato para que continuará su crecimiento por 11 días más, además de contar con los lotes de plantas crecidas en ausencia del hongo, lote control; 3) se obtuvo el RNA de todos los lotes y se produjo el cDNA, éste fue usado para la reacción de PCR punto final y detección del producto amplificado en un gel de agarosa y 4) el cDNA de las plántulas de 14 días se usó para determinar el efecto de los hongos en la expresión de los SWEETs mediante PCR punto final y tiempo real. A continuación, se describen con detalle las metodologías utilizadas.

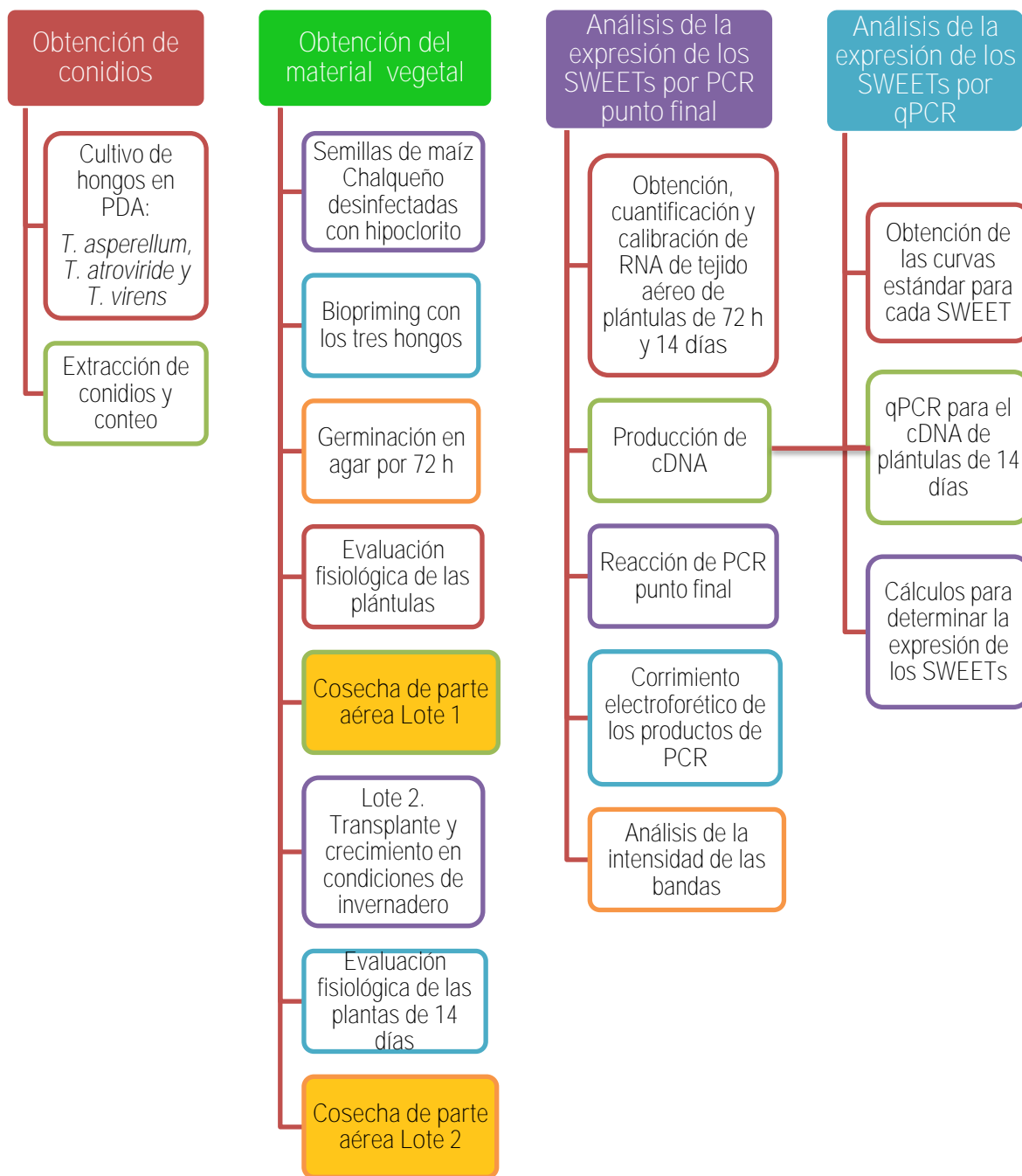


Figura 4. Esquema general de trabajo para el análisis de la influencia de *Trichoderma sp.* en la expresión de los SWEETs en hojas de maíz. Se tuvieron mínimo tres lotes y triplicados para cada determinación. La evaluación fisiológica consistió en la medición de la longitud y grosor de la parte aérea y determinación del contenido de clorofila.

a. Material Biológico

1. Extracción y determinación de la concentración de conidios de *Trichoderma spp.*

T. asperellum fue amablemente donado por el Dr. José Luis Hernández del Centro de Biotecnología Genómica en Reynosa, Tamaulipas. Mientras que *T. virens* y *T. atroviride* fueron comprados a la compañía Microbiologics y a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Cinvestav, respectivamente. La muestra de *T. virens* fue recibida liofilizada en un hisopo y la de *T. virens* en Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Para propagar a los hongos se realizó su inoculación en cajas Petri con medio PDA 1X, una vez transcurridas dos semanas de crecimiento a 29°C y en ausencia de luz se obtuvieron los conidios o se sembraron cuadros de agar con hongo de 0.5 cm X 0.5 cm en otras cajas con PDA 1X asegurando el mantenimiento de los hongos.

Para la obtención de los conidios se adicionaron de 7 mL de agua desionizada estéril al cultivo en placa y se agitaron de manera constante y oscilatoria por 30 min. Posteriormente, la suspensión se colectó en varios microtubos estériles y se centrifugó a 13000 rpm/15 min/ 4°C en una centrifuga UNIVERSAL 320R, el sobrenadante se desechó y las suspensiones fueron colectadas en un solo microtubo ajustando el volumen a 1.5 mL. Nuevamente, se centrifugó a 13000 rpm/ 15 min /4 °C y se desechó todo el sobrenadante. Por último, se resuspendió el botón en 1.0 mL de agua desionizada estéril y se realizó el conteo de conidios con cámara de Neubauer en un microscopio óptico OLYMPUS (Guzmán-Chávez, 2013). La solución concentrada o stock fue almacenada y etiquetada con la concentración obtenida.

b. Obtención del material vegetal

1. Desinfección de semillas de maíz. Lotes de 25 a 50 de semillas de maíz (*Zea mays* L. var. Chalqueño) fueron usados por cada tratamiento. Primero se les cortó el pedicelo a las semillas, después se lavaron con una solución comercial

de NaClO (2 % Cloralex) por 3 min. Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con 1 mL de agua estéril por semilla, hasta eliminar el olor a hipoclorito.

2. Biopriming, germinación y crecimiento de plántulas. Para realizar el biopriming de las semillas de maíz se siguió el protocolo de Guzmán-Chávez, 2013 y López-Coria *et al.*, 2016 con algunas modificaciones. Se colocaron en matraces Erlenmeyer las semillas desinfectadas, en total fueron 4 lotes de semillas: control, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* y a cada matraz se le colocó una barra magnética (Tabla 1). Al lote de semillas control se le adicionó 1 mL de agua desionizada estéril por semilla, a los otros lotes se les sometió al tratamiento de biopriming adicionándoles 1 mL de inóculo que contenía 1×10^3 conidios/mL de *T. asperellum*, *T. atroviride* o *T. virens*. Todos los lotes se sometieron a agitación constante por 1.5 h. Después las semillas fueron colocadas con ayuda de pinzas sobre 1 % agar que se encontraba en recipientes de plástico de 13.5 x 1.5 x 6.5 cm. Las semillas se incubaron a 29°C en oscuridad por 72 h en una incubadora LABNET 211 DS. Un sub-lote de semillas germinadas de cada tratamiento se trasplantó en macetas de 5 pulgadas que contenían 100 g de sustrato Sunshine mix 3 previamente humedecido y se mantuvieron por dos semanas en condiciones de invernadero con fotoperiodo natural. Las plantas fueron regadas cada tercer día. Tanto los lotes de plántulas de 72 h como los lotes de plantas con 14 días de crecimiento fueron usados para determinar algunos parámetros fisiológicos y posteriormente se les cortó toda la parte aérea para extraer el RNA y con éste determinar el efecto de los hongos sobre la expresión de seis SWEETs que se expresan en la parte aérea de las plantas. El experimento se realizó en tres réplicas por cada lote.

Tabla 1. Lotes de plantas usados en el trabajo.

Tratamiento	Lote 72 h	Lote 14 días
Sin biopriming	Control 72 h	Control 14 días
Biopriming <i>T. asperellum</i>	Ta 72 h	Ta 14 días
Biopriming <i>T. atroviride</i>	Tat 72 h	Tat 14 días
Biopriming <i>T. virens</i>	Tv 72 h	Tv 14 días

c. Efecto fisiológico de los hongos del género *Trichoderma* sobre las plantas de maíz.

Con una cinta métrica, se midió la longitud de la radícula y coleóptilo de plántulas de 72 h de germinación. A las plantas de 14 días de crecimiento se les midió la longitud de la parte aérea y el grosor del tallo, empleando un vernier. Además, a la tercera hoja de éstas plantas se les determinó el contenido de clorofila mediante un medidor de clorofila MINOLTA SPAD-502, las unidades en que se reporta son llamadas SPAD, las cuales son un índice relativo de clorofila obtenido de la medición de la transmitancia en la hoja a dos longitudes de onda, en el rojo a 650 nm e infrarrojo a 940 nm (Ling et al., 2011).

d. Determinación de la expresión de los SWEET en la parte aérea de las plantas de maíz mediante PCR punto final y qPCR.

- 1. Extracción de RNA.** Se congeló la parte aérea de las plantas con N₂ líquido y se pulverizó el tejido con ayuda de un mortero y pistilo, ambos libres de RNAsas, hasta obtener un polvo fino. El protocolo de extracción que se siguió es el de Carvente-García, 2014 empleando Trizol. El RNA obtenido se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000. La calidad y calibración del RNA se evaluó mediante su separación electroforética en gel de agarosa al 1 % adicionado de bromuro de etidio al 0.1 %, estableciendo un potencial eléctrico de 75 mV, usando TAE 1X como amortiguador de corrida.
- 2. Obtención de cDNA.** Se llevó a cabo la reacción de RT-PCR con 1 µg de RNA en un termociclador MaxiGen II Axygen, para ello en un microtubo se mezcló el volumen correspondiente a 1 µg de RNA, 1 µL de 20 µM OligodT y se llevó a un volumen de 10 µL con agua libre de nucleasas (mezcla A, Tabla 2). Después, se calentó a 70 °C / 5 min y se mantuvo en baño de hielo por 5 min.

Luego se adicionaron 10 μ L de la Mezcla de reacción B (Tabla 2) y se introdujo al termociclador. Se realizó la reacción de PCR al correr el programa de calentamiento: 25 °C por 5 min 42 °C por 1 h y 70 °C por 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2. Reactivos usados para la reacción de RT-PCR.

