



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE LOS EXUDADOS DE
Trichoderma asperellum SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
ATPasa DE H⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y EL
CRECIMIENTO DE MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA
TEYACATZIN DÍAZ ALVITER**



Ciudad Universitaria, CDMX

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.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”

-Albert Einstein

...Reuniendo los fragmentos de nuestros sueños,
formaremos el mapa de nuestro mañana.

-KW

AGRADECIMIENTOS

EL TRABAJO DE TESIS “*Efecto de las fracciones de los exudados de Trichoderma asperellum sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y el crecimiento de maíz*” realizado por Teyacatzin Díaz Alviter fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y con la dirección técnica de la M. en C. Beatriz King Díaz en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz se le agradece su apoyo, sus consejos y facilidades prestadas en el análisis e identificación de moléculas presentes en el exudado de *T. asperellum* y sus fracciones mediante DSA-HR-APCI-MS.

A la M. en C. Montserrat López Coria se le agradece su apoyo técnico en el análisis estadístico de los datos y en la determinación de actividad de ATPasa.

A mi jurado de tesis integrado por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, el Dr. Francisco Ruíz Terán y la Dra. Francisca Morayna Gutiérrez Luna por sus acertados comentarios en este trabajo de tesis.

El trabajo de tesis recibió financiamiento a través de Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	I
Índice de tablas.....	II
Abreviaturas.....	III
Resumen.....	IV
Introducción.....	1
<i>Trichoderma</i> hongo biocontrol de patógenos.....	1
<i>Trichoderma</i> hongo promotor del crecimiento vegetal.....	8
Teoría del crecimiento ácido: inducida por IAA y la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática.....	10
Regulación de la ATPasa de H ⁺ durante la interacción de la planta con microorganismos.....	13
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivos.....	17
Materiales y métodos.....	18
Resultados	26
Discusión.....	46
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Referencias.....	55
Anexo A.....	62
Anexo B.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micoparasitismo de hongos. Hifas de <i>Trichoderma asperellum</i> que están estrangulando a las hifas de <i>Fusarium verticillioides</i>	6
Figura 2. Función celular de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática.....	11
Figura 3. Caricatura de la ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática (AHA2)....	12
Figura 4. Caricatura de los residuos fosforilados en AHA2 por ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática (AHA2).....	14
Figura 5. Diseño experimental seguido en este trabajo.....	18
Figura 6. Curva patrón. Determinación de proteínas por el método de Bradford...22	
Figura 7. Curva patrón de fosfatos. Determinación por el método de González-Romo et al., 1992.....	24
Figura 8. Perfiles de pico de las masas de los compuestos en las fracciones del exudado, las fracciones y un compuesto puro de <i>Trichoderma</i>	25
Figura 9. Efecto de la fracción hexánica del exudado de <i>T. asperellum</i> sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal.....	29
Figura 10. Efecto de la fracción acetato de etilo del exudado de <i>T. asperellum</i> sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsoma.....	31
Figura 11. Efecto de la fracción acuosa del exudado de <i>T. asperellum</i> sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal.....	32
Figura 12. Identificación de 6-pentil-2H-piran-2-ona.....	34
Figura 13. Efecto de 6-pentil-2H-piran-2-ona sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal.....	35
Figura 14. Los exudados de <i>Trichoderma asperellum</i> inducen el crecimiento de las raíces de maíz.....	37
Figura 15. Comparación del efecto del exudado (contacto y remojo), y biopriming en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación.....	38
Figura 16. Efecto de las fracciones acuosa, de hexano y de acetato de etilo sobre el crecimiento de las plantas de maíz.....	40
Figura 17. Comparación del efecto de las fracciones acuosa, de hexano, de EtOAc y del 6PP en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación.....	41

Figura 18. Efecto de 6PP en el crecimiento de las plantas de maíz.	42
Figura 19. Efecto del exudado de <i>T. asperellum</i> , las fracciones acuosa, de hexano, de EtOAc y del compuesto 6PP en el crecimiento de las plantas de maíz.....	44
Figura 20. Comparación del efecto del extracto de <i>T. asperellum</i> , las fracciones acuosa, de hexano, de acetato de etilo y del compuesto 6PP en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de algunos metabolitos secundarios producidos por diferentes especies del género <i>Trichoderma</i> y su actividad biológica demostrada.....	4
Tabla 2. Efecto del extracto extracelular de <i>T. asperellum</i> en la actividad de ATPasa de protones de la MP en las fracciones microsomales de coleoptilos y raíces de maíz.....	26
Tabla 3. Compuestos mayoritarios identificados en el exudado y las fracciones de <i>T. asperellum</i>	33

ABREVIATURAS

6 PP	6-pentil-2H-piran-2-ona
AHA	ATPasa de H ⁺ de la membrana plasmática de Arabidopsis
ATPasa de H⁺ de MP	ATPasa de protones de la membrana plasmática
BTP	1,3 bis[tris(hydroxymethyl-methylamine)] propano
CCCP	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
IAA	Ácido indol acético
ETI	Inmunidad inducida por efectores del inglés "Effector-triggered immunity"
EtOAc	Acetato de etilo
FER	Ferroína
FM	Fracción Microsomal
ISR	Resistencia sistémica inducida del inglés "induced systemic resistance"
JA	Ácido jasmónico
MOPS	Acido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico
MP	Membrana plasmática
MS	Metabolitos secundarios
NOX	NADPH oxidasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PDA	Papa dextrosa agar
PDB	Caldo papa dextrosa
PR	Proteínas relacionadas con patogénesis
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida del inglés "Systemic induced resistance"
SAUR	Small auxin-up RNA

RESUMEN

Varios miembros del género *Trichoderma* son promotores del crecimiento vegetal además de ser un hongo biocontrol de patógenos. Los efectos benéficos de este género en el crecimiento de las plantas se ha propuesto que se debe a la síntesis de hormonas como las auxinas. Sin embargo, especies de *Trichoderma* como *T. asperellum* con baja síntesis de ellas, aún promueven el crecimiento de la planta. La actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (MP), una enzima que participa en el proceso de elongación celular, se activa durante la interacción de *T. asperellum* con la planta y también al estar en contacto con el exudado del hongo. Por lo que el objetivo de este trabajo fue fraccionar el exudado del hongo con solventes de diferente polaridad para encontrar las moléculas que pudieran estar involucradas en la activación de la ATPasa de H⁺ de MP y por tanto también en la promoción del crecimiento de la planta de maíz.

Se obtuvieron tres fracciones del exudado de *T. asperellum*: hexano, acetato de etilo y acuosa. Las tres fracciones fueron empleadas para determinar la actividad total de hidrólisis de ATP por la ATPasa H⁺ de la MP. La fracción de hexano incrementó hasta en un 56 % la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H⁺ de la MP, por lo que es probable que tenga una mayor proporción en compuestos que tienen un efecto en la capacidad de incidir sobre el crecimiento vegetal. La fracción acuosa incrementó la actividad de la ATPasa de H⁺ aunque en menor porcentaje comparándola con la fracción de hexano. De manera opuesta, la fracción de acetato de etilo redujo la actividad de ATPasa total y de MP a ciertas concentraciones. Adicionalmente, las tres fracciones fueron analizadas mediante DSA-HR-APCI-MS para determinar la presencia de compuestos promotores del crecimiento, encontrándose varios de importancia, como el 6-pentil-2H-piran-2-ona ó 6PP que se encontró en las tres fracciones, mientras que en la fracción de hexano y la de acetato de etilo (EtOAc) se encontraron las coninginas A y C, por último, en la fracción de acetato de etilo se detectó el compuesto harzianolida. El ensayo realizado con 6PP puro, no tuvo efecto en la actividad de la ATPasa H⁺ de MP, por lo que es probable que otras moléculas presentes en las fracciones sean las responsables de la activación de la enzima.

Las fracciones afectaron el crecimiento de las plantas de maíz de manera similar al efecto que produjeron sobre la ATPasa H⁺ de la MP, 5 µg de la fracción de hexano produjo un mayor incremento en la longitud del coleoptilo, las raíces y el número de raíces. Respecto al 6PP se observó que mejora el crecimiento del coleoptilo y la aparición de raíces adventicias, pero no se observa efecto sobre longitud de la raíz primaria. Por lo que será necesario probar otros metabolitos identificados en este trabajo, debido a que algunos se han descrito como promotores del crecimiento vegetal, aunque de otros se desconoce su función.

INTRODUCCIÓN

***Trichoderma* hongo biocontrol de patógenos**

La primera descripción del género *Trichoderma* data de 1794. Para 1865, se sugirió un vínculo con el estado sexual de la especie de hongo *Hypocrea*. En la actualidad su género comprende a más de 100 especies definidas filogenéticamente (Schuster y Schmoll 2010). La base de datos Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) contiene un registro de 359 especies del género *Trichoderma*. La clasificación taxonómica del género *Trichoderma* es:

División: Fungi

Subdivisión: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Trichoderma*

Los hongos del género *Trichoderma* son ascomicetos, se caracterizan por una esporulación y una ramificación alta con estructuras tipo conidióforo, hifa especializada o prolongación del tallo que soporta a los conidios. También presenta fiálide, considerada también como esterigma, que es una pequeña ramificación o estructura hifal conidiogénica, por lo regular está unida al conidióforo; de ésta nacen los fialoconidios. Por su función tiene un micelio reproductivo o aéreo que se encarga de soportar las estructuras y formas de reproducción (Schuster y Schmoll 2010; Bonifaz, 2012).

Las especies del género producen una amplia gama de pigmentos que van del amarillo verdoso brillante al rojo (Schuster y Schmoll 2010), aunque algunos

también son incoloros. Además, la pigmentación conidial varía de incolora a varios tonos verdes y, a veces también gris o marrón. Para su crecimiento necesitan como fuente de carbono: glucosa, sacarosa o maltosa; y como fuente de nitrógeno: proteínas o sales de nitrógeno. También precisan de los iones inorgánicos como potasio, fósforo, magnesio, hierro, cobre, zinc y molibdeno. Pueden sintetizar vitaminas, aunque hay especies que llegan a ser deficientes en éstas y requieren tomarlas del medio externo, sobre todo la tiamina y biotina. Tienen la capacidad para almacenar ácidos grasos, acilgliceroles y glucógeno en las vacuolas (Sunil y Siu 2014; Bonifaz, 2012).

Se ha demostrado que la mayoría de las especies de *Trichoderma* son benéficas. En vida libre los miembros del género *Trichoderma* son colonizadores de materiales celulósicos y se encuentran como saprófitos dispersados en el suelo, aunque varias especies son endófitos de plantas, colonizando las raíces (Schustery y Schmoll, 2010). Pueden encontrarse en una gran variedad de nichos, por ejemplo, en regiones con material vegetal en descomposición, por lo que tienen presencia en la mayor parte del mundo (Kubicek et al. Genome Biology 2011; Kubicek y Druzhinina 2005).

El género *Trichoderma* posee mecanismos de defensa químicos y enzimáticos que lo hacen un hongo micoparásito, antagonista y un agente de biocontrol de patógenos eficiente (Vinale et al, 2005; Schustery y Schmoll, 2010). Algunas especies del género *Trichoderma* se emplean con éxito para el control biológico de microorganismos, en particular como biofungicidas en el suelo, lo anterior debido a que posee mecanismos antagónicos tales como:

- A) Eficiente competencia por espacio y nutrientes con otros microorganismos.** Se considera al género *Trichoderma* como colonizadores exitosos de sus hábitats, debido a que presenta un crecimiento acelerado y a su capacidad de degradar eficientemente una gran variedad de sustratos disponibles, por su capacidad para vivir como saprófitos (Schuster y Schmoll, 2010).

B) Antibiosis. Varias especies de *Trichoderma* son prolíficos productores de una gran diversidad de metabolitos secundarios (MS), los que permiten la sobrevivencia del hongo en diferentes nichos ecológicos (Hermosa et al., 2014), algunos de ellos producen compuestos con actividad herbicida, actuando contra las malezas como es el caso del viridiol, además de ser efectivos bactericidas, fungicidas y reguladores del crecimiento, entre otros (Tabla 1 y Anexo A) (Howell, 2006).

Varios de los MS más estudiados son peptaiboles, policétidos, piranonas, terpenos y compuestos similares a la dicetopiperazina (Hermosa et al., 2014), que no solo contribuyen significativamente a la señalización, sino que también interactúan con otros organismos de diversas maneras (Keswani et al., 2013). Algunos de estos compuestos son capaces de restringir el crecimiento de los hongos patógenos, mediante diferentes mecanismos como la inactivación de enzimas de patógenos (Zeilinger et al., 2016), o actuando en combinación con enzimas degradadoras de la pared celular de *Trichoderma*, actuando como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y como compuestos tipo auxina (fitohormona) a bajas concentraciones (Hermosa et al., 2014), lo que detiene el avance de dichos patógenos y favorece el crecimiento de la planta.

En algunos casos se induce la apoptosis por el mecanismo de los peptaiboles (familia de péptidos antibióticos). Estos actúan sobre la membrana del hongo objetivo para inhibir las enzimas asociadas a la membrana implicadas en la síntesis de la pared celular, aunque algunas otras tienen efectos distintos. Por ejemplo, la alameticina es un peptaibol de 20 residuos de *T. viridae* que induce la biosíntesis de dos fitohormonas, el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) en el frijol lima, ambas inducen la respuesta de defensa de la planta (Hermosa et al., 2014).

Tabla 1. Lista de algunos metabolitos secundarios producidos por diferentes especies del género *Trichoderma* y su actividad biológica demostrada.

Metabolitos secundarios	Especie que lo produce	Actividad Biológica	Referencias
PETAIBOLES			
Tricorzinas HA, MA y PA	<i>Trichoderma harzianum</i>	Antifúngicas, antibacterianas y anticancerígenas, inhiben las enzimas asociadas a la membrana implicadas en la síntesis de la pared celular, inhibiendo crecimiento de patógenos, actividad β -glucano sintasa en membranas plasmáticas, apoptosis	Hermosa et al., 2014
Tricovirinas II	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. viride</i>		Hermosa et al., 2014
Viridiofunginas	<i>Trichoderma spp.</i>	Potencial compuesto anticancerígeno, bactericida	Hermosa et al. 2014
Tricotoxina	<i>Trichoderma asperellum</i>	Actividad antifúngica	Degenkolb et al., 2006; Neuhof et al., 2007; Hermosa et al., 2014.
Tricocindinas	<i>Trichoderma harzianum</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al. 2014
Tricostromaticinas	<i>Trichoderma stromaticum</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al. 2014
Conigninas	<i>Trichoderma spp.</i>	Antifúngico, regulador del crecimiento de la planta	Cutler et al., 1991; Keswani et al., 2014
Triconingina	<i>Trichoderma strigosum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Antifúngico de amplio espectro, inductor de defensa de plantas	Hermosa et al., 2014
Harzianina HBI	<i>Trichoderma harzianum</i> ,	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Tricofumina A y B	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Tricopolinas	<i>Trichoderma polysporum</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Alameticina	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>H. atroviridis</i> y <i>Trichoderma brevicompactum</i>	Biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), induce señales eléctricas de resistencia y respuestas tipo defensa en plantas	Hermosa et al., 2014
Harzianolida	<i>Trichoderma spp.</i>	Antifúngico, promotor del crecimiento de las plantas	Hermosa et al., 2014
PIRONAS			

6-pentil-2H-piran-2-ona	<i>Trichoderma spp.</i>	Aroma a coco y propiedades inhibitorias contra hongos fitopatógenos Promotor del crecimiento vegetal	Hermosa et al., 2014
6-pent-1-enil-alfa-pirona	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Massoilactona	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
δ-decanolactona	<i>Trichoderma spp.</i>	Saborizante, actividad antifúngica	Ahluwalia V. et al 2014
Viridepiranona	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antagonista	Hermosa et al., 2014
TERPENOS			
Ergoconis	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Viridina	<i>Trichoderma spp.</i>	Compuesto antimicótico de amplio espectro, antineoplásico, antiaterosclerosis	Brian y McGowan 1945; Dodge et al., 1995; Keswani et al., 2014
Viridiol	<i>Trichoderma spp.</i>	Bactericida, actividad antifúngica	Sakuno et al., 2000; Heraux et al., 2005; Keswani et al., 2014.
Ergosterol	<i>T. polysporum</i>	Función estructural de las membranas	Hermosa et al., 2014
Ubiquinonas	<i>Trichoderma spp.</i>	Biosíntesis	Hermosa et al. 2014
Dolicoles	<i>Trichoderma spp.</i>	Transportador	Hermosa et al. 2014
Harziandiona	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antifúngica	Hermosa et al., 2014
Sesquiterpenos	<i>Trichoderma spp.</i>	Actividad antimicrobiana	Hermosa et al., 2014
Tricotecenos	<i>T. brevicompactum</i> , <i>T. arundinaceum</i>	Capacidad antifúngica e inducir la expresión de genes relacionados con la defensa	Hermosa et al., 2014

C) Micoparasitismo. Algunas especies del género *Trichoderma* tienen la capacidad de emplear un mecanismo de acción donde el agente biocontrol (*Trichoderma*) reconoce al patógeno, se enrolla en las hifas y

las estrangula, para luego degradar su pared celular con enzimas específicas (Gajera et al., 2016), como se observa en la Figura 1.