Mezcla	Reactivo	Volumen (μ L)
A	RNA (1 μ g)	Varía dependiendo de la muestra
	OligodT (20 μ M)	1.0
	Agua libre de nucleasas	c.b.p. 10
B	Buffer ImProm-II 5X	4.0
	MgCl ₂ 25mM	2.4
	dNTP's 10mM	1.0
	Agua libre de nucleasas	1.6
	RT (Transcriptasa reversa)	1.0
Volumen total		20

- 3. Reacción de PCR punto final.** Para la reacción de PCR punto final se empleó el cDNA de todos los tratamientos a los dos tiempos de crecimiento de las plantas, además de los oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente a los SWEET de hoja 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 (Tabla 3). Los componentes de la mezcla de reacción para el PCR se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar los transcritos de SWEETs de hoja. Diseñados y probados por Delgado-Rubio, 2017.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido (5'-3')	Tamaño de producto de amplificación (pb)
ZmSWEET1b	Sentido	TCCATATAAGCGCAAGCAGACA	151
	Anti-sentido	CAGAACGTAGGCACTGGGG	
ZmSWEET4a	Sentido	CAGCGTCGTCCTACCCATAT	177
	Anti-sentido	CTTCCAGATGCGGATGAACG	
ZmSWEET13a	Sentido	CGTGGAGTACATGCCCTTCT	151
	Anti-sentido	CACGTAGAGCACCATCTGGA	
ZmSWEET13b	Sentido	ACAAATACGTCGCGCTACCA	361
	Anti-sentido	GCTTGCTTGCGATGATGGAG	
ZmSWEET15a	Sentido	CCCTGGCCTCTTCTTCGTTC	107
	Anti-sentido	CCTCGCTTACAGCCCTTCTC	
ZmSWEET17	Sentido	TCATGCCGTTCTTCCTATCC	195
	Anti-sentido	GAGGCGACGCTATTTCTTTG	

Tabla 4. Reactivos empleados para reacción PCR punto final.

Reactivo	SWEET					
	1b	4a	13a	13b	15a	17
PCR Master Mix 2X, Promega (μL)	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Oligonucleótido Sentido 20 μM (μL)	0.5	0.5	0.5	0.25	1.0	0.5
Oligonucleótido Anti-sentido 20 μM (μL)	0.5	0.5	0.5	0.25	1.0	0.5
cDNA (μL)	2.0	2.0	2.0	2.0	1.5	2.0
Agua libre de nucleasas c.b.p. 25 μL (μL)	9.5	9.5	9.5	10.0	9.0	9.5

La reacción se llevó a cabo en un termociclador empleando las condiciones descritas en la Tabla 5. Al término de la reacción se mezclaron 4 μL de la reacción

de PCR con 2 μ L de amortiguador de carga Blue/Orange 6X, el marcador de peso molecular fue de 100 pb Promega. Se separaron las bandas en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio al 0.1 %. Se determinó la intensidad de la banda del producto esperado mediante la digitalización en ChemiDoc XRS+ System Bio-Rad.

Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR punto final.

Predesnaturalización	Amplificación PCR	Número de ciclos para la amplificación	Extensión final
94 °C / 5 min	Desnaturalización 94 °C / 40 s Alineamiento 57 °C / 60 s Extensión 72 °C / 40 s	38	72 °C / 7 min

Con los valores densitométricos obtenidos se analizó la expresión de los transcritos calculando un índice entre la expresión del gen de interés entre un gen endógeno. En este caso se emplearon las secuencias del gen de la subunidad ribosomal 18S y el gen de Actina de maíz (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar los transcritos de los genes endógenos. Los oligonucleótidos para amplificar 18S fueron tomados de Manoli et al., 2012.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido (5'-3')	Tamaño de producto de amplificación (pb)
18S	Sentido	CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT	151
	Anti-sentido	CCTGTTCGGCCAAGGCTATATAC	
ZmActina	Sentido	ATGGCATTGTCAACAACCTG	355
	Anti-sentido	CTCACCGACCACCTAATGAA	

4. Reacción de PCR tiempo real. Para la amplificación de los transcritos mediante PCR tiempo real, se realizó la construcción de curvas de calibración de cada uno de los SWEETs, ZmSWEET 1b, 4a, 13a, 13b y 17. La curva de calibración para cada SWEET incluía el valor de fluorescencia del producto amplificado empleando diluciones en serie de cDNA (1:10, 1:100, 1:1000, 1:1000). El diseño de las placas y el análisis de las muestras se realizó en el programa 7500 Software v2.0.6 de la compañía Applied Biosystems, en un medio de reacción que contenía lo que se presenta en la Tabla 7 en un volumen final de 20 μ L por pozo (Tabla 7).

Tabla 7. Reactivos usados para la reacción de RT-qPCR.

Reactivo	Volumen (μL)
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5.0
Oligonucleótido Sentido (20 μ M)	0.15
Oligonucleótido Antisentido (20 μ M)	0.15
cDNA	2.0
Agua libre de DNAsas (c.b.p. 20 μ L)	12.7
Volumen total	20

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los transcritos se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar por qPCR los transcritos de SWEETs de hoja.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia de oligonucleótido (5' 3')	Tamaño de producto de amplificación (pb)
ZmSWEET1b	Sentido	GACCTGTGCCTGTCCAATTT	151
	Anti-sentido	ACTGGGGAAAGGAAGAGGAA	
ZmSWEET4a	Sentido	CAGCGTCGTCCTACCCATAT	177
	Anti-sentido	CTTCCAGATGCGGATGAACG	
ZmSWEET13a	Sentido	CGTGGAGTACATGCCCTTCT	151
	Anti-sentido	CACGTAGAGCACCATCTGGA	
ZmSWEET13b	Sentido	ACAAATACGTCGCGCTACCA	361
	Anti-sentido	GCTTGCTTGCGATGATGGAG	
ZmSWEET17	Sentido	TCATGCCGTTCTTCCTATCC	195
	Anti-sentido	GAGGCGACGCTATTTCTTTG	
18S	Sentido	CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT	151
	Anti-sentido	CCTGTCCGCCAAGGCTATATAC	

Para la cuantificación relativa de la expresión de los transcritos amplificados se utilizó el método de Pflaff, empleado anteriormente por Palacios-Vargas (2016), mediante la comparación de la expresión relativa contra un gen endógeno, en este caso el de la subunidad ribosomal 18S.

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

Dónde:

E muestra= Eficiencia de la muestra.

E referencia= Eficiencia del gen de referencia.

CP= Valor de Ct de gen control – Valor de Ct de gen de muestra.

CP referencia= Valor de Ct de gen control – Valor de Ct de gen de muestra.

Las eficiencias tanto de la muestra como del gen de referencia se obtienen a partir de la construcción de las curvas de Ct, cuyo valor es el número de ciclos en el cuál la fluorescencia alcanza el umbral establecido, en función el logaritmo base diez de la concentración del cDNA. La eficiencia se calcula con la siguiente fórmula empleando una pendiente cercana a -3.32, lo que equivale a una eficiencia de amplificación del 100 %:

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

Dónde:

m= Pendiente de la curva Ct vs Log de la Concentración de cDNA.

Estadísticamente se realizó una prueba T-student para dos poblaciones con p= 0.05 empleando el programa Microcal Origin 6.0 para corroborar si existía una diferencia significativa entre tratamientos de las mediciones fisiológicas, como en los niveles de expresión obtenidas por RT-PCR y RT-qPCR de cada SWEET.

IX. RESULTADOS

a. Comparación del crecimiento de los hongos *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. virens*.

Las tres cepas de *Trichoderma* fueron cultivadas en agar PDA 1X y en oscuridad a temperatura ambiente. Las cepas permanecieron por 14 días en esas condiciones hasta observar un crecimiento similar al de la Figura 5, momento en el cual se realizó la extracción de conidios de cada hongo.

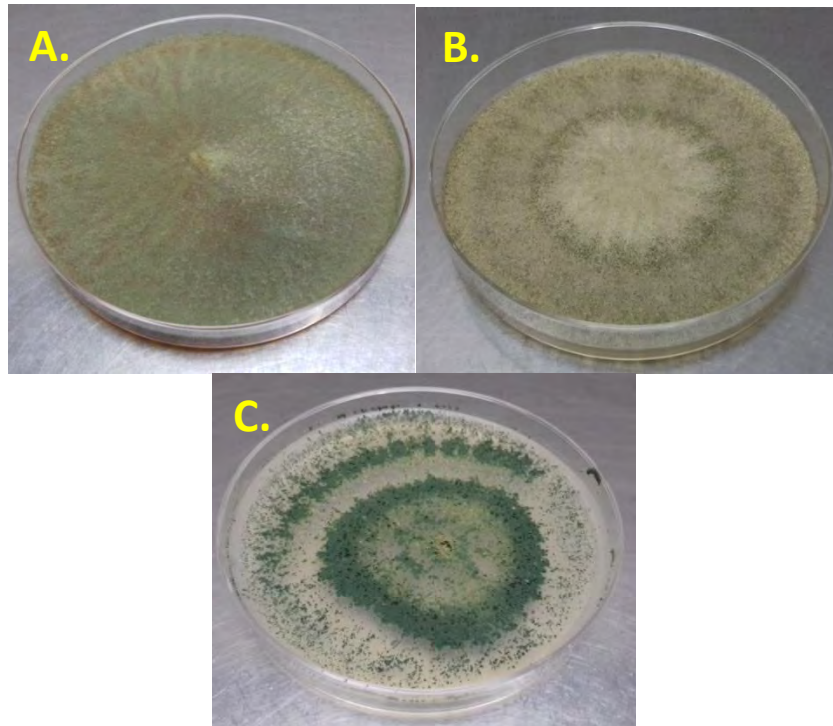


Figura 5. Cepas de *Trichoderma* en placas de agar PDA 1X a 14 días de desarrollo. Los cultivos corresponden a A. *T. virens*, B. *T. atroviride* y C. *T. asperellum*.

Durante el desarrollo en placa se observó que el tiempo de crecimiento de cada cepa era diferente, por lo que adicionalmente se desarrolló un cultivo triple para compararlos en una misma placa (Anexo1). *T. asperellum* presentó la mayor velocidad de crecimiento y *T. atroviride* tuvo el menor crecimiento en comparación con las otras cepas. Adicionalmente, los tres hongos produjeron distinto tono de pigmento verde, lo cual indica que están produciendo diferentes metabolitos secundarios (Figura 5).

b. Efecto del biopriming con los hongos *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. virens* en la fisiología de las plantas de 72 h de crecimiento.

Para determinar el efecto de las diferentes especies de *Trichoderma* sobre el desarrollo de la planta y los transportadores SWEET se realizó el biopriming de las semillas de maíz Chalqueño. Se observó micelio en la superficie del grano y en la radícula de las semillas a las 72 h de crecimiento (Figura 6).

La observación al microscopio óptico de las raíces permitió encontrar diferencias en el desarrollo de la radícula de cada tratamiento (Figura 7). En específico la cantidad de pelos radiculares y la aparición de raíces secundarias, siendo mayor en la inoculación con *T. atroviride*.

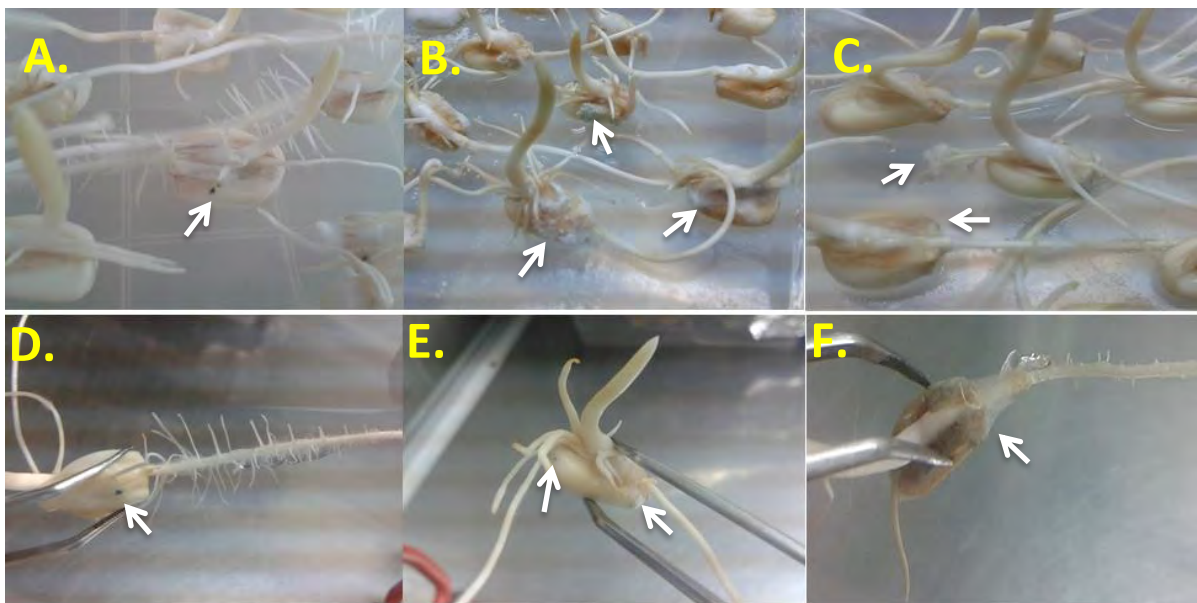


Figura 6. Plántulas de 72 h de crecimiento mostrando el desarrollo del micelio de *Trichoderma*. Plántulas de 72 h de crecimiento en agar al 1% (A, B y C) y un acercamiento (D, E y F). A y D. en tratamiento con *T. atroviride*; B y E con *T. asperellum*; C y F con *T. virens*. Las flechas blancas muestran desarrollo de *Trichoderma*.

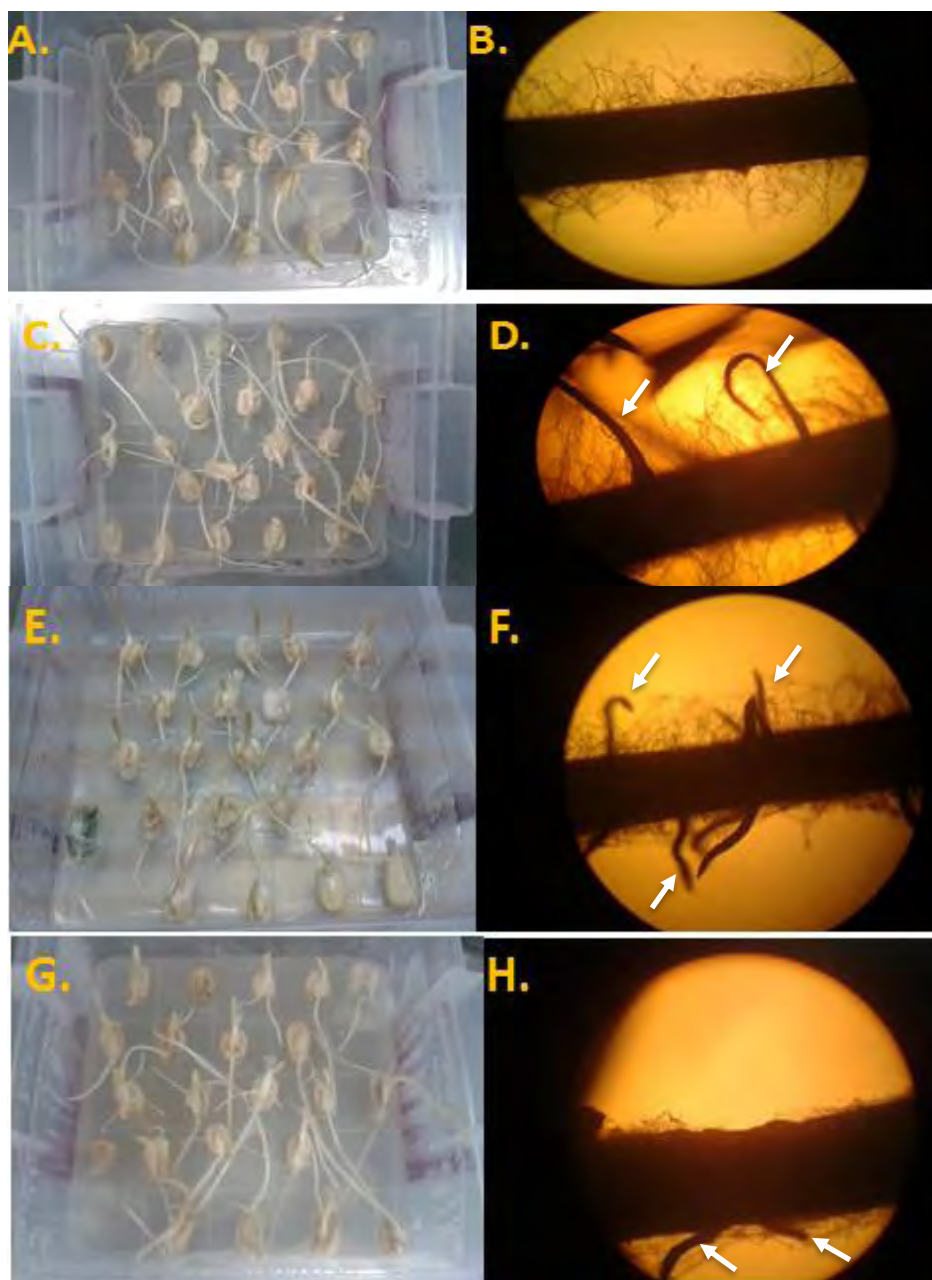


Figura 7. Plántulas de 72 h de crecimiento provenientes de semillas de maíz Chalqueño tratadas con hongos del género *Trichoderma*. Lote de plántulas de 72 h en agar 1% (A, C, E y G) y visualización de una raíz por microscopía óptica de luz con el objetivo 40X (B, D, F y H). A y B plántulas control; C y D plántulas tratadas con *T. atroviride*; E y F con *T. asperellum*; G y H con *T. virens*. Con flechas blancas se señalan las raíces secundarias.

Se encontró un incremento significativo en la longitud de la radícula con los tratamientos con *T. atroviride* y *T. asperellum* respecto al control, mientras que la longitud de la parte aérea sí fue mayor en las plantas tratadas con los tres hongos (Figura 8). *T. virens* produjo el mayor incremento en el coleóptilo mientras que *T. atroviride* en la radícula.

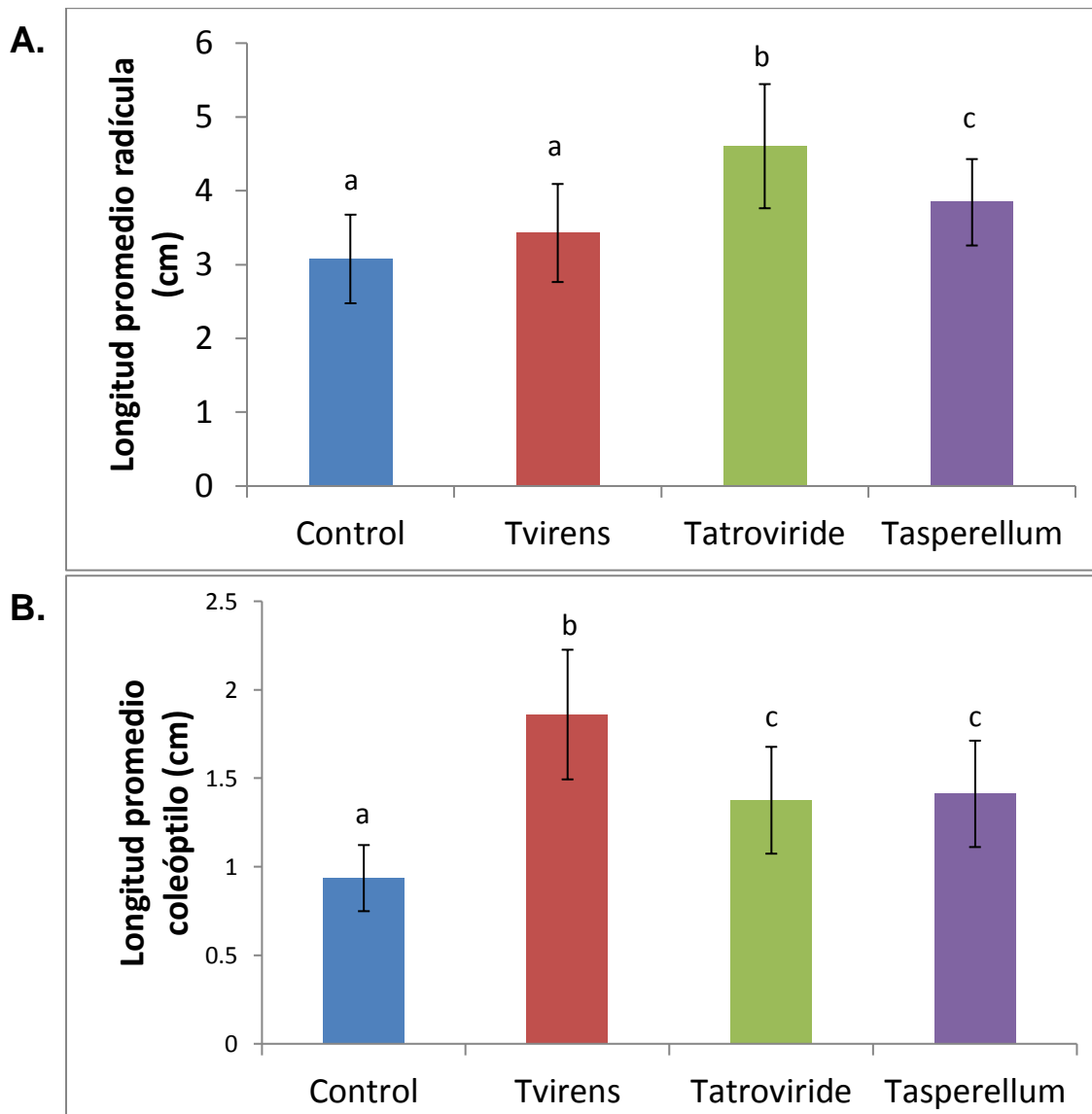


Figura 8. Efecto de los hongos del género *Trichoderma* en la longitud de la radícula (A) y del coleóptilo (B) de plántulas de 72 h de crecimiento. El experimento se realizó con 25 plantas por réplica (n=25). Las letras diferentes

sobre la barra de desviación estándar representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student, $p=0.05$.

c. Efecto del biopriming con los hongos del género *Trichoderma* en la expresión de los SWEETs de la parte aérea de plantas de maíz de 72 h de crecimiento.

Debido a que se observó un aumento en el crecimiento de la parte aérea de las plantas de 72 h tratadas con el hongo, era posible que el reparto de carbono a través de los SWEETs estuviera modificado. Para determinar si la expresión de los SWEETs cambiaba con el tratamiento de biopriming de las semillas, se realizó la extracción del RNA mediante el método de trizol de la parte aérea de las plantas.

Previo a la reacción de PCR se verificó la integridad de las muestras de RNA mediante el análisis de las bandas de los RNA ribosomales, resuelto por electroforesis en un gel de agarosa. Se observaron que las dos bandas de las subunidades ribosomales 18S y 28S estaban compactas, lo que indica que el RNA no se encontraba degradado (Figura 9). Así que el RNA fue usado para la transcripción a DNA complementario (cDNA) mediante la enzima Transcriptasa reversa (RT), para emplearlo posteriormente en la reacción de PCR.