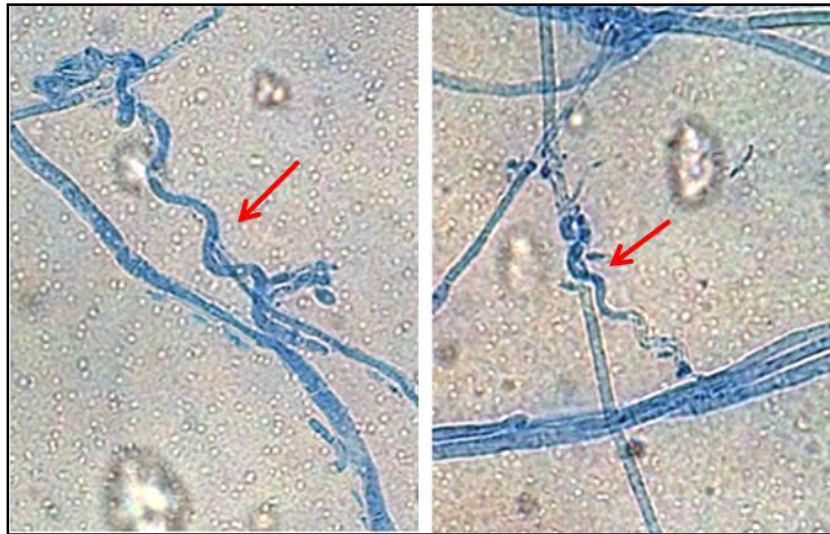


Figura 1. Micoparasitismo de hongos. La flecha indica a las hifas de *Trichoderma asperellum* que están estrangulando a las hifas de *Fusarium verticillioides*. Los hongos fueron teñidos con azul de algodón. Tomado de Arciniega-Ruíz, 2012.

La primera fase para que ocurra el micoparasitismo es el reconocimiento, por ejemplo, *Trichoderma reesei* como otros hongos del mismo género secretan hidrofobinas que son proteínas de superficie y realizan una amplia variedad de funciones. Las hidrofobinas se autoensamblan en estructuras tipo roseta en las superficies externas de las paredes celulares fúngicas y median interacciones entre los hongos y su entorno, lo que permite el crecimiento y la conidiación aérea, el reconocimiento de la superficie del huésped y la simbiosis (Sunil y Siu, 2014).

Posteriormente, otras moléculas permiten la invasión de *Trichoderma*, por ejemplo, las enzimas hidrolíticas como las que pertenecen al sistema quitinolítico (quitinasas y NAGasa), al sistema glucanolítico (β -1,3/1,4-

glucanasas y α -1,3-glucanasas) y al lignocelulítico que pueden degradar las paredes celulares de la planta y/o patógenos, y así promover la eliminación y sobreexpresión de ciertos genes que están relacionados con el crecimiento del patógeno, debido a que hidrolizan los enlaces o-glicosídicos de las cadenas de β -glucano (Sunil y Siu, 2014). Otras enzimas que participan en la inhibición del crecimiento del patógeno como las proteasas, fosfatasa ácida y alginato liasas, ya que son capaces de romper las paredes celulares del huésped o de actuar como inactivadores proteolíticos de enzimas producidas por los patógenos (Qualhato et al., 2013).

Si bien también la pared celular de *Trichoderma* está sujeta a hidrólisis, su alta capacidad de crecimiento le permite sintetizar más pared celular en un corto tiempo, además, la pared celular de los hongos del género *Trichoderma* se encuentra parcialmente protegida, ya que los hongos exudan varias proteínas hidrofóbicas (Gruber y Seidi-Seiboth, 2012).

D) Inducción de la respuesta de defensa de la planta. Una vez que *Trichoderma* ha colonizado las raíces de una planta, éste induce los mecanismos de defensa de esta contra infecciones posteriores, particularmente la resistencia sistémica inducida (Guzmán-Chávez, 2013). Existen tres vías que inducen resistencia a la planta, dos de ellas involucran a proteínas relacionadas con la patogénesis o PR. Una de ellas ocurre como resultado del ataque de microorganismos biótrofos y la segunda como producto del daño o necrosis ocasionados por insectos y/o microorganismos necrótrofos. La vía inducida por patógenos biótrofos se basa en la producción de ácido salicílico (SA) por la planta, que se comporta como una molécula señal para la inducción de la defensa, mientras que la vía inducida por insectos herbívoros se sustenta en la producción de JA como molécula señal. Con base en ello, la resistencia sistémica adquirida (SAR) se correlaciona con la acumulación de SA,

mientras que la resistencia sistemática inducida (ISR) se asocia con la acumulación de JA (Guzmán-Chávez, 2013).

***Trichoderma* hongo promotor del crecimiento vegetal**

Todo lo mencionado anteriormente permite no solo el crecimiento de los hongos del género *Trichoderma* en la rizosfera, sino también actuar como simbiote de las plantas, además ayuda a que la planta esté menos expuesta a los patógenos o bien a que su sistema de resistencia se encuentre prevenido y listo para combatir a un eventual ataque por un patógeno.

Varios miembros del género *Trichoderma* tienen efectos benéficos en el crecimiento de una gran variedad de cultivos de frutas y hortalizas como el frijol, el tomate, la berenjena, el chile, la okra, la calabaza, guar y maíz, entre otros (Guzmán-Chávez, 2013; Toghueo et al., 2016; Singh et al., 2016; López-Coria et al., 2016). Como organismo promotor del crecimiento vegetal, *Trichoderma* spp. es capaz de colonizar principalmente las raíces de las plantas, aunque también se ha relacionado como patógeno oportunista en humanos y animales inmunocomprometidos (Kubicek et al., 2008).

Los efectos benéficos de la interacción del hongo sobre la planta se pueden deber a diversas causas:

- a) **Aumento en la solubilización de nutrientes.** El hongo ayuda a la solubilización de nutrientes presentes en el suelo, mediante la secreción de enzimas como las fitasas que ayudan a solubilizar el fosfato del medio, también moléculas quelantes que permiten que el hierro y el cobre sean absorbidos del suelo, así como agentes reductores y la liberación de ácidos orgánicos. Todo ello permite una disponibilidad mayor de minerales para el crecimiento de la planta (Altomare et al., 1999; Saravanakumar et al., 2013).

- b) Cambios en la arquitectura radicular.** Los cambios en la arquitectura del sistema de raíces afectan la capacidad de absorción de los nutrientes y el agua de las plantas. Algunos procesos que pueden afectar la arquitectura general de las raíces son: (i) tasas diferentes de división celular y alargamiento en la punta de la raíz primaria, que determinan la extensión del crecimiento de la raíz primaria; (ii) formación de la raíz lateral, que aumenta la capacidad exploratoria del sistema radicular; y (iii) formación de pelos radiculares, que aumenta la superficie de la raíz total, de las raíces primarias y laterales (Sánchez-Calderón et al., 2005; Sing et al., 2016). Se conoce que *Trichoderma* spp promueve un desarrollo mejorado de las raíces y brotes. Durante la interacción *T. asperellum*-maíz se encontró que las raíces presentan un mayor número de pelos radiculares y tienen una mayor longitud (López-Coria et al., 2016), este incremento en la superficie radicular podría ayudar a una mejor toma de nutrientes en el suelo.
- c) Producción de promotores del crecimiento vegetal.** Los hongos del género *Trichoderma* pueden producir diversos MS, entre ellos el viridiol, las coningininas y 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) un compuesto volátil excretado por *Trichoderma* que se ha demostrado que en el campo incrementa el crecimiento vegetal (Anexo A) (Keswani et al., 2014) y afecta el transporte de auxinas y la respuesta al etileno (Garnica-Vergara et al., 2016).

Por otra parte, se ha encontrado que durante la interacción de *Arabidopsis* con *T. virens* y *T. atroviride*, se incrementa el contenido de índoles como: el ácido indol acético (IAA), el indol-butírico, el indol-3-carboxaldehído y el indol-3 etanol (Contreras-Cornejo et al., 2009; López-Coria et al., 2016). IAA es una fitohormona que juega un papel vital en la planta, controlando su crecimiento y desarrollo vía la promoción de la división celular (proliferación), el crecimiento (expansión y elongación) y la diferenciación (Majda y Robert, 2018).

Sin embargo, López-Coria y colaboradores (2016) encontraron que los exudados del hongo *T. asperellum* contienen cantidades mínimas de IAA por lo que el crecimiento mejorado del maíz puede deberse además a otras moléculas.

Teoría del crecimiento ácido: inducida por IAA y la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática

La expansión celular en las plantas se encuentra restringida por la presencia de la pared celular, la cual es lo suficientemente rígida para proveer soporte y protección, pero también es extensible, lo que permite la expansión celular, dependiendo de varios factores, entre ellos el contenido de agua que regula la presión de turgor¹, así como la presencia de hormonas que regulan el crecimiento diferencial de las células, ya sea activando la síntesis y la degradación de la pared celular o mediante enzimas que actúan regulando el crecimiento celular (Haruta *et al.*, 2015).

Una de las propuestas para el crecimiento de la célula es el cambio en la acidez extracelular, que ayuda al aflojamiento de la pared celular debido a la estimulación de proteínas como las expansinas, que promueven la relajación de la pared celular, permitiendo el crecimiento de la célula. Se ha sugerido que la acidificación depende de la presencia de las auxinas (Majda y Robert, 2018).

La principal enzima responsable de regular el pH extracelular es la ATPasa de protones de la membrana plasmática (ATPasa de H⁺ de la MP), la cual es una enzima que al hidrolizar ATP bombea protones al apoplasto (Figura 2). El peso molecular aproximado de la proteína es de 100 kDa y durante la catálisis forma un estado de transición covalente enzima-fosfato, por lo que está clasificada como una ATPasa tipo P (Fosforilada), y que puede ser inhibida por vanadato. La salida de cargas positivas inducida por la actividad de la ATPasa de H⁺ de MP produce un potencial de membrana negativo en el exterior, que puede exceder en algunos casos los -200 mV. Además, a medida que los protones se acumulan en el exterior

¹ Presión de turgor. Presión ejercida por el protoplasto contra la pared celular (Fernández y Johnston, 1986)

celular, el pH del apoplasto disminuye. El gradiente electroquímico producido por la enzima es la fuente de energía que facilita el transporte de nutrientes hacia la célula a través de canales o transportadores, que mueven de manera facilitada el ion adicional y pueden acoplar el movimiento de otro soluto a través de la membrana (Figura 2). Además, se relaciona a la enzima en otros procesos, tales como la osmotolerancia, la apertura y cierre de estomas, la regulación del pH intracelular y el crecimiento ácido (Palmgren, 2001).

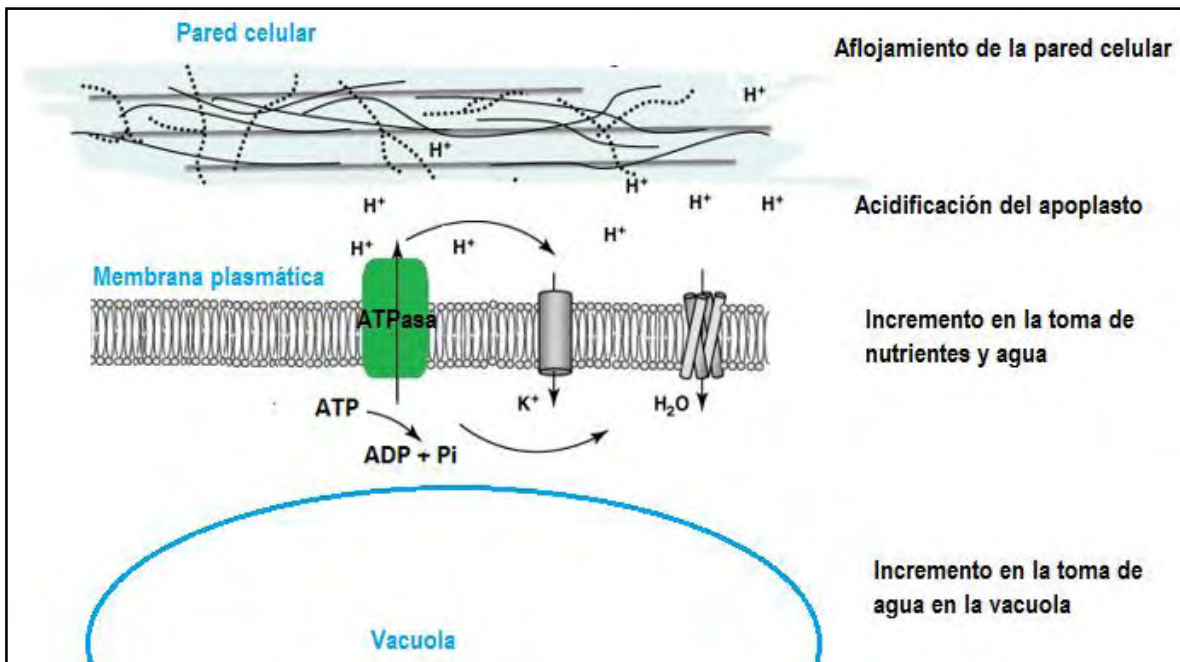


Figura 2. Función celular de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática. La actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática impacta en la regulación del pH del citoplasma, así como del apoplasto. Al acidificar el apoplasto promueve la activación de proteínas implicadas en la remodelación de la pared celular e induce su aflojamiento, requisito para la elongación celular. Además, el incremento en las cargas positivas externas puede inducir la apertura de canales, lo que facilita el transporte de iones o bien de otros solutos como azúcares o agua para nutrir a la célula. La entrada de agua aumenta la turgencia de la célula, el contenido de agua en las vacuolas puede ayudar a aumentar la presión de turgencia y favorecer el crecimiento celular en las plantas. Modificado de Tromas et al., 2010.

La elongación celular inducida por auxinas en órganos como el coleoptilo y la raíz se ha asociado a un incremento en el pH extracelular. Recientemente, se describió

que uno de los mecanismos por el cual las auxinas impactan en el pH extracelular es por la activación de la ATPasa de H⁺ de la MP. La isoforma 2 de la ATPasa de H⁺ de la MP de *Arabidopsis* (AHA) es fosforilada en varios aminoácidos en su extremo carboxilo-terminal, denominado dominio inhibitorio. Por ejemplo, la Thr⁹⁴⁷ de AHA2 activa a la enzima (Figura 3), residuo que es fosforilado ante la presencia de auxina. La fosforilación de ese residuo coincide con la unión de la proteína 14-3-3, quién fija a la ATPasa en la conformación más activa.

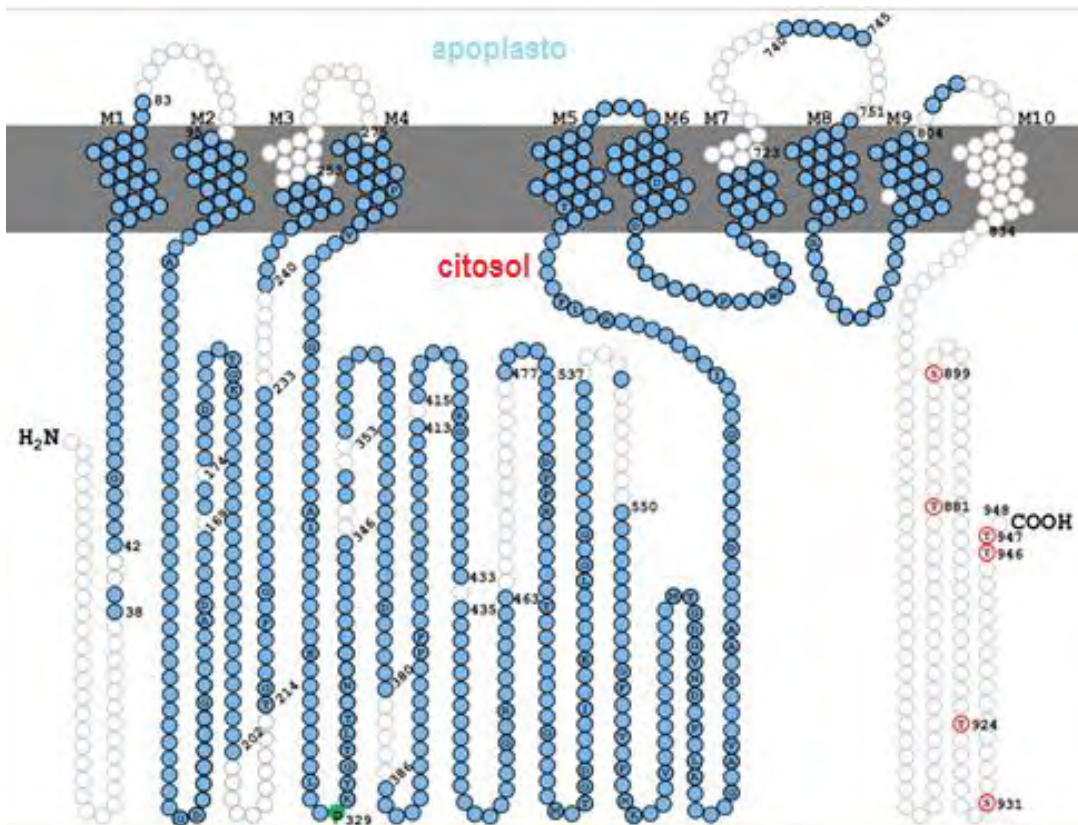


Figura 3. Caricatura de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (AHA2).

Enzima que presenta 10 cruces transmembranales señalados como M1 a M10. Los residuos de aminoácidos marcados en azul son aquellos que están más conservados en todas las ATPasas de plantas. Como se observa la región del carboxilo terminal es una región muy variable, además en ella se concentran la mayor parte de los residuos que son fosforilados en la enzima, marcados como S de serina y T de treonina. En verde el aspártico y marcado con una P el residuo 329 que se encuentra transitoriamente fosforilado durante el ciclo catalítico. Tomada de Falhof et al., 2016.

Uno de los mecanismos por los cuales las auxinas activan a la ATPasa de H⁺ de MP es a través de la activación de las proteínas SAUR (Small auxin-up RNA),

estas proteínas son codificadas por una familia más grande de genes de respuesta temprana a auxinas en plantas vasculares, además está implicada en la regulación de múltiples procesos biológicos (Li, 2017). Velásquez y colaboradores observaron en 2016 que SAUR19 interactúa con la proteína fosfatasa 2CD1 (PP2C-D1) inhibiéndola, lo que permite que la ATPasa se mantenga fosforilada y su actividad sea mayor (Velásquez et al., 2016). Las plantas que expresan a la proteína SAUR19 presentan una elongación incrementada, pH apoplástico reducido, hipersensibilidad a sequía por una regulación inapropiada de las células guarda y una expresión constitutiva de los genes para la defensa de patógenos (Spartz et al., 2014), todos estos procesos en los cuales interviene la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

Regulación de la ATPasa de H⁺ durante la interacción de la planta con microorganismos.

Debido a las múltiples implicaciones fisiológicas de la actividad de las ATPasas de H⁺ de la MP y a su contribución a los eventos de señalización en respuesta a diversos estímulos ambientales, la enzima es sujeta a una regulación en varios niveles. Una combinación de expresión génica y análisis genéticos ha revelado que múltiples AHA se expresan en muchos tejidos y órganos, sin embargo, hay diferencias en los niveles de expresión y la especificidad tisular de las isoformas de AHA individuales. Es de importancia para el presente trabajo señalar que la enzima está sujeta a modificaciones post-traduccionales y que el cambio en el entorno lipídico o la presencia de moléculas que afectan su conformación pueden llevarla a cambios en su actividad (Falhof et al., 2016; Wielandt et al., 2015).

A nivel de proteína como se mencionó anteriormente la enzima tiene un dominio C-terminal de aproximadamente de 100 aminoácidos que es inhibitorio, el cual es sujeto de ser fosforilado en los residuos de Ser y Thr (Figura 3). En plántulas de *Arabidopsis* la actividad de AHA2 está regulada por la fosforilación post-traduccionales de Thr⁸⁸¹ o Thr⁹⁴⁷ que es inducida por un péptido estimulador de crecimiento PSY1 aumentando la actividad en AHA2. La fosforilación Ser⁸⁹⁹ o

Ser⁹³¹ es inducida por un péptido inhibidor del crecimiento, disminuyendo la actividad (Figura 4) (Haruta et al, 2015). La sobreexpresión de genes SAUR19 y otros SAUR adicionales, promueven la elongación del hipocotilo y confiere varios fenotipos de expansión celular.

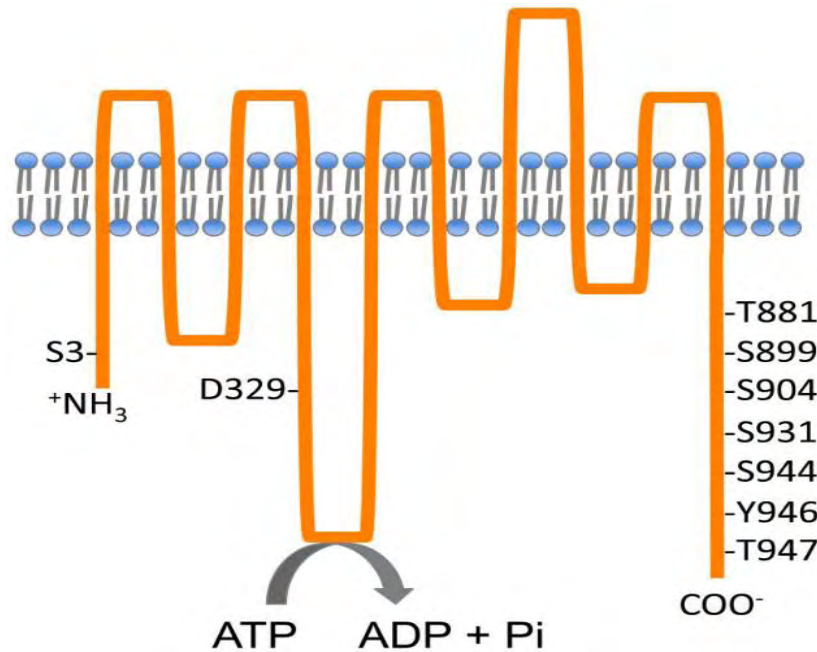


Figura 4. Caricatura de los residuos fosforilados en AHA2 por ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (AHA2). Agrupación de los sitios de fosforilación en el dominio R (regulador o inhibitorio), donde la enzima AHA2 puede ser sujeta a fosforilación en 8 residuos del C-terminal. Tomado de Haruta et al., 2015.

Maíz

Zea mays es uno de los principales cereales cultivados en el mundo, debido a su uso como alimento en humanos y animales, además de ser empleado como materia prima de diversos materiales de uso farmacéutico e incluso como combustible.

Surgió de una sola domesticación en el sur de México hace unos 9,000 años. Diversos análisis indican que los tipos de maíz más antiguos que sobreviven son

los de las tierras altas de México y se extienden a lo largo de América (Matsuoka et al., 2002). La diversidad de cultivos incluye las variaciones taxonómicas, genéticas, morfológicas, agronómicas y de rasgos de uso. Los tipos de maíz mexicano comúnmente se agrupan en “razas”. Aunque la raza no es una categoría taxonómica formal, se la considera una unidad útil para estudiar la distribución de la diversidad del maíz en México (Orozco et al, 2016). Por ejemplo, el maíz raza Chalqueño, empleado en este estudio, es una de las razas más productivas. Se caracteriza por sus plantas de porte alto, mazorcas grandes y cónicas con alto número de granos por hilera. Presenta alto vigor de germinación y emergencia, ciclo largo y resistencia a la sequía en etapas medias de crecimiento (CONABIO 2010). La adaptación de esta raza prevalece entre los 1800 y 2300 m de altura a nivel del mar y es un híbrido entre la raza cónico y tuxpeño (Wellhausen et al., 1951). Domina en suelos volcánicos que retienen humedad de las precipitaciones invernales, y en terrenos con riego. También es fundamental para siembras en suelos de humedad en lugares altos de Durango, Zacatecas y en la Mixteca Oaxaqueña, (CONABIO 2010).

Si comparamos al teocinte el ancestro más cercano al actual maíz, encontraremos diferencias muy marcadas: en teocinte se desarrolla una espiga con una hilera de 10 a 12 granos, mientras que en las plantas de maíz se encuentran de 4 a 6 mazorcas cada una con 10 a 12 hileras, 1000 semillas por planta (du Plessis, 2003).

A pesar de las mejoras inducidas por la domesticación, la producción al menos en México es deficiente, ya que se tienen que importar granos, por lo que hay gran interés en manipular a las plantas para tener una alta productividad agrícola. Una estrategia que sería efectiva y evitaría el uso de material genéticamente modificado es la de utilizar microorganismos benéficos para su desarrollo o sus metabolitos, ya sea como biocontrol de patógenos o, en su caso, como promotores del crecimiento.

JUSTIFICACIÓN

Se ha planteado que los efectos benéficos del género *Trichoderma* en el crecimiento de una gran variedad de plantas se debe a la síntesis de hormonas como las auxinas, en particular IAA (Cornejo et al., 2009). Sin embargo, los exudados de *T. asperellum* contienen concentraciones bajas de IAA (0.3 μM) e inducen el crecimiento de la planta, y sobre todo modifican la arquitectura radicular (López-Coria et al., 2016).

Adicionalmente, las raíces infectadas con *T. asperellum* inducen una disminución acelerada del pH extracelular y sus fracciones membranales o microsomales (FM) presentan una ATPasa de H^+ de la MP más activa, sin embargo, la cantidad de proteína no cambia, sugiriendo una modificación post-traducciona de la enzima por parte de algunos metabolitos del hongo. El exudado de *T. asperellum* activa a la enzima presente en las FM de raíces y coleoptilos de plantas no expuestas al hongo, por lo que las moléculas presentes en los exudados están influyendo directamente sobre la actividad de la enzima. No obstante, los exudados del hongo y las auxinas no producen el mismo efecto de activación sobre la enzima (López-Coria et al., 2016), por lo que se sugiere la presencia de otras moléculas en los exudados del hongo además de las auxinas, participan en la activación de la enzima y posiblemente en la promoción del crecimiento de maíz.

Por lo anterior, la búsqueda de los compuestos en el exudado del hongo puede llevar a encontrar metabolitos que promuevan la actividad de la ATPasa de H^+ de MP o que estén implicados en inducir el crecimiento de la planta.

HIPÓTESIS

Debido a la diversidad de metabolitos secundarios promotores del crecimiento en diferentes especies del género *Trichoderma*, se espera que del fraccionamiento del exudado del hongo *Trichoderma asperellum*, se encontrarán una o más fracciones que contengan el o los metabolitos que activen la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática y promuevan el crecimiento de maíz.

OBJETIVO GENERAL

Identificar la fracción del exudado de *Trichoderma asperellum* que promueve la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática y el crecimiento del maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. A partir del exudado de *T. asperellum*, obtener las fracciones con disolventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y agua).
2. Determinar el efecto del exudado de *T. asperellum* y de las diferentes fracciones obtenidas sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP.
3. Evaluar el efecto del exudado de *T. asperellum* así como de las fracciones arriba mencionadas sobre el crecimiento de plantas de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir los objetivos del trabajo se cultivó al hongo *T. asperellum* para obtener el exudado y este se fraccionó con solventes de diferentes polaridades. Posteriormente, se probó el efecto de las fracciones tanto en la actividad de la ATPasa de H⁺ de MP como en el crecimiento de las plantas de maíz como se muestra en el resumen del diseño experimental seguido en este trabajo (Figura 5).

1. Obtención del exudado del hongo y sus fracciones

- Cultivo de *T. asperellum* en placa con medio PDA
- Obtención de conidios y su cuantificación
- Cultivo de conidios en medio líquido
- Obtención del exudado
- Fraccionamiento del exudado mediante solventes con diferentes polaridades
- Análisis de los componentes de los exudados del hongo

2. Obtención del material vegetal

- Selección de semillas de maíz Chalqueño y corte pedicelo
- Desinfección de semillas con hipoclorito de sodio al 2 %
- Germinación en papel filtro húmedo por 72 h

3. Efecto sobre la actividad de la ATPasa H⁺ de la MP

- Obtención de las fracciones microsomales de raíces y coleoptilos.
- Determinación de proteína por el método de Bradford.
- Determinación de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP en presencia o ausencia del exudado o sus fracciones

4. Efecto promotor del crecimiento

- Germinación de las semillas en Agar al 1% por 48 y 72 h:
- **A.** Semillas sin tratamiento (Control)
- **B.** Semillas incubadas por 1.5 h con conidios de *Trichoderma* ("bioprimering")
- **C.** Semillas incubadas por 1.5 h el exudado del hongo o las fracciones o 6PP
- **D.** Semillas sin tratamiento pero germinadas en agar suplementado con exudado o las fracciones del exudado del hongo

Figura 5. Diseño experimental. Resumen del diseño experimental seguido en este trabajo. La descripción de cada punto se muestra en el siguiente texto.

Obtención del extracto extracelular total de *Trichoderma asperellum*.

Se inocularon conidios de *T. asperellum* cepa HK703, obtenidos del experimento de (López-Coria, 2016), en 4 cajas Petri con agar PDA, después de 2 semanas a temperatura ambiente se realizó la extracción de conidios (Guzmán-Chávez, 2013), la concentración se determinó con un recuento microscópico en una cámara de Neubauer. Para obtener el extracto extracelular del hongo, se inocularon 10,000 conidios por matraz en 4 matraces de 500 mL con 200 mL de medio líquido PDB (24g/L) a 29 °C por 3 días en oscuridad y agitación constante (100rpm). Posteriormente, los cultivos se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (López-Coria et al., 2016), sin centrifugar. Al sobrenadante obtenido se le denominó **Exudado** y se congeló a -70 °C para después ser fraccionado o liofilizado para estudios posteriores.

Fraccionamiento del exudado de *Trichoderma asperellum*.

Para realizar el fraccionamiento, se tomó el volumen total del exudado (1265 mL) sin liofilizar. Se utilizaron dos disolventes; hexano que tiene una polaridad baja y acetato de etilo que es un disolvente con polaridad media. Lo que permitió obtener tres fracciones según el siguiente procedimiento:

Fracción de Hexano: En un embudo de separación se colocó la mitad del volumen total del exudado (632.5 mL) y un volumen igual de hexano (BDH® VWR Analytical), se agitó por inversión y se tomó la fracción de hexano. Se realizó el mismo procedimiento con el volumen residual dos veces más siempre usando una relación 1:1 del volumen del exudado residual respecto al del disolvente. Se volvió a repetir el experimento con la otra mitad del volumen total del exudado y al final todas las fracciones de hexano se mezclaron y se evaporaron en un rotavapor Heidolph a 60 °C y 60 rpm. La fracción concentrada se resuspendió con 1 mL de hexano puro (grado analítico) y se extrajo del matraz bola con una pipeta Pasteur, para después transferirla a un frasco vial de vidrio. Este concentrado se dejó evaporar y finalmente se congeló a -70 °C.

Fracción Acetato de etilo: Para obtener la fracción de acetato de etilo se repitió el procedimiento antes descrito sustituyendo al disolvente por acetato de etilo (BDH® VWR Analytical). El concentrado final se congeló a -70 °C.