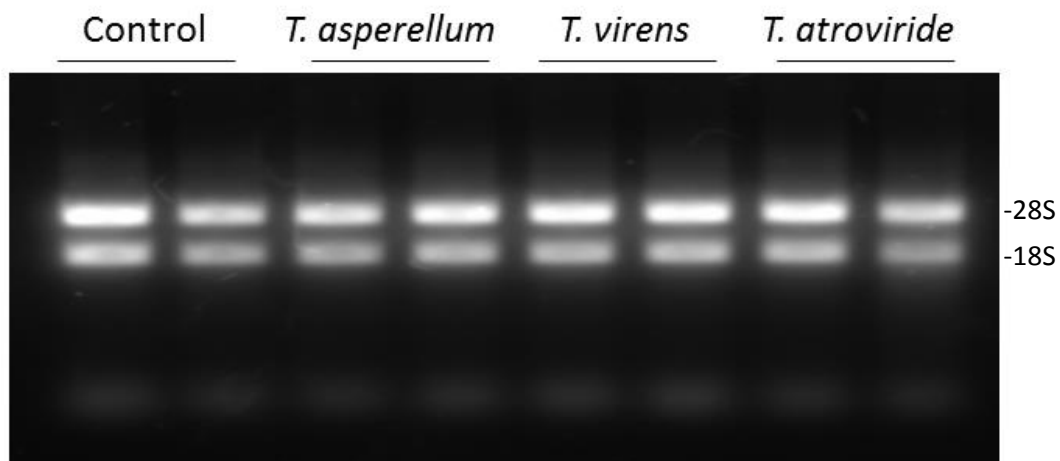


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA extraído del tejido aéreo de plántulas de 72 h tratado con los hongos del género *Trichoderma*. En el gel se muestran los RNA por duplicado para cada tratamiento.

Se realizó la reacción de PCR punto final y los productos de amplificación para los ZmSWEETs de hoja 1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 del tejido aéreo de las plantas de cada tratamiento se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2 %. Las bandas de cada ZmSWEET para cada tratamiento que aparecen en la Figura 10 y el de otras dos muestras que no se presentan, fueron digitalizados y analizados por densitometría en el equipo en ChemiDoc XRS+ System Bio-Rad. La intensidad de las bandas al estar relacionada con la expresión de los transcritos fue normalizada con un gen endógeno, el de actina de maíz (*ZmACT*) construyendo un gráfico del nivel de expresión relativa de cada ZmSWEET (Figura 11).

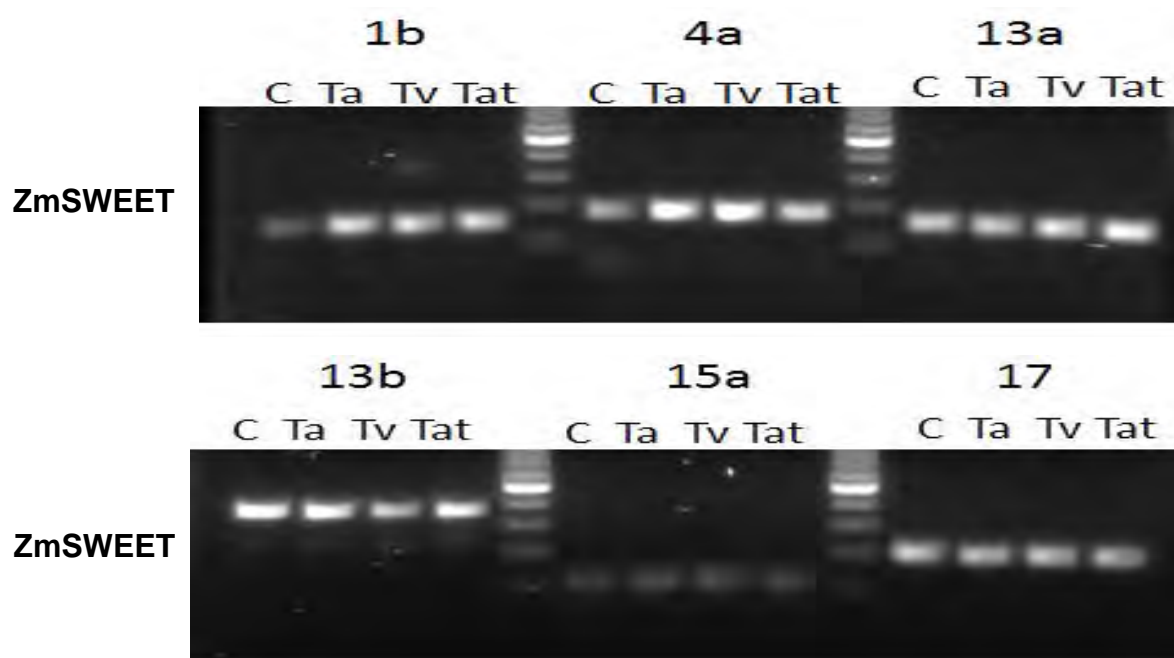


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por RT-PCR de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 en tejido aéreo de plántulas de 72 h de germinación. Las bandas de izquierda a derecha corresponden C Control, Ta *T. asperellum*, Tv *T. virens* y Tat *T. atroviride*.

Se observó que no hay una diferencia significativa entre la expresión de cada SWEET y los tratamientos (Figura 10 y 11). Hay una ligera reducción en la

expresión de SWEET15 y un aumento en SWEET4a, aunque debido a las grandes variaciones en las desviaciones estándar no es posible determinar si efectivamente es un cambio.

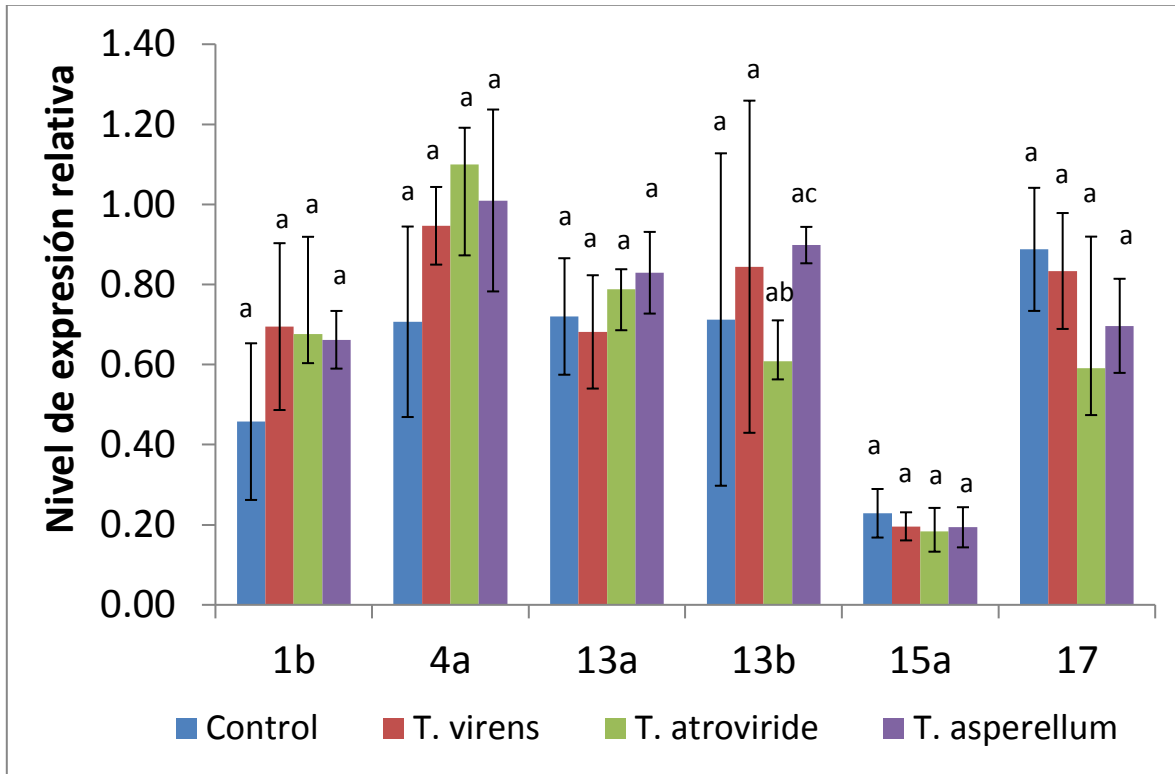


Figura 11. Perfil de expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plántulas de 72 h por PCR punto final. Se realizó el análisis por densitometría de las bandas de amplificación obtenidas de tres réplicas biológicas (n=3), usando como control el gen de actina de *Zea mays*. Las letras diferentes sobre la barra de desviación estándar representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student, p=0.05.

d. Efecto del biopriming con los hongos *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. virens* en la fisiología de las plantas de 14 días de crecimiento.

En vista de que no se encontraron cambios en la expresión de los SWEETs a tiempos tempranos del desarrollo de la planta, entonces se dejaron crecer por más tiempo las plantas, para así tener un comparativo de la expresión de los SWEETs

de hoja y la respuesta que tienen a *Trichoderma*, así como los cambios fisiológicos en la planta a dos diferentes estadios del desarrollo. Cada ensayo fue realizado por triplicado en diferentes lotes de plántulas sometidas a las mismas condiciones.

El desarrollo de las plantas fue documentado fotográficamente a los 14 días post infección (dpi), en condiciones de invernadero hasta el corte de la parte aérea (Figura 12). A simple vista no se observaron cambios morfológicos en las plantas.

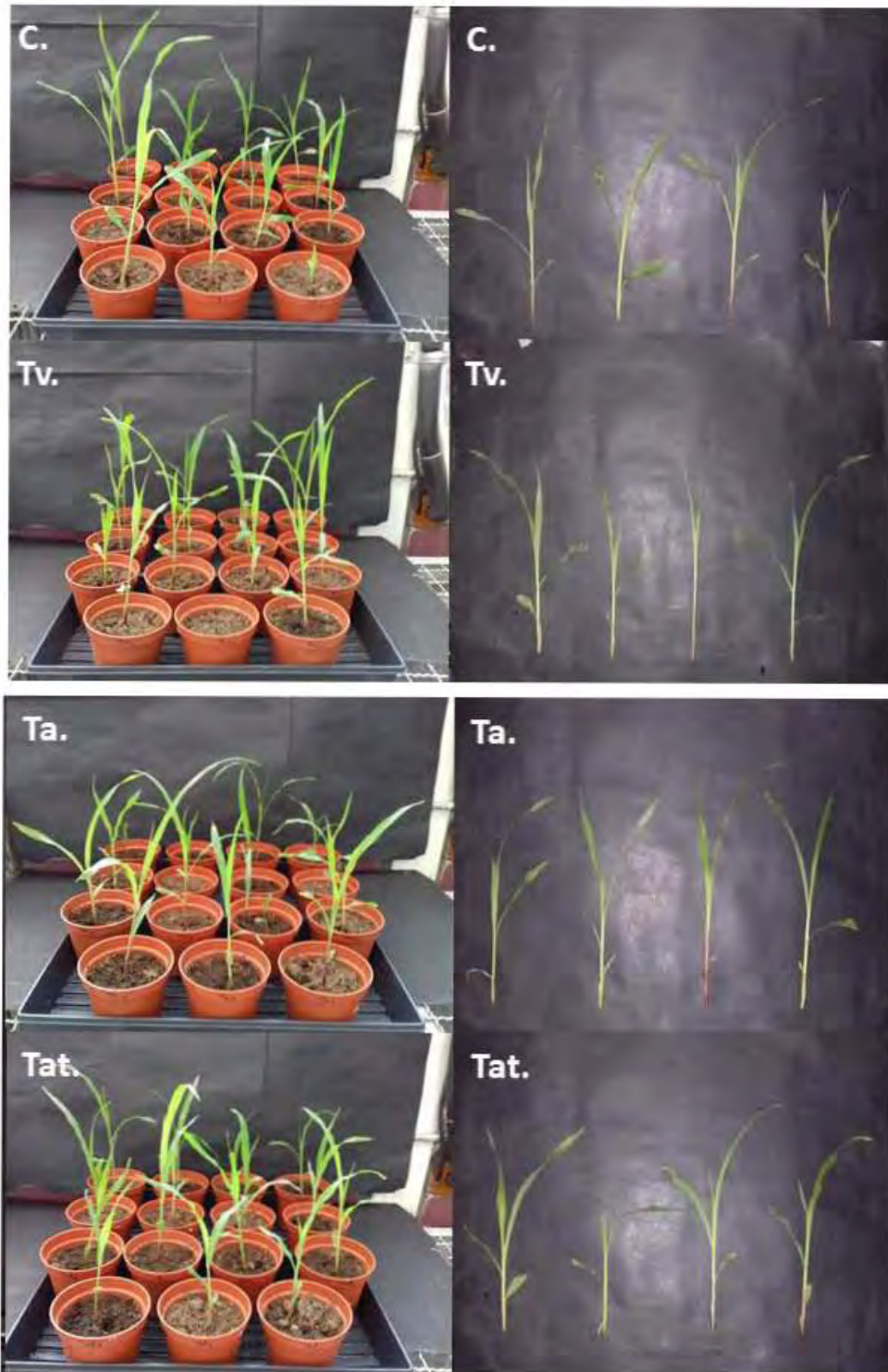


Figura 12. Aspecto de las plantas de 14 días con el tratamiento con los hongos del género *Trichoderma* y acercamiento al tejido aéreo. C Control, Ta *T. asperellum*, Tv *T. virens* y Tat *T. atroviride*. Se sembraron 15 semillas por lote,

en tres réplicas biológicas. Las plantas fueron crecidas en condiciones de invernadero con fotoperiodo natural.