Fracción Acuosa: Después de los dos fraccionamientos con los disolventes se obtuvo un residuo acuoso, que se liofilizó (debido al volumen hubo que hacerlo durante 8 días) hasta obtener un compuesto color blanco en polvo. El cual se congeló a -70 °C.

Obtención del material vegetal y determinación del efecto promotor del crecimiento

Se cortó el pedicelo a un lote de 40 semillas de maíz Chalqueño, después se desinfectaron en una disolución al 2 % de Cloralex® comercial en agua, por 2 min. Se lavaron 3 veces con abundante agua estéril hasta que el olor al hipoclorito se dejó de percibir. Posteriormente, se dividieron las semillas en cuatro lotes:

1) Lote control. Semillas que no pasaron por ningún tratamiento y fueron directamente sembradas en 1 % de Agar (lote de 10 semillas) germinadas por 72 h a 29 °C.

2) Lote biopriming. Se colocaron 10 semillas en un matraz que contenía 20 mL de agua y 10,000 conidios de *T. asperellum* por semilla, se colocaron en agitación durante 60 min. Después fueron germinadas por 72 h a 29 °C en 1 % de Agar.

3) Lote remojo de semillas en exudado de *T. asperellum*. Se colocaron 10 semillas de maíz Chalqueño en un matraz que contenía 80 µL de exudado/ mL de agua, se colocaron en agitación durante 60 min. Después fueron germinadas por 72 h a 29 °C en 1 % de Agar.

4) Lote contacto en agar, en donde la germinación de semillas ocurrió sobre el exudado de *T. asperellum* o sobre las fracciones del exudado. Se colocaron 10 semillas de maíz Chalqueño en 5 puntos por caja Petri, sobre una gota de 8 µL de exudado de *T. asperellum*. En el caso de la determinación del efecto de las fracciones de hexano, acetato de etilo o acuosa, 15 semillas fueron colocadas en

tres cajas Petri (triplicado) en las que se colocaron las semillas sobre 8 μ L de cada una de las fracciones. Después se pusieron a germinar durante 72 h a 29 °C en 1% Agar.

Fracciones microsomales de raíz y coleoptilo

Se separaron las raíces y los coleoptilos de plántulas de 72 h de germinación, provenientes de semillas sin ningún tratamiento (Control) y se obtuvieron las fracciones microsomales (FM) con el método reportado por Sánchez-Nieto et al., 1998 y López-Coria et al., 2016. Para la determinación de actividad y cantidad de la ATPasa se obtuvieron las FM, donde se pulverizó el tejido en N₂ líquido y se homogeneizó con un homogeneizador Tissue Tearor™ en el amortiguador de homogeneización (50 mM HEPES/BTP pH 7.8; 250 mM sorbitol; 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1.5 mM benzamidina; 1 mM KCl, 4 mM DTT, 40 μ g/mL de coctel de inhibidores de proteasas Roche; estos dos últimos reactivos se añadieron justo antes de homogeneizar el tejido). El homogeneizado se centrifugó a 5,000 xg por 10 min para eliminar los residuos celulares y los núcleos, después el sobrenadante se centrifugó a 13,000 xg por 10 min para eliminar los cloroplastos y mitocondrias, y por último se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 100,000 xg por 60 min para obtener la FM. El botón se resuspendió en 150 μ L del amortiguador de homogeneización adicionado con 10 % de glicerol (Sánchez-Nieto et al., 1998). Las fracciones se almacenaron hasta su uso a -70 °C.

Determinación de proteínas.

Se determinó la concentración de proteínas de las fracciones microsomales mediante el método de Bradford (BIORAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se empleó IgG para realizar la curva estándar (Figura 6), para la determinación de la concentración de proteínas (López-Coria et al., 2016)

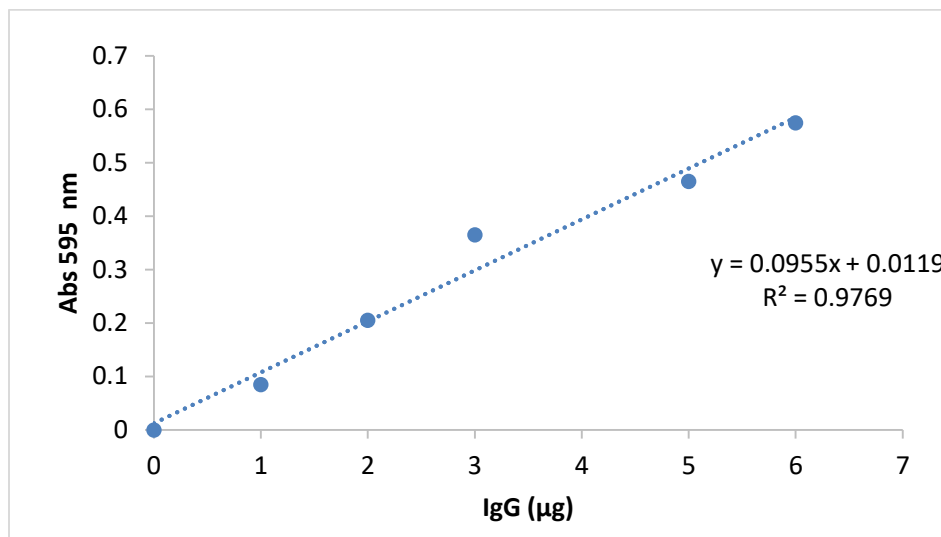


Figura 6. Curva patrón de determinación de proteínas por el método de Bradford.
Se muestra una gráfica representativa, ya que en cada que se obtenía proteína se realizaba una curva nueva.

Hidrólisis de ATP por la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática

Para determinar la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP en las fracciones microsomales se midió la actividad de hidrólisis de ATP. El medio de reacción contuvo 150 µL de sacarosa 250 mM, 50 mM MOPS/BTP pH 6.5, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 7 µM CCCP y 0.015 % de Brij 58, de acuerdo con el procedimiento descrito por López-Coria et al. (2016). Adicionalmente, debido a que la FM contiene además de la ATPasa de la MP otras enzimas que hidrolizan al ATP, se utilizaron inhibidores para estas enzimas, de tal manera que el diseño experimental incluyó los siguientes pasos como se muestran en el siguiente procedimiento y en la Tabla 4 (Anexo B) y cada ensayo se realizó por triplicado:

- a) Se empleó medio de hidrólisis sin inhibidores para obtener la actividad total de hidrólisis de ATP.

- b) Se empleó medio de hidrólisis con el inhibidor de la ATPasa de la MP, 150 μM Na_3VO_4 . Para conocer la actividad de la ATPasa de MP se resta lo que quedo de actividad a la actividad total.
- c) Otra forma de obtener la actividad de ATPasa de la MP fue añadir una mezcla de inhibidores 50 mM KNO_3 , 2 mM NaN_3 , 2mM Na_2MoO_4 , los cuales inhiben a la ATPasa vacuolar, a la ATPasa mitocondrial y a la fosfatasa ácida, respectivamente. De esta manera la actividad residual es la actividad de la ATPasa en la MP.
- d) El blanco contenía medio de reacción, pero con la enzima desnaturalizada con SDS para registrar la hidrólisis química. Adicionalmente, el medio de reacción de hidrólisis contenía etanol cuando se midió la actividad de la enzima en presencia de 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP), dimetilformamida (DMF) cuando se probó la fracción de hexano y dimesulfóxido (DMSO) cuando se determinó el efecto del extracto de acetato de etilo, esto se realizó con la finalidad de descartar el efecto de los disolventes sobre la actividad de la ATPasa de la MP. El exudado de *T. asperellum*, las fracciones de acetato de etilo, de hexano, la acuosa y el compuesto 6PP se añadieron al medio de hidrólisis previo a la adición de 10 μg de proteína, que fueron usados para dar inicio a la reacción de hidrólisis de ATP.

La distribución y cantidades que se agregaron a cada tubo se encuentran en el Anexo B. La reacción de hidrólisis se incubó a 30 °C por 20 min. La liberación del fosfato se midió por la formación del complejo fosfomolibdato (González-Romo et al., 1992). Una curva patrón típica de la determinación de fosfatos se muestra en la Figura 7.

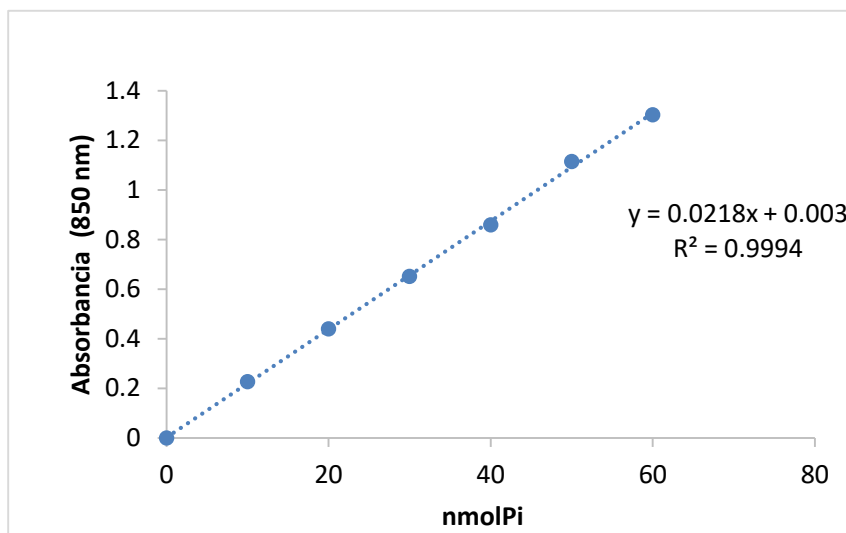
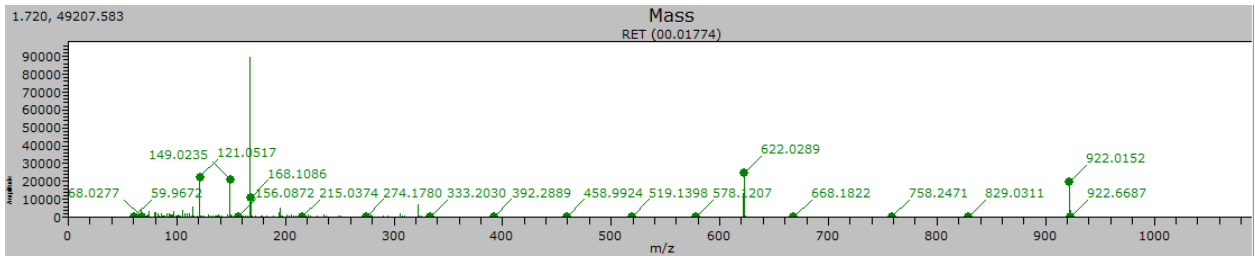


Figura 7. Curva patrón de fosfatos. Determinación por el método de González-Romo et al., 1992. Se muestra una gráfica representativa, ya que en cada experimento se realizaba una curva nueva.

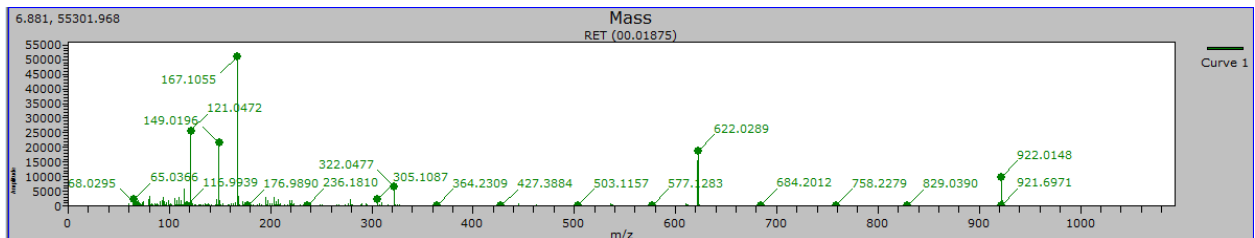
Identificación de componentes del exudado de *T. asperellum* y sus fracciones.

La identificación de los compuestos presentes en el exudado de *T. asperellum*, la fracción de acetato de etilo (EtOAc), la fracción de hexano, la fracción acuosa y el compuesto 6PP se realizó mediante DSA-HR-APCI-MS (in Direct Sample Analysis- High Resolution- Atmospheric Pressure Chemical Ionization- Mass spectrometry).

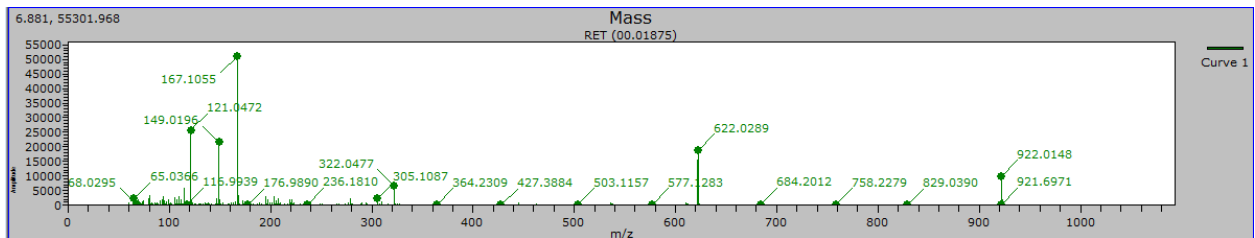
Aproximadamente 2 mg de cada una de las fracciones se disolvieron con 200 μ L de una mezcla de MeEOH-H₂O (70:30). De estas soluciones se tomaron 10 μ L y se colocaron en una malla de acero inoxidable de aproximadamente 8 mm de diámetro y posteriormente se introdujeron en el aditamento Direct Sample Analysis TM (DSA TM) (PerkinElmer, Waltham, MA). Las muestras en la malla se ionizaron desde la pantalla con el sistema DSA TM en un equipo AxION TOF 2, PerkinElmer. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo trampa de iones positivos para aumentar la sensibilidad a una adquisición de cinco espectros/segundo. Los resultados fueron procesados mediante el software AxION II TOF MS Driver 6.2. (Figura 8).



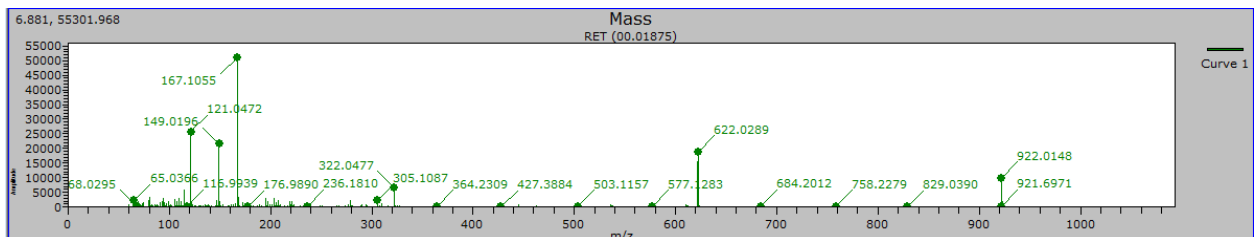
a) Cromatograma del exudado de *T. asperellum*



b) Cromatograma de la fracción de hexano



c) Cromatograma de la fracción de acetato de etilo



d) Cromatograma de la fracción acuosa

Figura 8. Perfiles de pico de las masas de los compuestos en las fracciones del exudado, las fracciones y un compuesto puro que produce el género *Trichoderma*.

RESULTADOS

El extracto extracelular de *T. asperellum* activa a la ATPasa de H⁺ de la MP

En el trabajo anterior realizado en el laboratorio se demostró que los exudados de *T. asperellum* incrementan la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP en las FM de raíces y coleoptilos de maíz (López-Coria et al., 2016). El objetivo del experimento (Tabla 2), era corroborar los resultados obtenidos por López-Coria, antes de realizar el fraccionamiento de los exudados del hongo. Se midió la actividad de la ATPasa de H⁺ de MP empleando dos estrategias de inhibidores distintas, vanadato que es un inhibidor específico de la ATPasa de H⁺ y una mezcla de inhibidores (Na₂MoO₄, NaN₃, KNO₃), para descartar compuestos que proveen de fosfatos al medio, inhibiendo la fosfatasa ácida, ATPasa mitocondrial y ATPasa vacuolar, obteniendo así la actividad de la ATPasa de H⁺ de MP.

Tabla 2. Efecto del exudado de *T. asperellum* en la actividad de ATPasa de protones de la MP en las fracciones microsomales de coleoptilos y raíces de maíz. Para determinar el efecto del exudado de *T. asperellum* sobre la actividad de ATPasa de la MP se añadieron 8 µL del exudado de *T. asperellum* al medio de reacción.

Fracción Microsomal	Forma de medición de la actividad de la ATPasa de MP	Control Actividad de ATPasa (ηmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	+Exudado <i>T. asperellum</i> Actividad de ATPasa (ηmol min ⁻¹ mg ⁻¹)
Coleoptilo	+Vanadato ¹	9.98 ± 0.58	8.10 ± 0.88
Coleoptilo	+ Mezcla Inhibidores ²	10.64 ± 0.88	13.21 ± 0.68
Raíz	+Vanadato ¹	20.72 ± 0.28	102.40 ± 0.53
Raíz	+ Mezcla de inhibidores ²	19.44 ± 0.55	87.24 ± 0.55

¹Se midió la actividad de hidrólisis de ATP total de la fracción y se le restó la actividad que quedó cuando se midió actividad en presencia de Na₃VO₄.

²Se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de los inhibidores NaN₃, Na₂MoO₄, KNO₃. La actividad residual es la de la ATPasa de protones de la MP. *Las desviaciones de los resultados corresponden al promedio de tres réplicas realizadas.

Como se observa en la Tabla 2, tanto la actividad de ATPasa de H⁺ de la FM de coleoptilos y raíces aumentaron con la presencia del exudado del hongo, lo que no se logra observar cuando se utiliza vanadato sobre las fracciones microsomales de coleoptilo. Adicionalmente, las FM de las raíces se ven más afectadas, aumentando cerca de 5 veces más la actividad en presencia del exudado de *T. asperellum*, lo anterior confirma el reporte de López-Coria *et al.* (2016).

Además, se observó que la actividad de ATPasa de H⁺ de la MP se puede determinar tanto usando el inhibidor vanadato, quien inhibe específicamente a la enzima, como con la mezcla de inhibidores de las otras enzimas que hidrolizan ATP. Aunque hay ligeras diferencias entre ambos valores.

Basados en los resultados observados (Tabla 2) en los siguientes experimentos sólo se usaron las fracciones microsomales de las raíces por el incremento notable de la actividad en comparación con la FM de coleoptilos, empleando como estrategia para la determinación de actividad de ATPasa de H⁺ de MP el uso de la mezcla de inhibidores.

Efecto de las fracciones de hexano, acetato de etilo y acuosa en la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP

Para determinar las posibles moléculas que se encuentran en el exudado de *T. asperellum* que afectan la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP, se realizó el fraccionamiento del exudado, obteniendo tres fracciones, usando disolventes de diferente polaridad: Hexano, acetato de etilo y agua.

En la medición del porcentaje de la actividad de hidrólisis total de ATP y de la ATPasa de H⁺ de MP se tomó en cuenta al valor del control (sin inhibidor) como el 100 %, comparando los porcentajes obtenidos frente a este valor, en el análisis estadístico se asignaron letras para representar si existía diferencia significativa entre los porcentajes, partiendo de que (a) es el valor máximo en cada gráfico y toda letra diferente de a es que es significativamente distinto (Figuras 9 a 11 y 13).

Al medir el efecto de la fracción de hexano, se observó que inhibió cerca del 60 % la actividad total de hidrólisis de ATP a todas las concentraciones probadas (Figura 9A). El análisis estadístico de estos datos se realizó a partir de una anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$ entre el control y los tratamientos, sin embargo no hay una diferencia significativa entre las concentraciones usadas. Además, a casi todas las concentraciones probadas de la fracción de hexano se incrementó la actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H^+ de la MP hasta en un 56 %, siendo estadísticamente significativo este aumento en las concentraciones de 0.25, 1, y 5 μg . No obstante a la concentración de 0.75 μg esta disminución no fue estadísticamente significativa con respecto al control. Los resultados sugieren que una o más moléculas presentes en esta fracción pueden causar el efecto de aumento en la actividad de la enzima y al parecer es o son más específicos para esta, considerando que no se ve aumentada la actividad total de hidrólisis de ATP sino, inhibida.

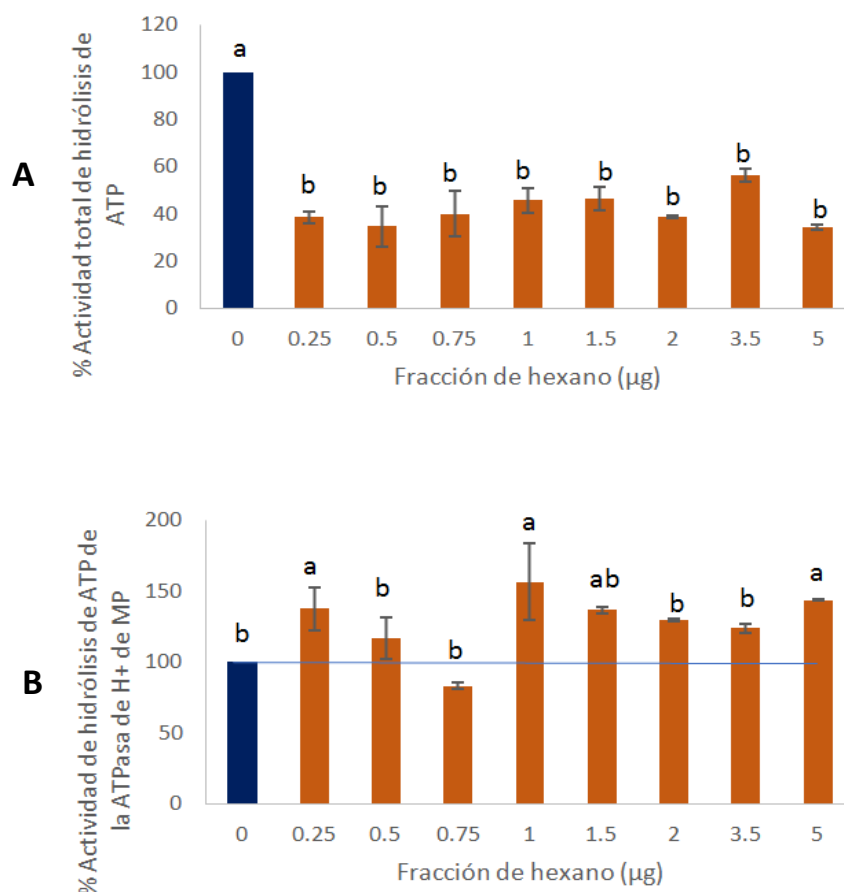


Figura 9. Efecto de la fracción de hexano del exudado de *T. asperellum* sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal. A. Actividad total de hidrólisis de ATP, **B.** Actividad de ATPasa de la MP, se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP excepto el de la ATPasa de total. Se muestran los porcentajes de actividad respecto al control sin la fracción hexánica. Los resultados son el promedio de tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una.

*La concentración está basada en µg de la fracción reconstituida en 1 mL de disolución y el control no contiene fracción hexánica (0) y representa el 100 % de la actividad sin fracción. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

La fracción de acetato de etilo obtenida del exudado de *T. asperellum* inhibió la actividad total de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal a bajas concentraciones (desde 0.25 hasta 2 µg), aunque solamente a 0.5 µg fue estadísticamente diferente al control, (Figura 10 A). Así mismo, la fracción de

acetato de etilo activó la hidrólisis total de ATP a 3.5 μg , pero tampoco fue significativamente diferente (Figura 10 A).

La actividad de hidrólisis de ATP de la ATPasa de H^+ de la MP aumentó a bajas concentraciones de la fracción de acetato de etilo (0.75 y 1 μg , en un 25 y 12 %, respectivamente), aunque no fue estadísticamente significativo, mientras que a concentraciones mayores de la fracción (1.5 μg), sí se inhibió, excepto a 3.5 μg (Figura 10 B). Estos resultados indican que posiblemente la o las moléculas que activan a la enzima se encuentren en menor proporción en este extracto que en el de hexano.

Por otra parte, la fracción acuosa del exudado de *T. asperellum* incrementó la actividad total de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal en todas las cantidades probadas, aunque solo fue significativamente diferente a 1 μg de la fracción acuosa (Figura 11 A). Mientras que la ATPasa de H^+ de la MP fue activada con 0.5, 0.75 y 1 μg en un 16, 19 y 10 % respectivamente con la fracción acuosa, este aumento es significativamente diferente al control. Mientras que a concentraciones mayores se produce una inhibición, desde 1.5 hasta 5 μg (Figura 11B).

En resumen, de las tres fracciones del exudado de *T. asperellum* sólo las fracciones de hexano y acuosa tienen un efecto activador sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, sin embargo, no a todas las cantidades probadas. La fracción de hexano es la que tiene una mayor activación alcanzando una activación de un 56 % con 1 μg de fracción añadido al ensayo de actividad, por lo que es posible que contenga varios compuestos con la capacidad de incidir sobre la actividad de la enzima, o bien alguno que se encuentre en mayor proporción. Lo mismo se puede pensar con la fracción acuosa, aunque, como en la fracción de acetato de etilo puede contener moléculas que afectan

negativamente la actividad de la enzima por la disminución de la actividad de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática a ciertas cantidades.

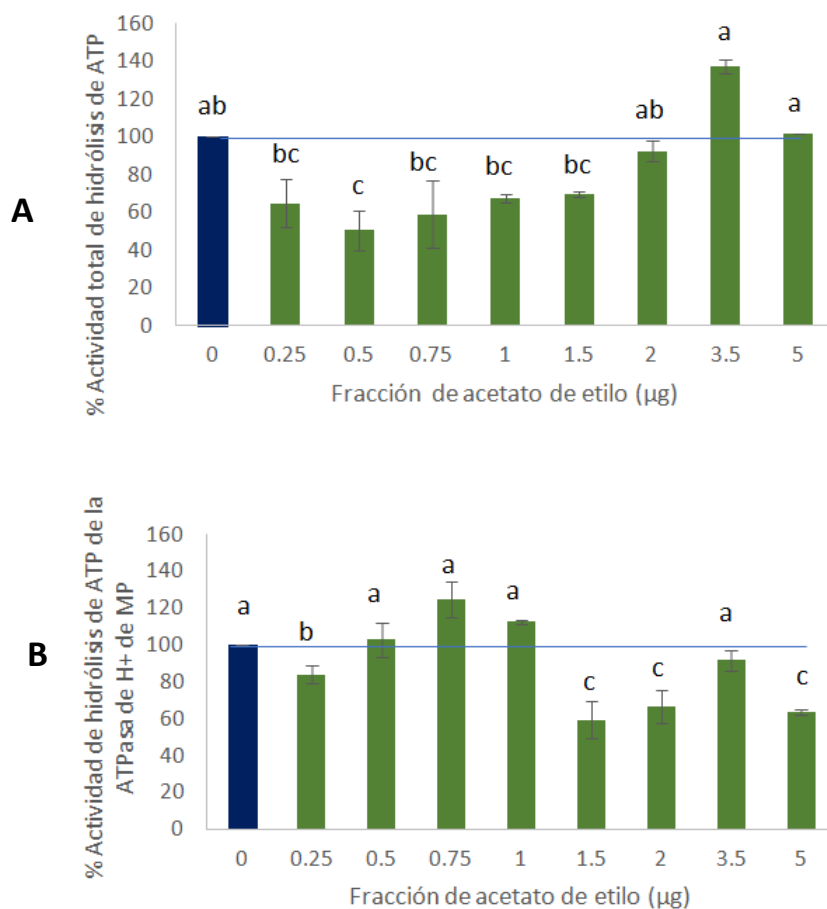


Figura 10. Efecto de la fracción acetato de etilo del exudado de *T. asperellum* sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal. A. Actividad total de hidrólisis de ATP, **B.** Actividad de ATPasa de la MP, se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP excepto el de la ATPasa de la MP. Se muestran los porcentajes de actividad respecto al control (sin la fracción de acetato de etilo). Los resultados son el promedio de tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una. *La concentración está basada en μg de la fracción reconstituida en 1 mL de disolución y el control no contiene fracción de acetato de etilo (0) y representa el 100 % de la actividad sin fracción. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

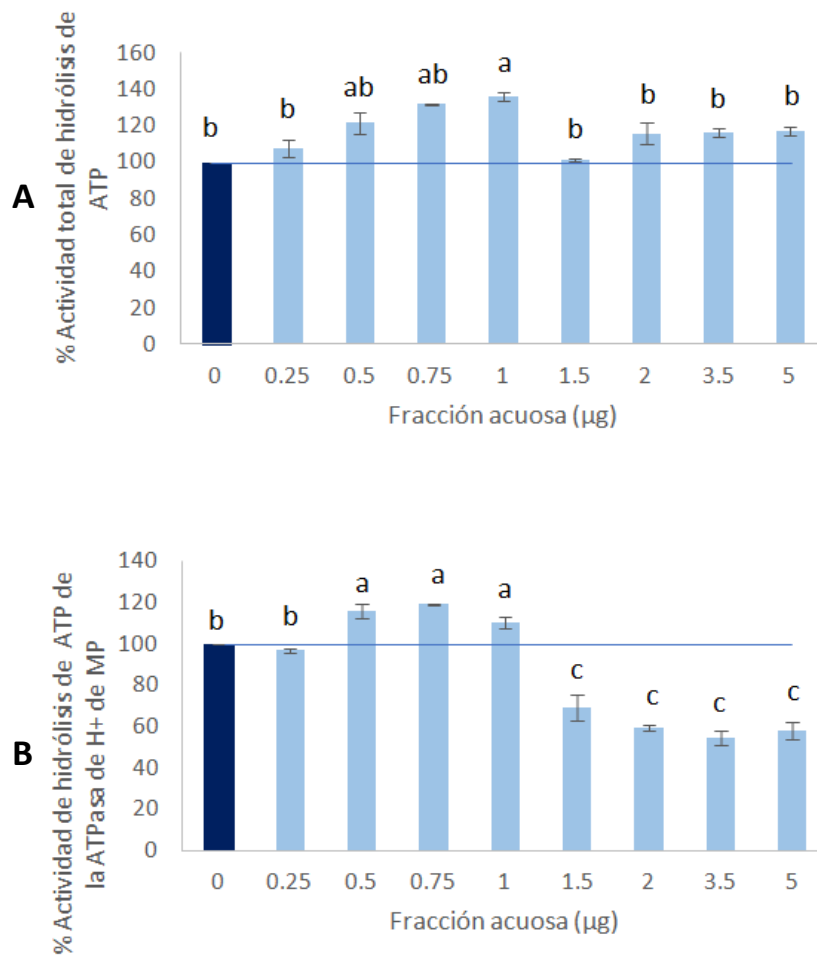


Figura 11. Efecto de la fracción acuosa del exudado de *T. asperellum* sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal. A. Actividad total de hidrólisis de ATP, **B.** Actividad de ATPasa de la MP, se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP excepto el de la ATPasa de la MP. Se muestran los porcentajes de actividad respecto al control (sin la fracción acuosa). Los resultados son el promedio de tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una. *La concentración está basada en µg de la fracción reconstituida en 1 mL de disolución y el control no contiene fracción acuosa (0) y representa el 100 % de la actividad sin fracción. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

La 6-pentil-2H-piran-2-ona es un metabolito presente en los exudados del hongo y afecta la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP.

Considerando que el género *Trichoderma* sintetiza varios metabolitos que se han propuesto como promotores del crecimiento vegetal y que estos podrían encontrarse más abundantemente en alguna de las fracciones del exudado de *T. asperellum*, se realizó un análisis de DSA-HR-APCI-MS, con el cual se lograron encontrar una gran variedad de compuestos, de ellos se identificaron 5 que estaban en mayor proporción (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos mayoritarios identificados en el exudado y las fracciones de *T. asperellum*.