Se comparó el efecto de los tres hongos del género *Trichoderma* sobre el crecimiento y contenido de clorofila de las plantas de maíz (Figura 13A). El contenido de clorofila promedio en todos los casos fue constante respecto al control, indicando la ausencia de daño por clorosis provocada por la presencia del *Trichoderma*. Lo anterior era esperado, ya que los hongos de este género no producen enfermedad en las plantas.

Al comparar el grosor del tallo (Figura 13B) y la altura de la planta (Figura 13C) considerando desde el nódulo hasta la punta de la primera hoja, se observó disminución en ambas medidas en los lotes de plantas que fueron tratadas con *Trichoderma*, independientemente de la especie de hongo, con la mayor reducción en el tratamiento con *T. asperellum*, decremento del grosor del tallo y la altura de la planta del 17.14 % y 21.98 %, respectivamente. Resultado opuesto al encontrado en las plantas de 72 h de crecimiento, en donde las plantas fueron más largas (Figuras 7 y 8). A pesar de ser un resultado opuesto al esperado, indagamos si los SWEET habían visto afectados en su expresión.

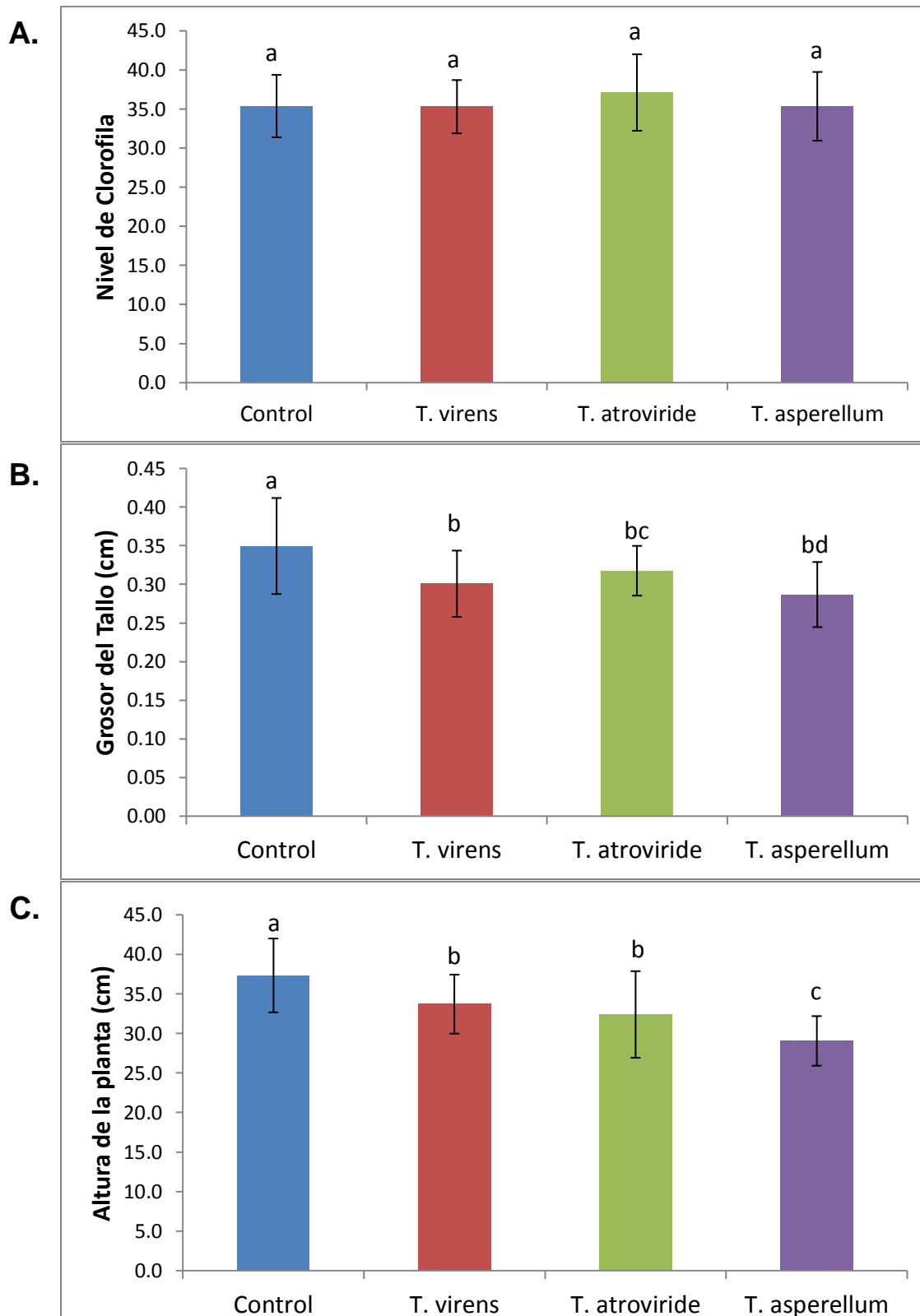


Figura 13. Contenido de clorofila (A), grosor del tallo (B) y altura (C) de plantas con 14 días del biopriming con *Trichoderma*. n=25. Las letras

diferentes sobre la barra de desviación estándar representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student, $p=0.05$.

e. Efecto del biopriming con los hongos del género *Trichoderma* en la expresión de los SWEETs de la parte aérea de plantas de 14 días de crecimiento.

El RNA fue extraído de la parte aérea de las plantas de 14 días de cada tratamiento y separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 1 %. Se observaron bandas definidas de los ribosomales que denotan la integridad del RNA (Figura 14), por lo que se prosiguió con el protocolo de obtención de cDNA y posteriormente la reacción de RT-PCR.

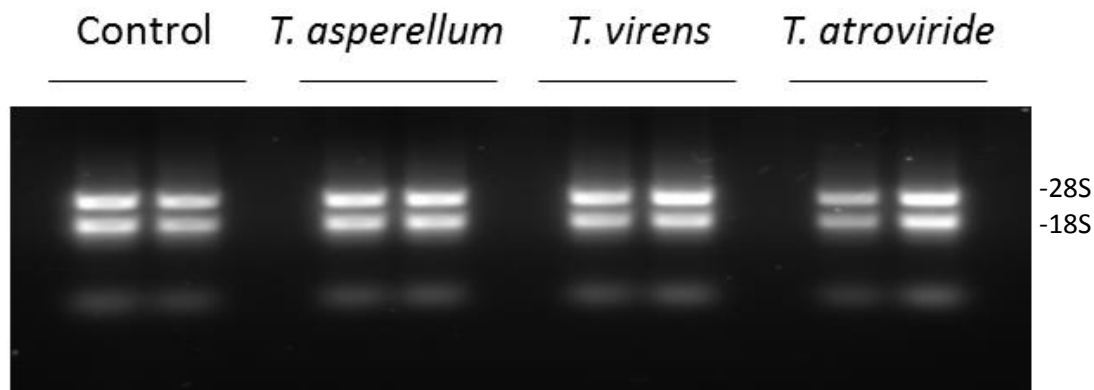


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del RNA extraído del tejido aéreo de plantas de 14 días de crecimiento. En el gel se muestran los RNA por duplicado.

Para estudiar los cambios en la expresión de los ZmSWEETs, el material amplificado de cada tratamiento se corrió electroforéticamente en geles de agarosa al 2 % y se cuantificó por densitometría para observar la expresión de los transcritos (Figura 15). Los valores obtenidos se normalizaron contra un gen endógeno que en este caso fue el *18S* de *Zea mays* y se construyó la gráfica que

muestra el nivel de expresión relativa de cada ZmSWEET por cada tratamiento (Figura 16).

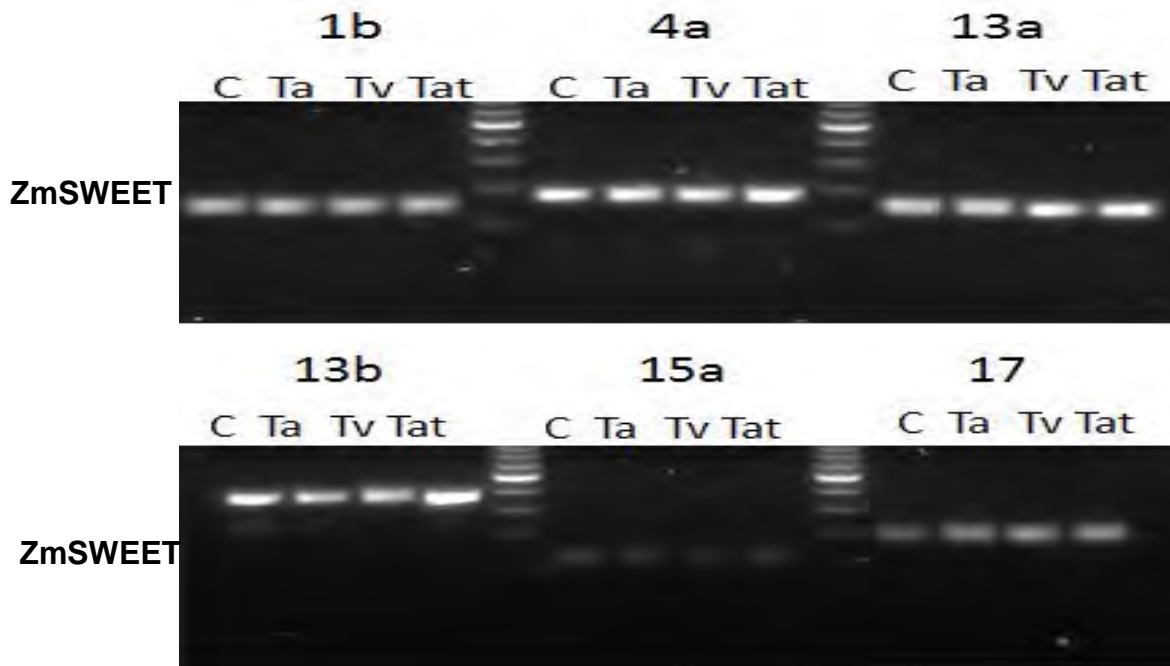


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación por RT-PCR de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15 y 17 en tejido aéreo de plantas de 14 días de crecimiento. Las bandas de izquierda a derecha corresponden C Control, Ta *T. asperellum*, Tv *T. virens* y Tat *T. atroviride*.

Nuevamente no se observaron diferencias significativas en la expresión de los SWEETs examinados entre los tratamientos con las tres especies de *Trichoderma* comparadas con el control (Figura 16), lo anterior debido a las variaciones grandes que se tienen en la desviación estándar. Lo que sí se observó es que el SWEET15 es el que tiene la menor expresión en las hojas. Este resultado ya lo había observado Delgado-Rubio (2017) y no se debe a un diseño inadecuado de los oligonucleótidos ya que se diseñaron varios y se probaron diferentes concentraciones de cDNA, de oligonucleótidos, número de ciclos y temperatura de alineamiento. Por lo que este SWEET se expresa en niveles bajos en hojas de plantas de maíz.

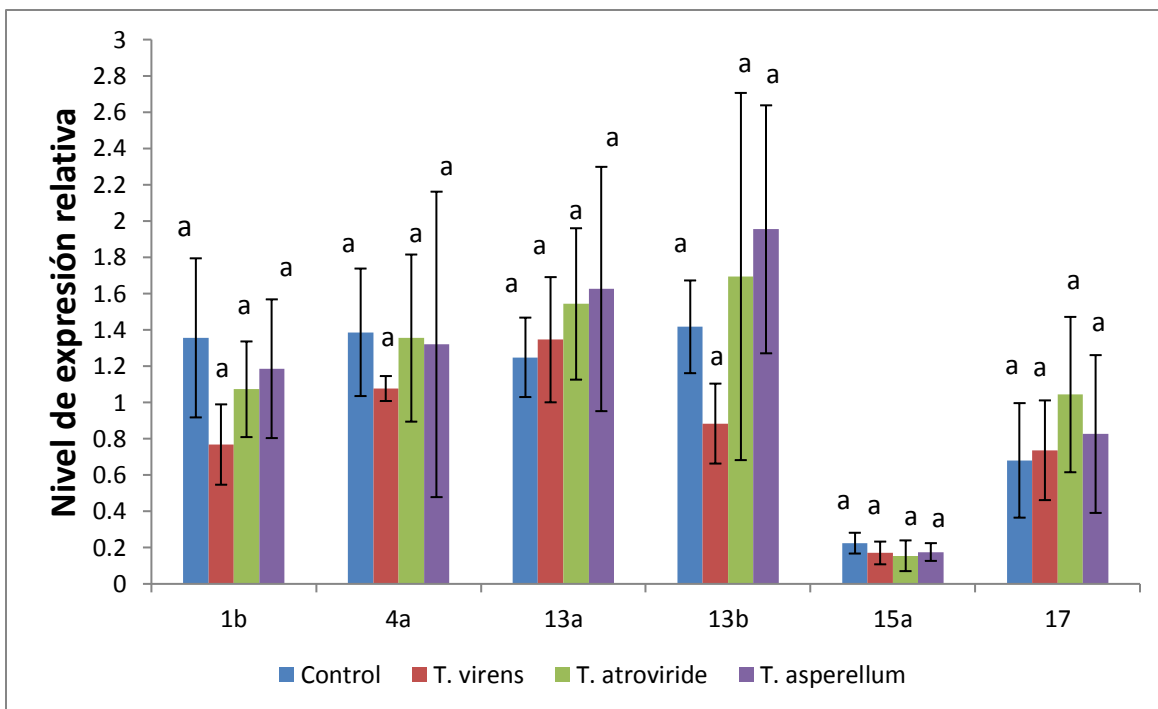


Figura 16. Perfil de expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plántulas de 14 días por PCR punto final. Se realizó el análisis por densitometría de las bandas de amplificación obtenidas de tres réplicas biológicas (n=3), usando como control el gen 18S de *Zea mays*. Las letras diferentes sobre la barra de desviación estándar para cada SWEET representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student, p=0.05, realizada de forma independiente por cada SWEET.

Debido a que ni a los 3 ni a los 14 días de crecimiento se observaron diferencias claras en la expresión de los SWEET se analizó la expresión de los SWEETs de la parte aérea de las plantas a los 14 días por qPCR. La reacción de transcripción únicamente se llevó a cabo con los SWEET1b, 4a, 13a, 13b y 17, ya que mostraron los mayores cambios en los experimentos previos. Para los cálculos se empleó el método de Pfaffl anteriormente descrito usando el gen 18S de *Zea mays* como endógeno (Figura 17).

Solamente el biopriming con *T. virens* provocó un aumento en la expresión de los SWEETs respecto al control, ZmSWEETs 13a, 13b y 17, siendo significativo en los dos últimos. Mientras que *T. asperellum* redujo significativamente la expresión de todos los SWEETs analizados y *T. atroviride* modifica significativamente la expresión de los SWEETs 4a y 13b, reduciéndola. Adicionalmente, el transportador SUT1 que es el que más se expresa en el maíz, reduce su expresión en las tres cepas lo que puede sugerir una reducción en la acumulación de sacarosa en el floema y por tanto un reparto de carbono reducido, lo que explicaría la reducción en el crecimiento de las plantas. Aunque niveles altos de los transcritos para ZmSWEET13a y 13b ocasionados por *T. virens* sugieren una disminución en el eflujo de sacarosa, lo que contribuiría a un mayor contenido de sacarosa en el floema.

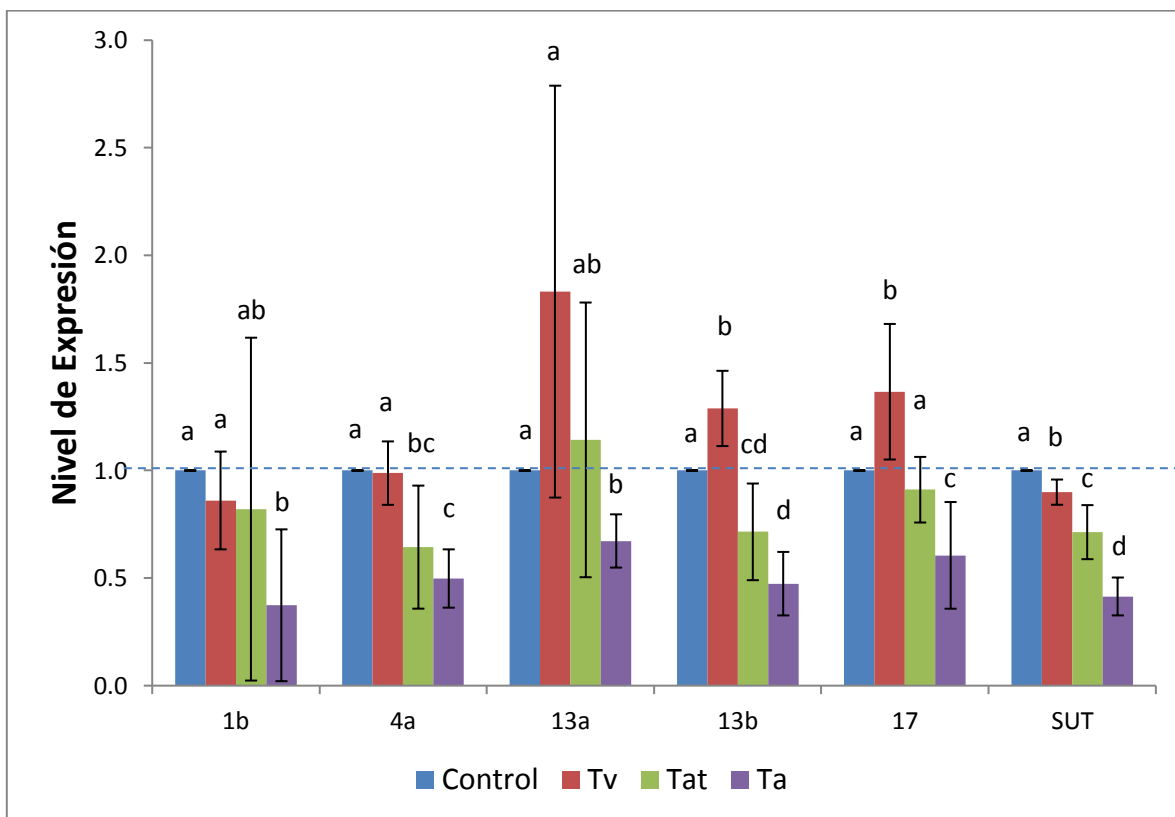


Figura 17. Análisis de la expresión de ZmSWEETs en tejido aéreo de plantas de 14 días por qPCR. El experimento se realizó con seis réplicas biológicas (n=6) y se usó como gen endógeno el 18S de *Zea mays*. Las letras diferentes sobre la

barra de desviación estándar para cada SWEET representan diferencias significativas de acuerdo con la prueba T-student, $p=0.05$, realizada de forma independiente por cada SWEET.

X. DISCUSIÓN

a. Efectos fisiológicos inducidos por *Trichoderma*

Trichoderma establece una relación simbiótica en las plantas y al hacerlo secreta metabolitos y proteínas que le ayudan a establecer la interacción y colonizar las raíces. Adicionalmente, los exudados del hongo favorecen su crecimiento y el de la planta y reduce la presencia de hongos patogénicos (Woo et al., 2006; Contreras-Cornejo et al. 2013; Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria et al., 2016).

Los cambios en la arquitectura radicular inducidos por las tres especies de *Trichoderma* sobre todo a tiempos cortos de crecimiento (72 h) sugieren que cada uno de los hongos libera diferentes tipos y cantidad de metabolitos secundarios y que además pueden hacerlo a tiempos distintos, para propiciar tanto la aparición de una mayor cantidad de pelos radiculares como de raíces secundarias, además de otros cambios que puedan impactar en el metabolismo de la planta a corto o largo plazo. Por ejemplo, para que *T. atroviride* aumente en mayor grado la longitud de la radícula y número de raíces secundarias, o bien que *T. asperellum* produzca un aumento importante en el grosor de los pelos radiculares y su densidad, comparado con los otros hongos.

Dentro de las moléculas promotoras del crecimiento de la planta se encuentran las auxinas, que son sintetizadas tanto por el hongo como por la planta y que llevan a favorecer el alargamiento celular y la elongación del tallo, pero también cambios en la arquitectura radicular. El efecto en la elongación de los tallos y los cambios en la arquitectura radicular fueron observados en este trabajo en las plantas de 72 h de crecimiento, por lo que es posible que las auxinas participaran en este

proceso. *T. virens* y *T. atroviride* producen diferentes compuestos indólicos tipo auxina que pueden inducir el crecimiento vegetal: ácido indol acético (AIA), el indol-butírico, indol-3-carboxaldehído y el indol-3 etanol, mismos que se ha demostrado modifican la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* (Contreras-Cornejo et al., 2009).

En maíz ya se ha documentado que *T. asperellum* induce el crecimiento de la planta, modifica la arquitectura de la radícula, produciendo mayor número de pelos radiculares y aumentando su grosor (Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria et al., 2016), lo que supone un aumento de la superficie radicular, sugerente de una mejora para lograr una mayor absorción de nutrientes en las raíces y que podría llevar a un aumento en el crecimiento de la planta. También se demostró que los exudados del hongo presentan contenidos bajos de AIA, lo que sugiere que hay otras moléculas en el exudado que promueven el crecimiento. López-Coria y colaboradores (2016) demostraron que *T. asperellum* es capaz de aumentar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática, enzima encargada no solo del establecimiento de un gradiente eléctrico a través de la membrana, sino también de la reducción del pH en el apoplasto, que se sabe ayuda al aflojamiento de la pared celular y a la expansión celular, aunque aún se desconoce cuál o cuáles metabolito del exudado de *T. asperellum* afectan a la enzima, por lo que es probable que más de una molécula promueva el crecimiento de la planta.

T. atroviride así como otros miembros del género *Trichoderma* producen 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), metabolito volátil que se produce en alta concentración y que promueve el crecimiento vegetal a ciertas concentraciones, además de estar involucrado en los cambios morfológicos de la raíz para aumentar la superficie de absorción de nutrientes (Garnica-Vergara et al., 2016).