Molécula	Aplicación	Presencia de los compuestos en las fracciones			
		Exudado	Hexano	Acetato de etilo	Acuosa
6-Pentil-2H-piran-2-ona	Antifúngico, promotor del crecimiento vegetal, aroma de coco	SI	SI	SI	SI
Coningininas (A y C)	Antifúngico, regulador del crecimiento vegetal	-	SI	SI	-
Harzianolida	Antifúngico, regulador del crecimiento vegetal	-	-	SI	-
Paquibasin	Actividad antimicrobiana	-	SI	-	-
Viridiol	Herbicida, anti-envejecimiento	-	-	SI	SI

*Los valores del peso molecular de las moléculas promotoras, se obtuvieron con base en los resultados obtenidos en el espectrómetro de masas. El peso considera los valores [M+H]⁺ que es la relación positiva del ion resultante más una unidad.

Como se observa en la tabla, uno de los compuestos presentes en todas las fracciones fue la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP), el cual se ha propuesto como promotor de crecimiento vegetal a ciertas concentraciones, (Keswani et al., 2014) (Figura 12 y Anexo A), por lo que es interesante que se encuentre en las tres

fracciones (Tabla 3). Lo anterior puede deberse a que la molécula tiene una polaridad anfipática o mixta, esto le permite disociarse tanto en un sistema acuoso como uno de acetato de etilo y hexano.

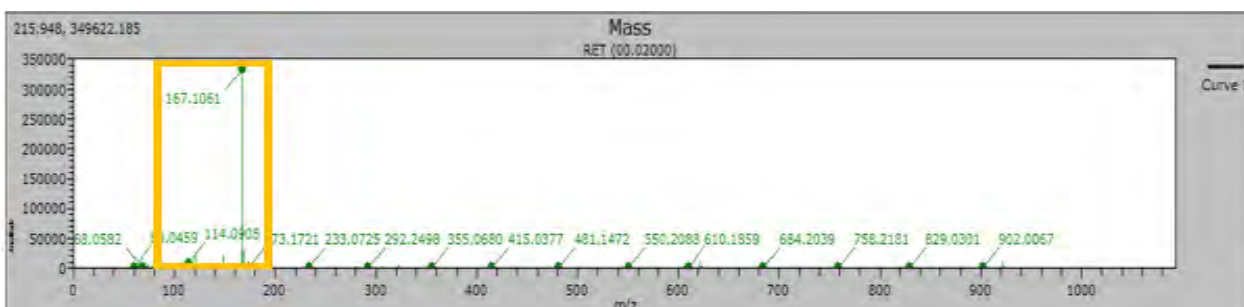
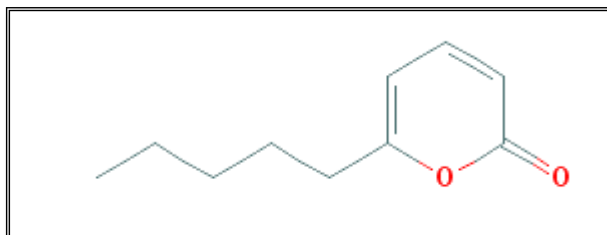


Figura 12. Identificación de 6-pentil-2H-piran-2-ona. A) La estructura de 6-Pentil-2H-piran-2-one fue tomado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>
B) Cromatograma del compuesto 6PP con MW: 166.22 g/mol + 1

T. atroviridae así como otros miembros del género *Trichoderma* producen 6PP. Este metabolito volátil se ha encontrado que promueve el crecimiento vegetal a ciertas concentraciones, aunque la inhibe a otras, además de estar involucrado en los cambios morfológicos de la raíz (Garnica-Vergara et al., 2016). Es por esto por lo que se probó su efecto sobre la actividad de ATPasa (Figura 13). La actividad total de hidrólisis de ATP de la fracción microsomal aumentó significativamente en presencia de 6PP a una concentración de 100 μ M (Figura 13A), mientras que el efecto de 6PP sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de la MP es esencialmente inhibitorio a concentraciones mayores de 100 μ M y a 16.66 μ M (Figura 13B).

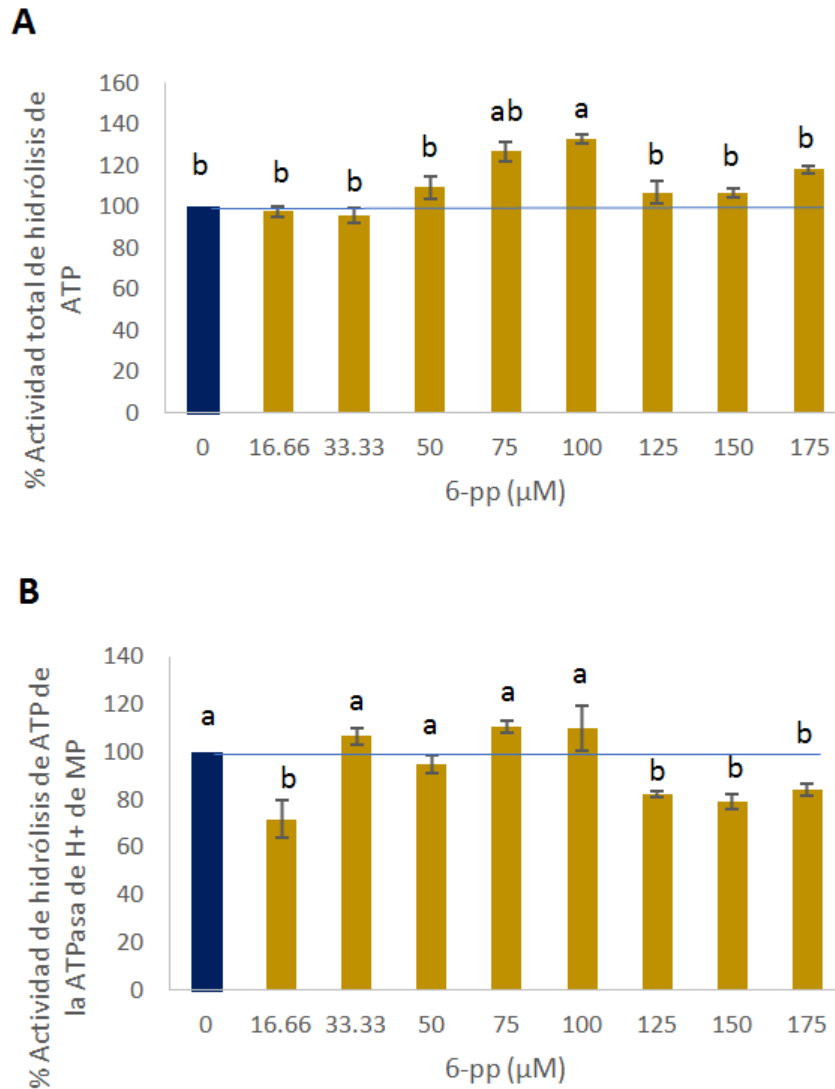


Figura 13. Efecto de 6-pentil-2H-piran-2-ona sobre la actividad de ATPasa de la fracción microsomal. A. Actividad total de hidrólisis de ATP, **B.** Actividad de ATPasa de la MP, se midió la actividad de hidrólisis de ATP en presencia de la mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP excepto el de la ATPasa de la MP. Los resultados son el promedio de tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una. El control no contiene 6PP (0) y representa el 100 % de la actividad sin 6PP. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

Efecto de *Trichoderma asperellum* y sus exudados sobre el crecimiento de plantas de maíz.

El tratamiento pre-germinativo de las semillas de maíz con *T. asperellum* o biopriming afecta el crecimiento de la planta de maíz, reduciendo el crecimiento de la raíz primaria, pero aumentando la longitud de los pelos radiculares y su número, lo que aumenta la superficie radicular y sus posibilidades de una mejor toma de nutrientes (Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria, et al., 2016). Por lo que, en este trabajo se determinó si los exudados del hongo también tenían ese efecto. Para lo cual se utilizaron cuatro lotes de semillas: un primer lote de semillas sin ningún tratamiento al que se le denominó **control**, un segundo lote al cual se le denominó tratamiento de **biopriming** con los conidios de *T. asperellum*, el tercer lote de semillas fue germinado en medio agar al 1 % en donde se colocaron 8 µL de los exudados del hongo en la superficie del medio denominado **contacto** y al último lote de semillas se le sometió a un proceso de agitación en una disolución de 80 µL de extracto/ mL de agua y luego fueron colocados en medio agar al 1 %, denominado **remojo**. Todos los lotes se germinaron por 72 h.

Se observó que a las 48 h de germinación hubo un aumento en el crecimiento de las raíces cuando son germinadas en presencia de los exudados del hongo, independientemente si éste se colocaba en el medio para germinar o bien si el tratamiento se daba a las semillas al remojarlas (Figura 14A).

A tiempos más prolongados de 72 h, se encontró que el efecto de los exudados del hongo era mayor en el tratamiento de contacto, el crecimiento de la raíz aumentó, contrario al biopriming donde se redujo (Figura 14B y 15). Mientras que el coleoptilo se redujo independientemente del tratamiento empleado, ya fuera con el hongo o con los exudados de *T. asperellum* (Figura 14 y 15 B).

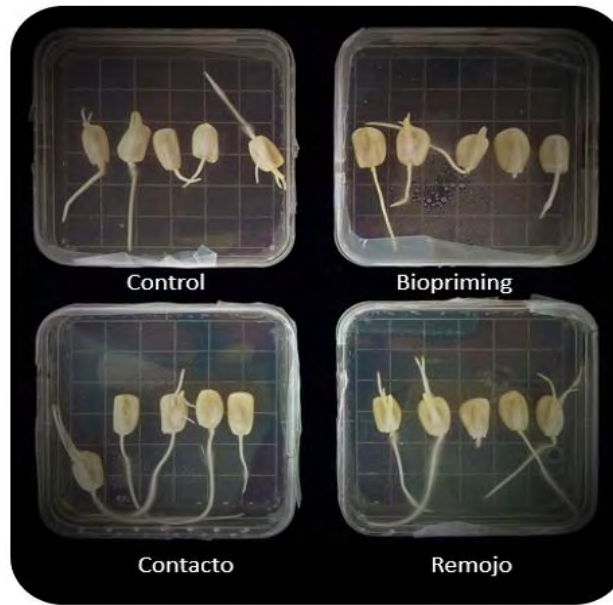
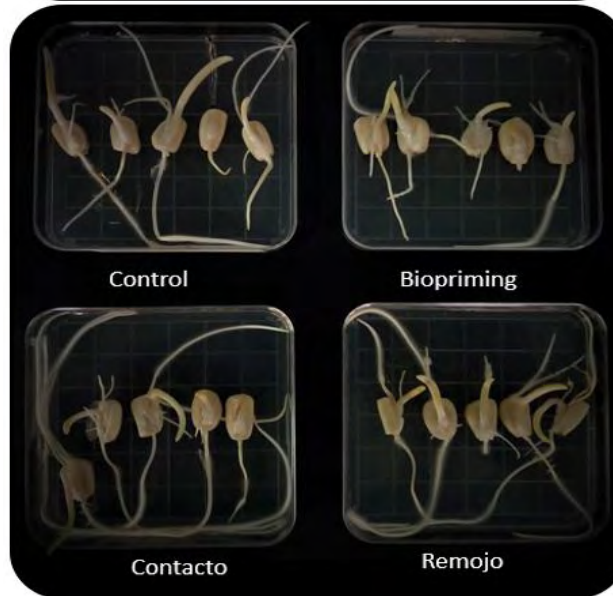
A**B**

Figura 14. Los exudados de *Trichoderma asperellum* inducen el crecimiento de las raíces primaria y adventicias de maíz. A. Semillas de maíz germinadas por 48 h; **B.** Semillas de maíz germinadas por 72 h. Las semillas previo a ser colocadas en las cajas de agar fueron tratadas con *T. asperellum* (Biopriming), o remojuadas y agitadas con el exudado del hongo (Remojo), o colocadas en la caja que contenía los exudados del hongo (Contacto), o sin tratamiento (Control).

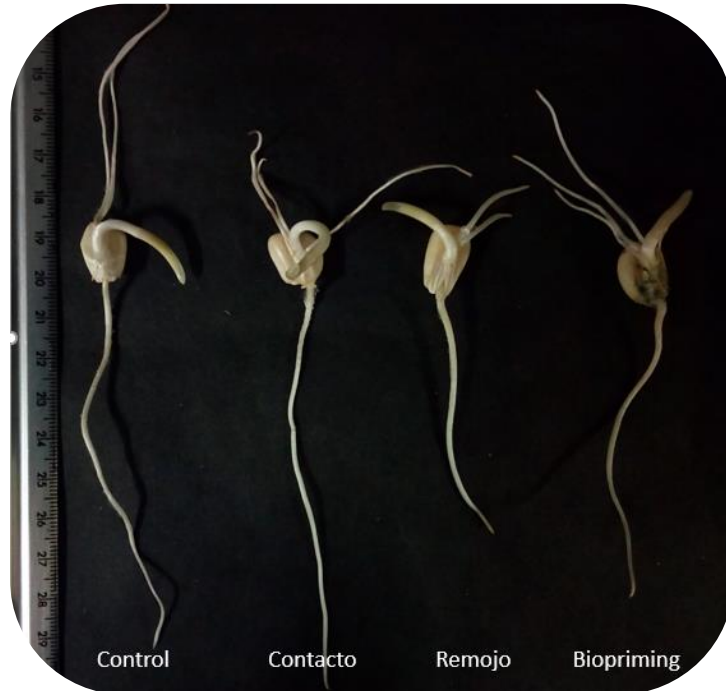
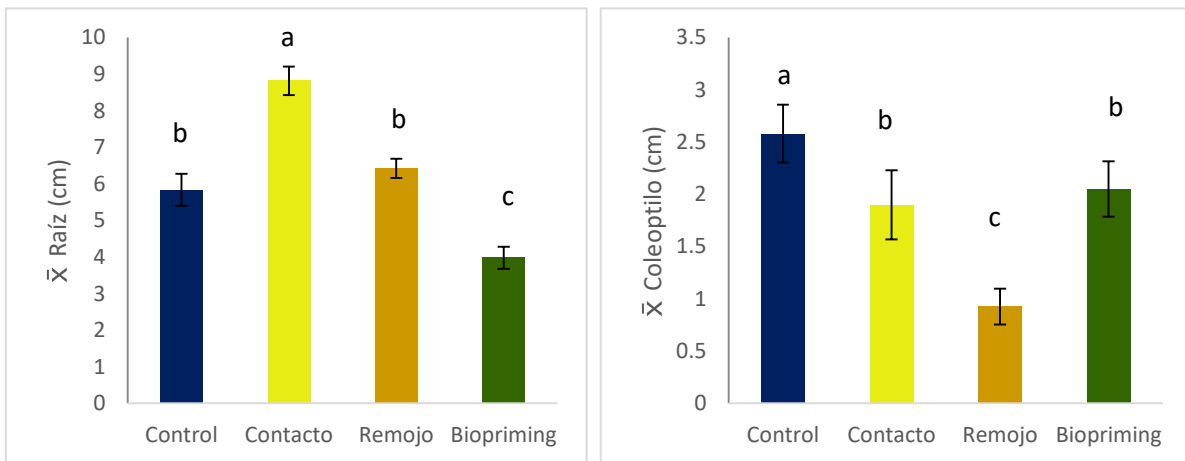
A**B**

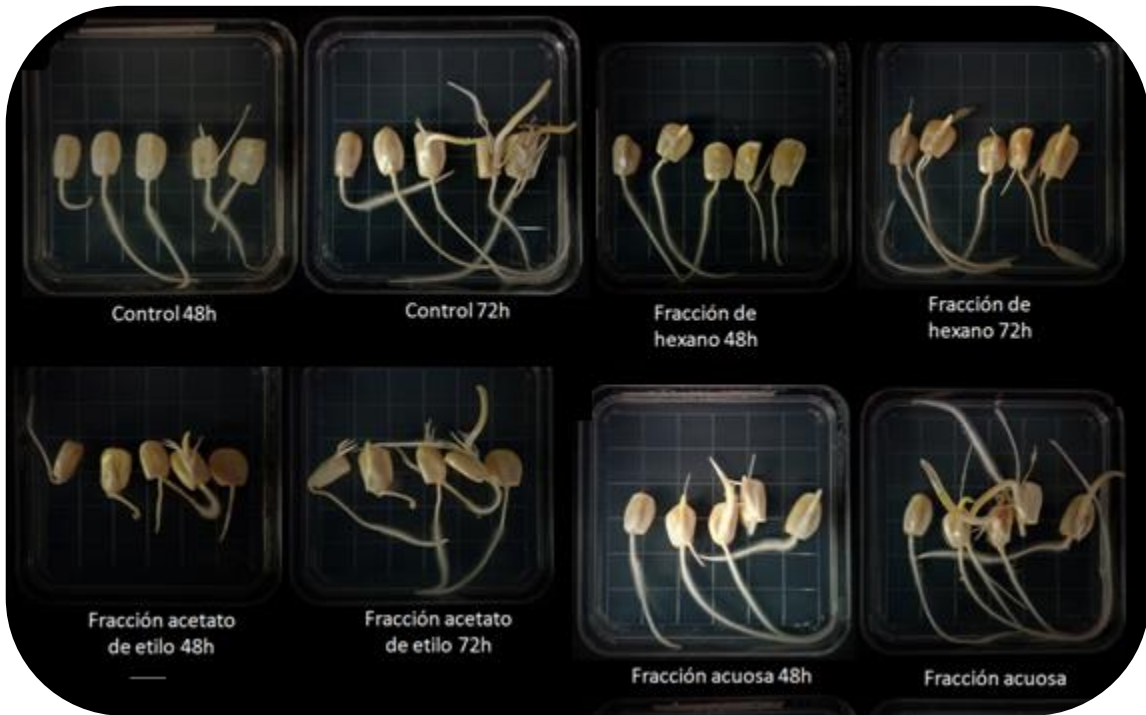
Figura 15. Comparación del efecto del exudado (contacto y remojo), y biopriming en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación. A. Apariencia morfológica de las plantas en los diferentes tratamientos. **B.** Crecimiento de la raíz y **C** Crecimiento del coleoptilo. Las semillas fueron germinadas sin ningún tratamiento (Control), pretratadas con *T. asperellum* (Biopriming), o remojuadas y agitadas con el exudado del hongo (Remojo), o colocadas en la caja que contenía los exudados del hongo (Contacto).

Las fracciones de los exudados de *T. asperellum* afectan el crecimiento de las plantas de maíz.

Se examinó si las fracciones de los exudados de *T. asperellum* producían un cambio en el crecimiento vegetal tanto a las 48 como a las 72 h. Se encontró que desde las 48 h ya hay cambios en el crecimiento (Figura 16). Después de 72 h de crecimiento la fracción acuosa favoreció la elongación radicular y a simple vista las raíces tienen mayor crecimiento de pelos radiculares (Figura 17). De manera opuesta las fracciones de hexano y de acetato de etilo, reducen el crecimiento de la planta, incluso el acetato de etilo favorece el enrollamiento de las raíces cuando se usaron 8 μ L de cada fracción que corresponden a una cantidad de 8 μ g añadida al agar para las tres fracciones y de 266.66 μ M para el compuesto 6 PP (Figura 16 y 17).

También se probó el efecto del 6PP sobre el crecimiento de la planta de maíz (Figura 17 y 18). Se observó que el compuesto 6 PP favorecía el crecimiento de la planta en general, incrementando el tamaño tanto de la raíz primaria como del coleoptilo. Además, en raíces éste compuesto tuvo un mayor efecto que las tres fracciones obtenidas de los exudados del hongo (Figura 18).

A



B



Figura 16. A y B Efecto de las fracciones de hexano, acetato de etilo y acuosa sobre el crecimiento de las plantas de maíz. Imágenes de semillas de 72 h germinadas en Agar 1% suplementadas con la fracción de los exudados de *T. asperellum*.

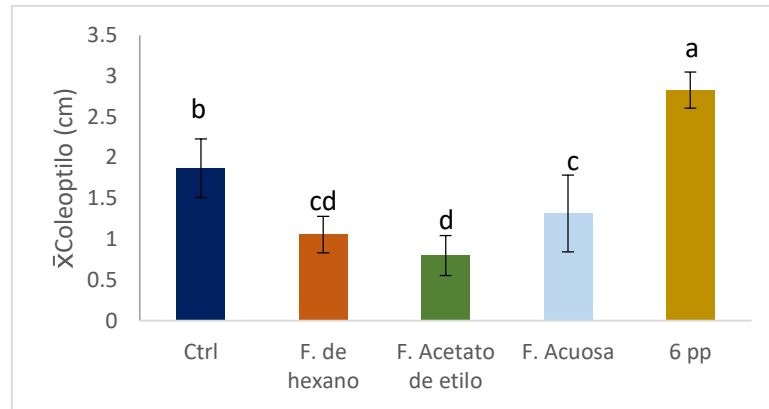
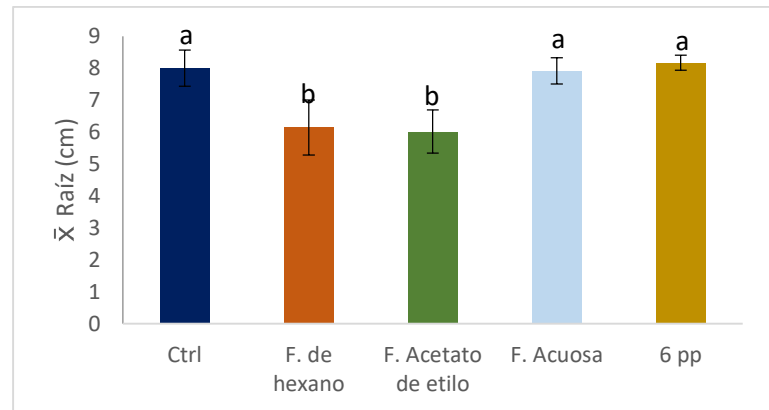
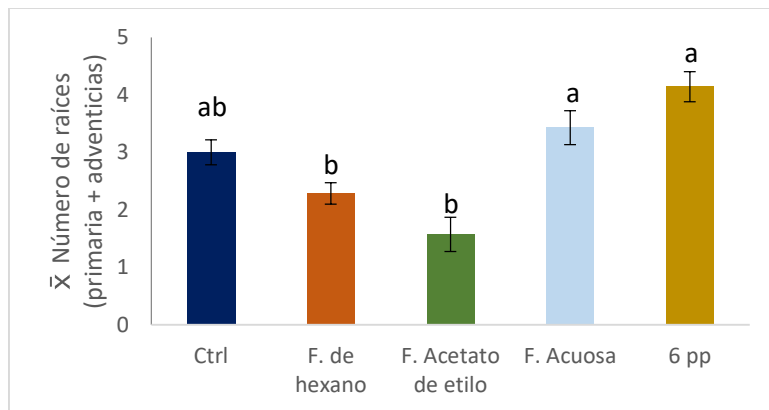
A**B****C**

Figura 17. Comparación del efecto de las fracciones de hexano, acetato de etilo, acuosa y 6PP en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación. A. Crecimiento del coleoptilo; **B.** Crecimiento de la raíz y **C.** número de raíces, se contaron la raíz primaria y las adventicias. Las semillas fueron germinadas sin ningún tratamiento (Control), o colocadas en la caja que contenía las fracciones de los exudados del hongo o el compuesto puro 6PP utilizando 8 μ g por fracción.

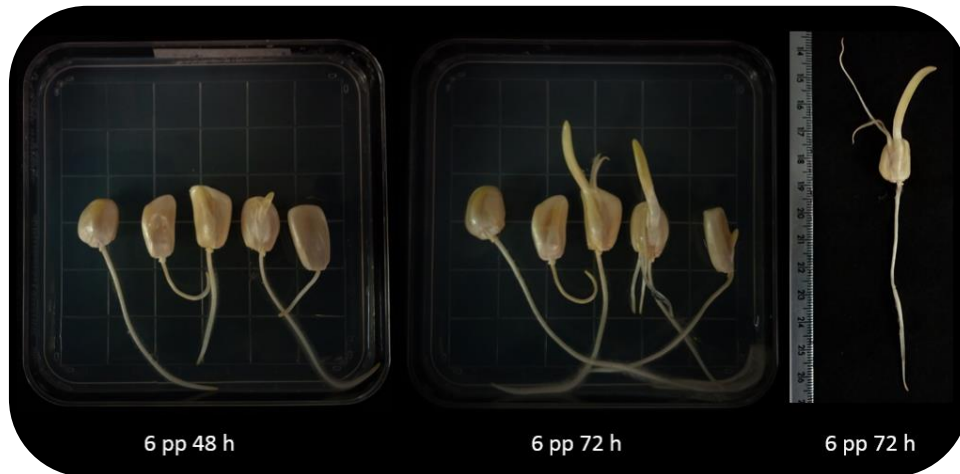


Figura 18. Efecto de 6PP en el crecimiento de las plantas de maíz. Crecimiento de plantas de maíz en presencia de 6PP a dos diferentes tiempos de crecimiento en semillas de 48 y 72 h.

Se probaron diferentes cantidades o concentraciones de cada uno de los extractos, fracciones y del producto puro 6PP. Encontrándose que la fracción de hexano es la que produce el mayor incremento en el crecimiento del coleoptilo, de la raíz primaria y del número de raíces adventicias. Aunque también el extracto y la fracción acuosa obtuvieron estos resultados con ciertas cantidades. Respecto al 6PP se observó que a pesar de que mejora el crecimiento del coleoptilo y la aparición de raíces adventicias, no mejora la longitud de la raíz primaria. Por lo cual es probable que otras moléculas sean las responsables de la promoción del crecimiento vegetal, así como de la activación de la ATPasa.

A



B

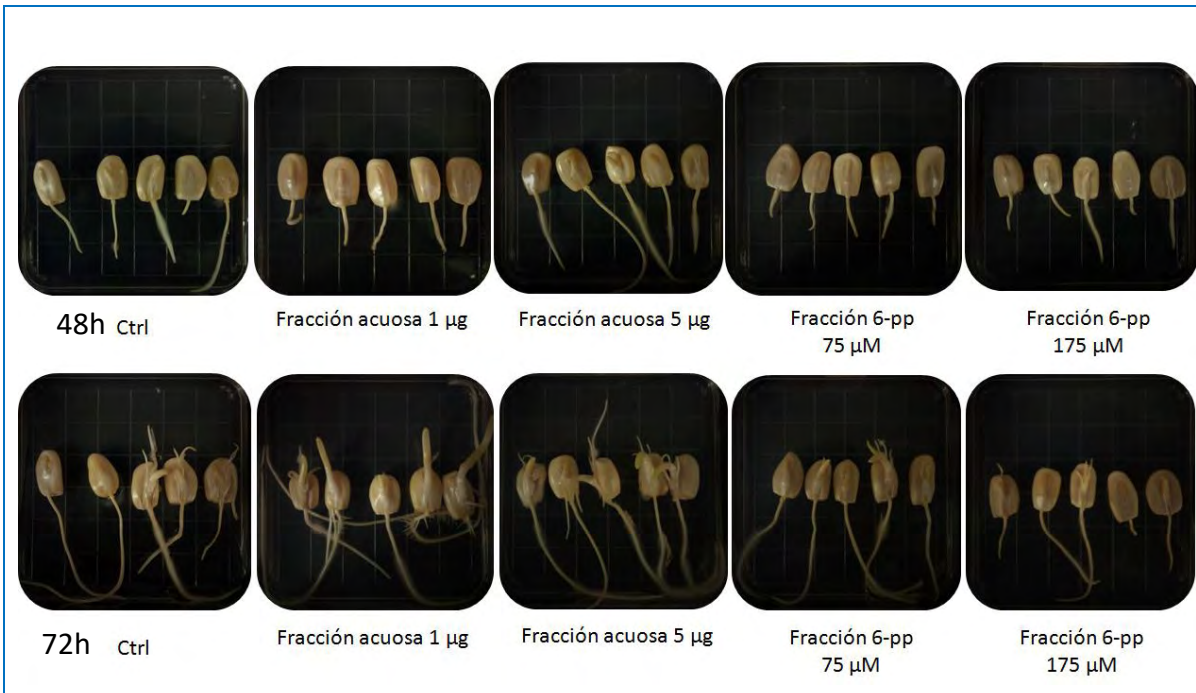




Figura 19. A, B, C y D. Efecto del exudado de *T. asperellum*, las fracciones hexano, de acetato de etilo, acuosa y del compuesto 6PP en el crecimiento de las plantas de maíz. Las semillas fueron germinadas por 72 h en Agar 1%, en las imágenes se observa el efecto de los diferentes tratamientos a dos tiempos de crecimiento. Imágenes representativas de dos muestras biológicas. , En cada cuadro, las imágenes de arriba indican 48 h y las de abajo 72 h. las flechas indican la polaridad de las fracciones. Figura D son imágenes representativas de dos muestras biológicas.

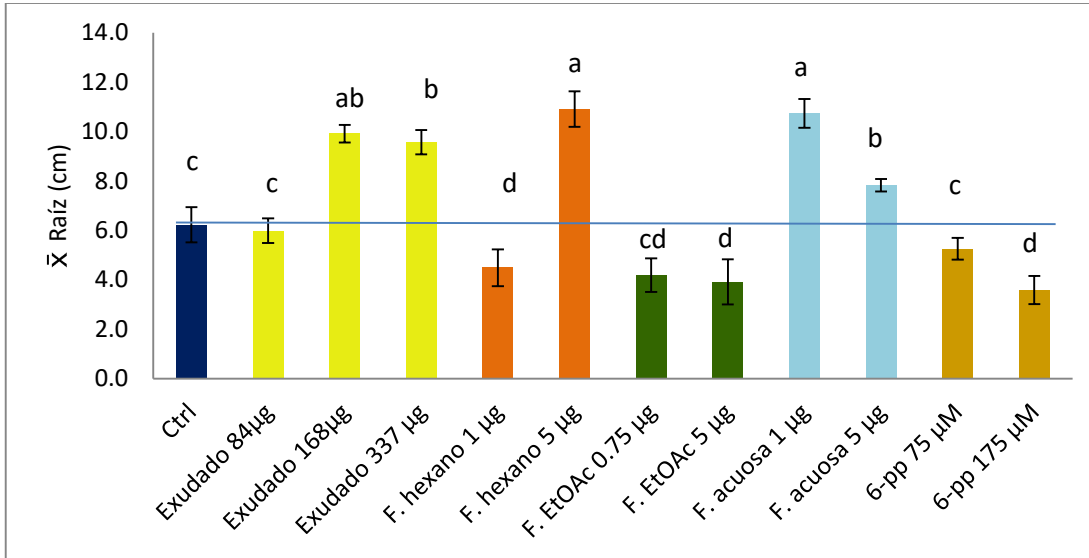
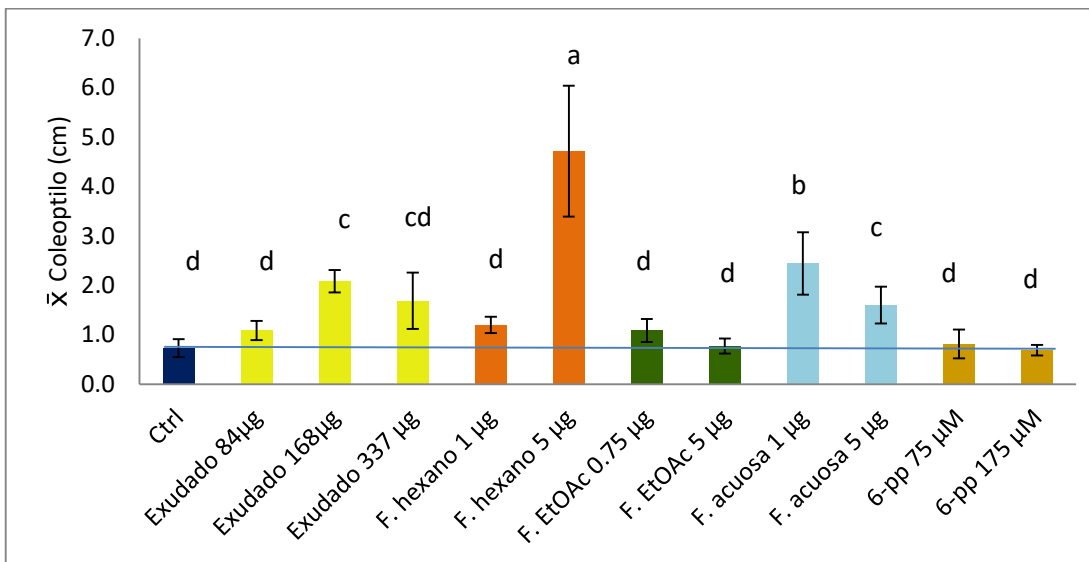
A**B**