Sin embargo, el 6-PP a concentraciones elevadas puede llevar a la reducción del crecimiento de la planta (Keswani et al., 2014; Garnica-Vergara et al., 2016). Esto es interesante de señalar, ya que, a tiempos prolongados del crecimiento, a 14 días, encontramos que las plantas que fueron producto del biopriming con *Trichoderma*, tenían un crecimiento reducido, una posibilidad es que acumularan algunos metabolitos como el 6-PP, tal vez debido a un crecimiento más acelerado del hongo, ello ocasionaría la reducción del tamaño de la planta. Aunque hay que señalar que las plantas se mantenían sanas, no se observó daño por organismos patógenos o daño físico aparente, la parte aérea mantenía un color verde sin síntomas de clorosis, lo que fue corroborado al encontrar que el nivel de clorofila era similar al del lote de plantas control. Lo anterior podría ser signo de que la capacidad fotosintética de las plantas colonizadas por los hongos no se encontraba comprometida y podían continuar el reparto de carbono a los tejidos demandantes y/o a los microorganismos que las colonizan. Pese a que la toma de carbono por las especies de *Trichoderma* impactó en el desarrollo tanto del tallo y como en la longitud de las hojas. Es necesario realizar experimentos a tiempos más prolongados o en presencia de condiciones ambientales cambiantes o estresantes (estrés hídrico, osmótico, salino o por patógenos) que permitan determinar que *Trichoderma* efectivamente mejora el crecimiento de las plantas, como ya se ha establecido en otras plantas (Harman, 2000; Shores et al., 2010; Harman, 2011; Guzmán-Chávez, 2013).

b. Efecto de *T. atroviride*, *T. asperellum* y *T. virens* en la expresión de los ZmSWEETs en los coleóptilos de plantas de 72 h de crecimiento y en las hojas de plantas de 14 días

Al romper la dormancia³ se inicia el proceso de germinación de la semilla, donde ocurren una serie de cambios metabólicos para el desarrollo del coleóptilo y la raíz primaria. La degradación enzimática del almidón proveniente del endospermo es

³ Dormancia. Estadio latente de semillas maduras en el cual se encuentran en condiciones de actividad metabólica extremadamente baja, con suspensión del crecimiento y desarrollo (Campbell y Reece, 2007).

la fuente de carbohidratos más importante en tiempos tardíos de la germinación y antes de que la maquinaria fotosintética se desarrolle (Nonogaki, 2014). A las 72 h de crecimiento de la planta de maíz ya se observaba la aparición del coleóptilo y la raíz primaria, por lo que se esperaba que la expresión de los transportadores de sacarosa fuera alta, estos en particular ya que el transporte de carbono principalmente ocurre en las plantas con azúcares no reductores como la sacarosa, ya que no son modificados en su camino hacia los tejidos demandantes (Lemoine 2013). En efecto los SWEET13a y 13b se encuentran presentes, estos ya se han estudiado y se conoce que son transportadores de sacarosa localizados en la membrana plasmática del tejido vascular del maíz (Bezruczyk et al., 2018). Sin embargo, no encontramos que cambiará su expresión en los coleóptilos a las 72 h de crecimiento por la presencia de los hongos. Lo anterior puede deberse a que la semilla aún le está donando el carbono necesario para su crecimiento, por lo que la presencia del hongo no impacta en la movilización de azúcares a ese tiempo, ya que las reservas de carbono son suficientes para que la planta se desarrolle y aún queden reservas en la semilla para que sean donadas al microorganismo en dosis que le permitan sobrevivir sin dañar el crecimiento de la planta.

También se podría realizar el ensayo de análisis de PCR por tiempo real de los transcritos para los SWEETs en los coleóptilos para corroborar lo obtenido a través del ensayo de PCR en punto final. Debido a que esta técnica es menos sensible y no permite detectar cambios en la expresión ni cuantificarla a lo largo de los ciclos de amplificación, en contraste con el análisis en tiempo real o RT-PCR (Rodríguez y Rodríguez, 2006).

Respecto al efecto de los diferentes hongos del género *Trichoderma* sobre los SWEETs a tiempos más prolongados del desarrollo, cuando la planta depende más de la actividad fotosintética, esperábamos que el hongo sí pudiera afectar el reparto de carbono en la planta, tanto en la expresión de los transportadores SWEETs como en otros transportadores. Lo que se encontró fue que cada uno de

los hongos, *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* modifican la expresión de los SWEETs de manera diferente.

T. asperellum reduce la expresión de SWEET1b, 4a, 13a, 13b y 17, de estos se presume que SWEET1b y 4a son transportadores de hexosas (Eom et al., 2015), ZmSWEET13a y 13b si se conoce que son transportadores de sacarosa (Bezruczyk et al., 2018) y ZmSWEET17 podría ser un transportador de fructosa ya que es similar a los SWEETs que se concentran en el clado IV (Eom et al., 2015). ZmSWEET4c se ha descrito como un transportador de hexosas localizado en las membranas plasmáticas que es importante para el llenado de la semilla con almidón, es el parólogo del ZmSWEET4a por lo que es posible que éste último transporte hexosas (Sosso et al., 2015). La diferente disponibilidad de azúcares induce la expresión del transportador ZmSWEET4c (Sosso et al., 2015 y comunicación personal Sánchez-Sánchez, 2018), pero concentraciones bajas de glucosa (5 mM) en el eje y en el escutelo reducen la expresión de ZmSWEET4c, pero también de ZmSWEET13a y 13b (comunicación personal Sánchez-Sánchez, 2018). Lo anterior podría sugerir que la baja expresión de estos transportadores se produciría por una disminución en la glucosa disponible por el tejido, ya sea un cambio metabólico que no permite que la sacarosa se hidrolice a hexosas por las invertasas intracelulares o las invertasas extracelulares. Por lo que la sacarosa podría ser almacenada en otros compartimentos subcelulares como la vacuola, o bien estar usándose o exportando para su uso por otros tejidos de la planta. Esto es apoyado por los niveles bajos de los transcritos para el transportador SUT, el cual se encarga de concentrar azúcares en la célula, por lo que es posible que las células en la hoja estén expulsando más sacarosa a pesar de que se estén transcribiendo menos SWEETs. Adicionalmente, se observó que *T. asperellum* es el de mayor crecimiento en placa, por lo que es posible que pueda establecer más rápidamente la colonización de las raíces si la planta le dona el carbono para su crecimiento, lo que explicaría la reducción en el tamaño de la planta.

El caso contrario ocurre con *T. virens*, el cual indujo la expresión de ZmSWEETs 13b y 17, aunque también reduce la expresión de ZmSUT1. Lo cual podría sugerir

que hay un aumento en el eflujo de sacarosa probablemente para nutrir al hongo, pero en este caso a expensas de los SWEETs en conjunto con la baja acumulación de sacarosa debida a la reducción de SUT1. Es interesante que también SWEET17 aumente, si éste es un transportador de fructosa su mayor expresión podría indicar la entrada de fructosa a la vacuola, como se ha observado en *Arabidopsis*, lo cual puede llevar a controlar la osmolaridad de la célula (Guo et al., 2014). Por lo que se hace necesario determinar su especificidad por azúcares y su localización subcelular para poderle asignar a SWEET17 un papel fisiológico durante la interacción de la planta con *Trichoderma*.

Diversos SWEETs han sido relacionados con el soporte al crecimiento de patógenos en distintas especies vegetales. El mecanismo que induce su expresión se ha demostrado en arroz y en varias especies de cítricos como *Citrus aurantifolia*, en donde mediante la inducción de efectores tipo TAL, la bacteria patógena manipula la expresión de los SWEETs para obtener el carbono necesario para su crecimiento (Eom et al., 2015). Aunque *Trichoderma* al ser un hongo biótrofo, no promueve la inducción de efectores TAL, aún se desconoce qué tipo de mecanismo emplea para asegurar su nutrición. Si bien se conoce que *T. virens* es capaz solamente al interactuar con la planta de inducir la expresión de un transportador de sacarosa y de una invertasa intracelular (Wahl et al., 2010), esto podría indicar que *T. virens* preferiría obtener el carbono en forma de sacarosa, resultado que concuerda con los cambios en la expresión de los SWEETs que se observaron en las plantas de 14 días de crecimiento.

Sin embargo, aún es posible que haya otros caminos por los cuales los hongos benéficos como *Trichoderma* aseguren su aporte de carbono en la planta, sin afectar en mayor medida a los SWEETs, como fue el caso de *T. atroviride*, aunque si hubo una reducción en la expresión de los SWEETs 4a y 13b, además del ZmSUT1, lo que podría explicar no solo la salida de más sacarosa y hexosas de las hojas sino también el menor crecimiento de la planta.

A pesar de que nuestro estudio se enfocó en el desarrollo de la parte aérea, es probable que el impacto que tuvo cada cepa de *Trichoderma* y las respuestas de la planta a tal interacción, hayan sido más visibles en la rizósfera y por ende en la raíz, ya que se ha observado que en presencia del hongo hay un incremento en la cantidad de azúcares excretados por la raíz (comunicación personal López-Coria, 2018).

¿Por qué cada hongo lleva a una respuesta diferente en la expresión de los SWEET?, es algo que todavía queda pendiente de analizar y probablemente un análisis más profundo como de metabolómica podría ayudar a entender estos efectos.

Como se ha discutido ya, *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride* y *T. virens* poseen diferentes estrategias como endófitos, dando así una respuesta diferente del hospedero. Cada cepa contribuye de forma distinta en el desarrollo de la planta, por lo que la combinación de una o más cepas en el biopriming tendría un efecto sinérgico dando así una combinación en la respuesta que se induce en la planta y por lo tanto, un mayor efecto benéfico ampliando su espectro de actividad (Stewart & Hill, 2014).

XI. CONCLUSIONES

El biopriming con *T. virens*, *T. atroviride* y *T. asperellum* favorece el crecimiento de *Zea mays* en estadios cortos de desarrollo. Pero no tiene un efecto en la expresión de los SWEETs en la parte aérea al menos a las 72 h de crecimiento. Contrariamente, el biopriming lleva a que a los 14 días de crecimiento haya una menor talla de la planta, aunque no afecta su contenido de clorofila, pero sí tiene un efecto discreto en la abundancia de los SWEETs dependiendo de la especie de *Trichoderma*; *T. virens* aumenta la expresión de dos SWEETs, *T. atroviride* reduce la expresión de dos SWEETs y *T. asperellum* reduce totalmente su expresión.

XII. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar y analizar la expresión de los ZmSWEET en coleóptilos a 72 h en presencia de *Trichoderma* mediante RT - qPCR.
2. Analizar la expresión de los ZmSWEET de hoja en presencia de *Trichoderma* en plantas de maíz a diferentes tiempos y condiciones de desarrollo: Estrés osmótico, estrés hídrico, presencia de patógenos o incremento en la disponibilidad de nutrimentos.
3. Identificar la función fisiológica del ZmSWEET17 y su localización subcelular.
4. Evaluar el efecto de diferentes especies del hongo *Trichoderma* pero como una infección múltiple, en la expresión de los SWEETs en tejido aéreo de maíz.
5. Evaluar el efecto en la expresión de los ZmSWEET de raíz joven y madura en presencia de diferentes especies de *Trichoderma*.
6. Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios excretados en la interacción *Trichoderma-Zea mays* que favorecen el desarrollo de la planta tanto de la parte aérea como en la raíz.

XIII. REFERENCIAS

- Atanasova L, Crom SL, Gruber S, Coulpier F, Seidl-Seiboth V, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2013a. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14:121. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/121>
- Atanasova L, Druzhinina IS, Jaklitsch WM. 2013b. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. *Trichoderma: Biology and Applications*. pp. 10-42.
- Atanasova L. 2014. Chapter 2. Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Elsevier: Oxford, UK. pp. 25-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00002-3>
- Aguirre-Acosta E, Ulloa M, Aguilar S, Cifuentes J, Valenzuela R. 2014. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 95:76-81. **DOI:** 10.7550/rmb.33649
- Bailey BA, Strem MD, Wood D. 2009. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological Research* 113: 1365-1376.
- Bailey BA, Melnick RL. 2013. The endophytic *Trichoderma*. *Trichoderma: Biology and Applications* pp. 152-172.
- Baker RF, Leach KA, Braun DM. 2012. SWEET as sugar: new sucrose effluxers in plants. *Molecular Plant*, 5 (4): 766-768. **DOI:**10.1093/mp/sss054
- Bezruczyk M, Hartwig T, Horschman M, Nian-Char S, Yang J, Yang B, Frommer W, Sosso D. 2018. Impaired phloem loading in genome-edited triple knock-out mutants of SWEET13 sucrose transporters. *New Phytologist* **DOI:** <https://doi.org/10.1101/197921>
- Bonifaz A. 2015. *Micología Médica Básica*. 5a Edición. Mc Graw Hill Education: México. pp. 1-10.
- Braun DM. 2012. SWEET! The pathway is complete. *Science*, 335 (6065): 173-174. **DOI:** 10.1126/science.1216828
- Brotman Y, Kapuganti JG, Viterbo A. 2017. *Trichoderma*. *Current Biology* 20 (9), pp. 390-391.

- 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 en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Che Li-Q. 2014. SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist*, 201: 1150–1155. **DOI:** 10.1111/nph.12445
- Chen Li-Q, Cheung LS, Feng L, Tanner W, Frommer WB. (2015a) Transport of Sugars. *Annual Review in Biochemistry* 84: 865–94
- Chen Li-Q, Hou Bi-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Someville SC, Mudgett MB, Frommer WB. (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527–532. **DOI:**10.1038/nature09606
- Chen Li-Q, Lin IW, Qu X-Q, Sosso D, McFarlane HE, 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, 607–619.
- CONABIO. 2018. Maices. *Biodiversidad Mexicana. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)*. <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/maiz.html>
- Conde A, Martins V, Noronha H, Conde C, Fontes N, Geros H. 2011. Solute transport across membranes. *CanalBQ* 8: 20-34. <http://hdl.handle.net/1822/15776>
- 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 (3): 1579-1592.
- Contreras-Cornejo HA, Ortiz-Castro R, López-Bucio J. 2013. Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma*: physiology, genetics and gene expression. *Trichoderma: Biology and Applications* pp. 173-194.

- De León, C., Rodríguez- Montessoro, R. 2010. El Cultivo del Maíz. Temas selectos II. 1ª Edición. Mundi Prensa México: México. pp. 1-48.
- Delgado-Rubio NE. 2017. Perfil de expresión de seis transportadores de azúcares tipo SWEET en diferentes etapas del desarrollo de las hojas de maíz. Tesis para obtener el grado de Químico de Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Doidy J, Grace E, Kühn G, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and their interactions with fungi. *Trends in Plant Science*, 17, 7: 413-422, **DOI:**10.1016/j.tplants.2012.03.009
- Druzhinina I, Kubicek CP. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University. Science B* 6: 100-112.
- Druzhinina IS, Kubicek CP. 2016. Chapter two. Familiar stranger: ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. *Advances in Applied Microbiology*, 95: 79-147. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.02.001>
- Eom, J.-S., Chen, Li-Q., Sosso, D., Julius, B. T., Lin, IW, Qu, X.-Q., Braun, D. M., Frommer, W. B. (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 25: 53-62.
- FAO, 1993. El maíz en la nutrición humana. *Colección FAO: Alimentación y nutrición*, 25. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>
- Garnica-Vergara A, Barrera-Ortiz S, Muñoz-Parra E, Raya-González J, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209: 1496-1512, **DOI:** 10.1111/nph.13725
- Griffiths PE. 2006. Function, homology and character individuation. *Philosophy of Science* 73: 1-25.
- Guo W-J, Nagy R, Chen H-Y, Pfrunder S, Yu Y-C, Santelia D, Frommer WB, Martinoia E. 2014. SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose

- transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiology* 164 (2), 777-789. **DOI:** 10.1104/pp.113.232751
- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Harman GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393.
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194. **DOI:** 10.1094/PHYTO-96-0190
- Harman GE. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189, 647-649
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 43–56.
- Heldt HW, Piechulla B, Heldt F. 2011. Plant Biochemistry. 4a Edición. Elsevier: Londres, UK. pp. 337-348.
- Howell CR. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, 96 (2): 178-180.
- Jaklitsch WM, Voglmayr H. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.11.001>.
- Karagiosis SA, Baker SE. 2013. *Trichoderma* and the biorefinery: from plant health to enzymes to biofuel production. *Trichoderma: Biology and Applications*, pp. 222-229.
- Kato TA, Mapes C, Mera LM, Serratos JA, Bye RA. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: México, D.F. pp. 116.

- Keswani C, Mishra S, Sarma BK, Singh SP, Singh HB. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Appl. Microbiol. Biotech.* 98: 533-544.
- Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 38: 310–319.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(10):753-763. **DOI:10.1631/jzus.B0860015**
- Leach KA, Tran TM, Slewinski TL, Meeley RB, Braun DM. 2017. Sucrose transporter2 contributes to maize growth, development, and crop yield. *Journal of Integrative Plant Biology.* 59 (6): 390-408
- Lemoine R, Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain JL, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse 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.
- Lin IW, Sosso D, Chen LQ, Gase K, Kim SG, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou BH, Qu XQ, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, 508: 546-549. **DOI:10.1038/nature13082**
- Ling Q, Huang W, Jarvis P. 2011. Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res*, 107 (2): 209-214. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9606-0>
- López-Coria M, Hernández-Mendoza JL, Sánchez-Nieto S. 2016. *T. asperillum* induces maize seedling growth by activating the PM H⁺-ATPase. *Molecular Plant Microbe Interactions* 29(10): 797-806.
- Manoli A, Sturaro A, Trevisan S, Quaggiotti S, Norris A. 2012. Evaluation of candidate reference genes for qPCR in maize. *Journal of Plant Physiology* 169 (8): 807-815.

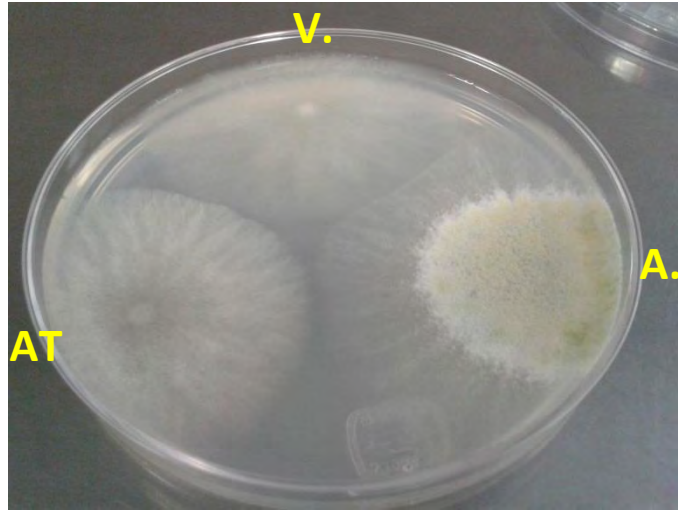
- Martínez B, Infante D, Reyes, Y. 2013. *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal* 28 (1): 1-11.
- Moretti A, Sarrocco S. 2016. Fungi. Encyclopedia of Food and Health. Elsevier, 162-168. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00341-X>
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M. 2013. *Trichoderma* in agriculture industry and medicine: an overview. *Trichoderma: Biology and Applications*. pp. 1-9.
- Nawrocka J, Malolepsza U. 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* 67: 149-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.07.005>
- Nelson DL, Cox MM. 2008. Lehninger, Principles of biochemistry. Fifth Edition. W. H. Freeman and Company: New York. pp 389-395.
- Nonogaki, H. 2014. Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, 5 (233): 1-14 <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00233>
- Palacios-Vargas IG. 2016. Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por la infección con *Trichoderma asperellum*. Tesis para obtener el grado de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29 (9): 45e-45.
- Rodríguez M, Rodríguez W. 2006. Métodos físico-químicos en biotecnología. PCR tiempo real. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
- Rossi-Rodrigues BC, Brochetto-Braga MR, Tauk-Tornisielo SM, Carmona EC, Arruda VM, Chaud Netto J. 2009. Comparative growth of *Trichoderma* strains in different nutritional sources, using bioscreen c automated system. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40 (2):404-410.
- Samuels GJ. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96 (2):195-206. DOI: 10.1094/PHYTO-96-0195
- Sandle T. 2014. *Trichoderma*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3: 644-646. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00337-2>

- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* 63 (12): 4513–4526. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers130>
- Schmoll M, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A. 2010. *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. *Fungal Genetics and Biology* 47: 909-916. **DOI:**10.1016/j.fgb.2010.04.010
- Schuster A, Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol biotechnol*, 87: 787-799. **DOI:** 10.1007/s00253-010-2632-1
- Shoresh M, Mastouri F, Harman GE. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of Phytopathology*, 48: 21-43.
- SIAP, 2018. Avance de Siembras y Cosechas. Resumen nacional por cultivo. Otoño-invierno 2018. Riego+Temporal. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do
- Singh A, Shahid M, Srivastava M, Pandey S, Sharma A, Kumar V. 2014. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Viol Mycol*, 3: 127. **DOI:**10.4172/2161-0517.1000127
- Singh R, Mauryab S, Upadhyayc RS. 2016. The improvement of competitive saprophytic capabilities of *Trichoderma* species through the use of chemical mutagens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47: 10-17.
- Slewinski TL, Garg A, Johal GS, Braun DM. 2010. Maize SUT1 functions in phloem loading. *Plant Signaling & Behavior*, 5 (6): 687-690.
- Sosso D, Luo D, L, Q-B, 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): 1489-93. **DOI:**10.1038/ng.3422

- Stewart A, Hill R. 2014. Chapter 31. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier: Oxford, UK. pp. 415-425. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00031-X>
- Steyaert JM, Weld RJ, Loguercio LL, Stewart A. 2010. Rhythmic conidiation in the blue-light fungus *Trichoderma pleuroticola*. *Fungal Biology* 114: 219-223. **DOI:**10.1016/j.funbio.2010.01.001
- Turton, JD. 1974. The collection, storage and dissemination of information on breeds of livestock. *Proceedings of 1st World Congress On Genetics Applied To Livestock Production*, 61-74.
- Vargas WA, Crutcher FK, Kenerley CM. 2011. Functional characterization of plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist*, 189: 777-789. **DOI:** 10.1111/j.1469-8137.2010.03517.x
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology*, 151: 792-808.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering journal* 37: 1-20. **DOI:**10.1016/j.bej.2007.05.012
- Wahl R, Wippel K, Goos S, Kämper J, Sauer N. 2010. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* 8(2), e1000303. **DOI:**10.1371/journal.pbio.1000303
- Whittaker RH. 1969. New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163 (3863):150-160. **DOI:** 10.1126/science.163.3863.150
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, 96 (2): 181-185. **DOI:** 10.104/PHYTO-96-0181
- Yedidia IN, Benhamou N, Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3): 1061-1070.

- Zeilinger S, Omann M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation System Biology*, 1: 227-234
- Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom J, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J*, 82: 632-643. DOI:[10.1111/tpj.12838](https://doi.org/10.1111/tpj.12838)

ANEXO I.



Anexo 1. Cultivo triple de las cepas de *Trichoderma* de 3 días de desarrollo en medio PDA 1X a 29°C en oscuridad. A. *T. asperellum*, V. *T. virens* y AT *T. atroviride*.