Figura 20. Comparación del efecto del extracto de *T. asperellum*, las fracciones acuosa, de hexano, de acetato de etilo y del compuesto 6PP en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación. A. Crecimiento de la raíz; B. Crecimiento del coleóptilo y C. número de raíces, se contaron la raíz primaria y las adventicias. Las semillas fueron germinadas sin ningún tratamiento (Control), o colocadas en la caja que contenía las fracciones de los exudados del hongo o el compuesto puro 6PP por el método de **Contacto. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.**

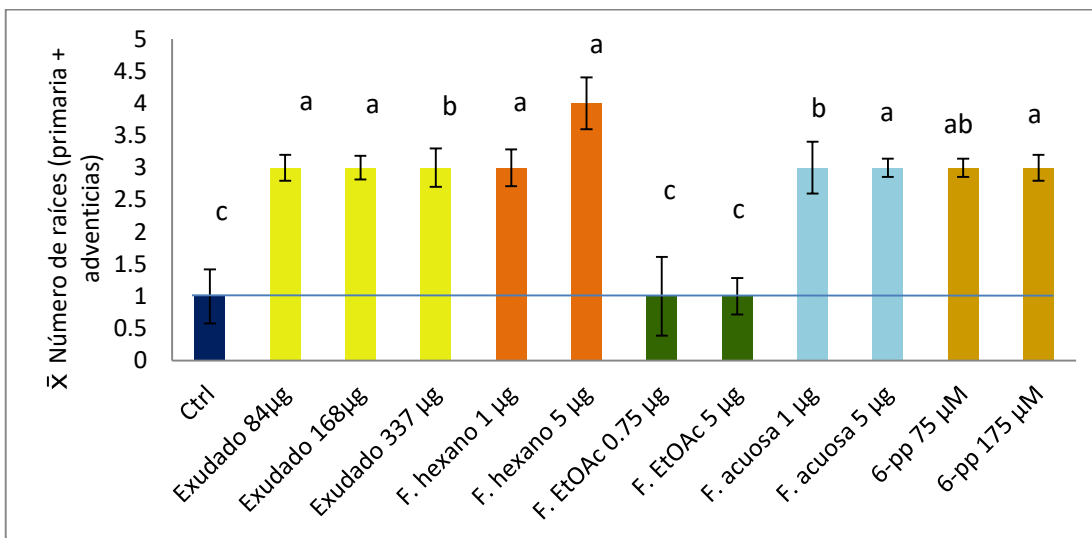
C

Figura 20. Comparación del efecto del extracto de *T. asperellum*, las fracciones acuosa, de hexano, de acetato de etilo y del compuesto 6PP en el crecimiento de las plantas de 72 h de germinación. A. Crecimiento de la raíz; B. Crecimiento del coleóptilo y C. número de raíces, se contaron la raíz primaria y las adventicias. Las semillas fueron germinadas sin ningún tratamiento (Control), o colocadas en la caja que contenía las fracciones de los exudados del hongo o el compuesto puro 6PP por el método de **Contacto. El análisis estadístico se realizó mediante una Anova de una cola por la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.**

DISCUSIÓN

Trichoderma es el género de hongos saprofitos más comúnmente encontrado en la rizosfera y se usa ampliamente en la industria de biopesticidas (Keswani et al., 2013; Singh et al., 2016). Particularmente *Trichoderma* se caracteriza por inducir tolerancia al estrés en las plantas huésped a través de un desarrollo mejorado de raíces y brotes, la resistencia sistémica inducida, la inactivación de enzimas patógenas y la solubilización y secuestro de nutrientes inorgánicos, por lo que es

considerado un promotor del crecimiento vegetal y agente biocontrol de patógenos (Scala et al., 2007; Pill et al., 2009; Singh et al., 2016).

Debido a lo anterior, el género *Trichoderma* se considera una fuente de metabolitos muy atractiva tanto para la industria de pesticidas como de fertilizantes. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue la búsqueda de metabolitos que favorecen el crecimiento vegetal.

En nuestro grupo de trabajo hemos caracterizado el efecto de *T. asperellum* sobre el crecimiento del maíz, encontrando que el contacto directo del hongo (biopriming) disminuye el crecimiento de la raíz primaria e induce cambios en la estructura radicular, al aumentar el número de pelos radiculares, así como su longitud a tiempos cortos del crecimiento de la planta (Guzmán-Chávez, 2013; López-Coria et al., 2016). Mientras que a tiempos más prolongados se observa que las plantas son más altas que aquellas que no pasaron por el tratamiento de biopriming (Guzmán-Chávez, 2013). Adicionalmente, hemos observado que la sola presencia del hongo en el mismo medio de crecimiento de la semilla de maíz, pero sin mantener contacto directo con la semilla, modifica el crecimiento de la planta, induciendo el crecimiento de la parte aérea, así como de raíz (López-Coria et al., 2016). Lo que apunta a que los metabolitos que exuda el hongo son los responsables del efecto en el cambio morfológico de la planta.

Ácido Indol Acético

Se ha sugerido que varias moléculas pueden afectar el crecimiento vegetal, un grupo de éstas son derivadas del ácido indol acético (IAA), una fitohormona que participa en muchos procesos fisiológicos de la planta como la división, elongación y diferenciación. Son sintetizadas en la parte aérea y transportadas a través de los tejidos de la planta mediante difusión o a través de transporte activo entre las células (López-Coria 2015; Enders y Strader 2015).

Experimentos con mutantes insensibles a auxinas o bien que carecen de transportadores de auxina (AUX1, BIG, EIR1 y AXR1), demuestran que las auxinas si tienen un papel en la promoción del crecimiento vegetal, ya que el

hongo es incapaz de producir cambios en la estructura radical y en el desarrollo en estas mutantes (Cornejo et al., 2009).

En el caso de *T. asperellum*, López-Coria (2015) observó que la presencia del hongo modifica el contenido de auxinas tanto en las raíces como en el coleoptilo, encontrándose un mayor contenido en la parte aérea y en las puntas de las raíces. Sin embargo, el contenido de IAA en el exudado del hongo es muy bajo, 0.3 μM (López-Coria et al., 2016). El bajo o nulo contenido de IAA se ha demostrado en otras cepas de *Trichoderma*, pero aún estas cepas son capaces de promover el crecimiento vegetal (Hoyos et al., 2009), lo cual demuestra que hay otros metabolitos que promueven el crecimiento vegetal.

Una de las respuestas al IAA es la expresión de proteínas SAUR, las cuales tienen como uno de sus blancos a la fosfatasa 2CD1 (PP2C-D1) inactivándola. Estas enzimas defosforilan a la ATPasa de H^+ de la MP disminuyendo su actividad (Li, 2017). La enzima es de importancia fundamental en el crecimiento de la planta, debido a que está involucrada en los procesos de elongación celular, nutrición, regulación del pH apoplástico y citosólico, así como en la apertura y cierre de estomas (Falhof et al., 2015). Cuando la enzima se encuentra fosforilada impacta positivamente en el crecimiento celular, al desfosforilarse la actividad de la enzima disminuye (Haruta et al., 2015).

6-Pentil-2H-Piran-2-ona

La ATPasa de H^+ de la MP es regulada positivamente por una gran variedad de compuestos, por ejemplo, la fusicocina, un metabolito producido por un hongo que es capaz de activar a la enzima (Falhof et al., 2015), por lo que no es de extrañarse que el exudado de *T. asperellum* tenga como blanco a la enzima. En un trabajo anterior se demostró que la ATPasa de H^+ se activa en presencia del exudado y que esta activación es diferente a la que produce la adición de auxinas, por lo que otras moléculas además de auxinas pudieran estar induciendo en su actividad.

Como una primera aproximación para identificar cuáles son las moléculas responsables del efecto en la activación de la ATPasa de H⁺ de la MP y cómo se afectaba el crecimiento vegetal, se realizó en este trabajo el fraccionamiento del exudado del hongo, encontrando que dependiendo de la concentración y de la polaridad del solvente utilizado para fraccionar el exudado, se inhibía o incrementaba la actividad de ATPasa de H⁺ de la MP, además de que tenía una influencia en el crecimiento vegetal.

La fracción de hexano fue la que produjo la mayor activación de la enzima, alrededor del 56 % con un 1 µg de extracto. Mientras que la fracción acuosa la activa a concentraciones bajas y a concentraciones altas la inhibe. Mediante un análisis de DSA-HR-APCI-MS se encontró que uno de los componentes que se encuentra en todas fracciones es la molécula 6PP. La presencia de 6PP en las tres fracciones se debe esencialmente a que es una molécula que presenta tanto una parte no polar como grupos funcionales polares, lo cual podría llevar a enmascarar el efecto de otras moléculas presentes en las diferentes fracciones, por lo que aún se debe ajustar el protocolo de fraccionamiento del exudado para reducir o eliminar su presencia en otras fracciones.

Se ha demostrado que 6PP en forma pura a 50 a 150 µM promueve el crecimiento de *Arabidopsis*, regulado su arquitectura radicular, inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria e induciendo la formación de pelos radiculares (Garnica-Vergara et al., 2016). Todos estos cambios en la morfología de la planta de *Arabidopsis* también han sido observados en plantas de maíz en presencia de *T. asperellum*. Por lo que decidimos estudiar si este compuesto tenía un efecto sobre la actividad de ATPasa. Encontramos que, dependiendo de la concentración, el 6PP inhibe o no tiene efecto sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la MP. Garnica-Vergara y colaboradores (2016) demostraron que la expresión de algunos transportadores de auxinas como los PIN se inducen de manera específica y dosis dependiente en las raíces por efecto de la adición de 6PP.

Adicionalmente, encontramos que 6PP afecta positivamente el crecimiento del coleoptilo solo a una de las concentraciones probadas, sin embargo, no tiene

efecto sobre el crecimiento de la raíz primaria, aunque induce la formación de raíces adventicias. Sin embargo, desconocemos si tiene un efecto en la longitud de los pelos radicales y su densidad en las plantas de maíz.

Coningininas

Las coningininas A y C fueron encontrados en las fracciones que se esperaba promovieran la actividad de ATPasa de H⁺ de MP, la fracción de hexano y acetato de etilo. La coninginina es un compuesto cetol, cristalino y de color blanco, se descubrió por primera vez aislando al hongo *T. koningii* de la raíz de *Diffenbachia sp.* (Cutler et al., 1989). La coninginina C tiene una estructura similar a las coningininas A y B (Parker et al., 1995). Se ha reportado que a una concentración de 10⁻³ M, inhibe ligeramente el crecimiento de coleoptilos de trigo etiolados, posiblemente esta sea la razón por la cual hubo una disminución en el tamaño de los coleoptilos (Figura 17) a altas concentraciones de las fracciones hexánica y de acetato de etilo y no así a concentraciones bajas (Figura 20B).

Por otra parte, se ha demostrado que las coningininas A y B aisladas de *T. harzianum* presentan actividad antifúngica contra el hongo *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Ghisalberti y Rowland 1993). La coninginina C tiene un efecto similar y la coninginina D inhibe el crecimiento de *Bipolaris sorokiniana*, *Pythium middleonii*, *F. oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi* y *R. solani* (Dunlop et al., 1989), por lo que es posible que el empleo de estas fracciones tenga el mismo efecto contra estos patógenos de plantas, lo cual es benéfico para su crecimiento. Como se mencionó anteriormente 5 µg de la fracción de hexano incrementó el crecimiento del coleoptilo, la raíz, y en el número de raíces adventicias.

Harzianolida

El tratamiento con harzianolida en una concentración de 1 mg/L tiene un efecto positivo sobre el crecimiento y la respuesta de defensa de plántulas de *Brassica napus* y *Solanum lycopersicum* (Vinale et al., 2008). La harzianolida es capaz de promover significativamente el crecimiento de plántulas de tomate hasta 2.5 veces (peso seco) a una concentración de 0.1 ppm, además su empleo aumenta la actividad de enzimas relacionadas con la respuesta de defensa de la planta,

induciendo la expresión de genes implicados en las vías de señalización de defensa como la del ácido salicílico (Cai et al., 2013). Se encontró la presencia de este compuesto en la fracción de acetato de etilo, sin embargo, la adición de 0.75 µg de la fracción de EtOAc reduce el tamaño de la raíz, manteniendo el mismo número de raíces adventicias. A pesar de que harzianolida es un regulador de crecimiento positivo, la presencia de coninginas promueven la inhibición de coleoptilos como se ha reportado por (cutler et al., 1989) y la de viridiol que es un herbicida, los resultados sugieren que la harzianolida probablemente esté en menor concentración lo que explicaría el bajo crecimiento obtenido en raíces y coleoptilos de las plantas de maíz a 72 h de crecimiento.

Compuestos antifúngicos: Pachybasin y Viridiol

Uno de los mecanismos que *Trichoderma* despliega para ayudar a que la planta permanezca sana por más tiempo en el campo, es la exudación de compuestos antifúngicos, herbicidas y otras actividades. Si bien en este proyecto las plantas de maíz no fueron sometidas a un reto con otros organismos (plantas, bacterias u hongos), el exudado del hongo podría reducir el crecimiento de hongos que pudieran encontrarse contaminando a las semillas de maíz de manera interna o bien funcionar para eliminar la competencia por espacio con otras plantas.

Encontramos que la fracción de hexano esta enriquecida en un compuesto denominado Paquibasin, esta es una antraquinona fúngica simple (1-hidroxi-3-metilantraceno-9,10-diona) y fue aislada por primera vez por Shibata et al., (1955). Las antraquinonas presentan diversas funciones biológicas, sirven como laxantes, diuréticos, fitoestrógenos, estimuladores inmunes, antifúngicos, antivirales, y también se han descrito como agentes anticancerígenos. Las antraquinonas han sido aisladas de diversas cepas de *Trichoderma*, aunque sus efectos biológicos han sido poco entendidos (Liu et al., 2009). Estudios previos han demostrado que este compuesto tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger* y *A. flavus*, a valores de concentración de inhibición mínima de 64,0 µg/mL, y contra *S. aureus* y *F. oxysporum* a

concentraciones de 32.0 y 16.0 $\mu\text{g/mL}$ (Wulansari et al., 2014). El efecto en la promoción del crecimiento vegetal no se conoce por lo que sería interesante su estudio.

En la fracción de acetato de etilo y acuosa se encuentra el Viridiol ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$), especies como *T. viride*, *T. hamatum* y algunas especies de *Gliocladium* producen este compuesto, siendo un antimicótico y un metabolito fitotóxico (Vinale et al., 2014). También se ha demostrado que el viridiol posee actividad herbicida en cultivo de cobertura de centeno contra *Setaria viridis* y *Amaranthus retroflexus* (Javaid y Ali, 2011).

En las fracciones se identificaron moléculas que se conoce tienen actividad promotora del crecimiento vegetal, aunque también hay una gran variedad de moléculas, que aunque contamos con los pesos moleculares en algunos casos desconocemos de que moléculas se trata, o bien en algunos casos identificamos las moléculas pero no se ha identificado su actividad biológica, todas ellas son moléculas interesantes de estudio.

Este trabajo contribuye al entendimiento de la interacción *Trichoderma*-planta en el contexto de las moléculas que el hongo produce para promover el crecimiento de la planta. Si bien no se encontró el metabolito que lleva a la inducción de la actividad de ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, sí se encontraron algunos metabolitos que podrían participar en el crecimiento vegetal y que se necesita estudiar su efecto a mayor profundidad en la planta de maíz. También se propone que deben probarse otro tipo de fraccionamientos del exudado del hongo para obtener compuestos puros y determinar su efecto esencialmente en el crecimiento vegetal.

CONCLUSIONES

- El exudado de *T. asperellum* activó a la ATPasa de H⁺ de la MP tanto en las fracciones microsomales de los coleoptilos como en las de las raíces, aunque la activación fue mayor en este último. Además, promovió el crecimiento radicular y a algunas concentraciones también incrementó el crecimiento del coleoptilo.
- El fraccionamiento del extracto extracelular de *T. asperellum* en las fracciones hexano, acetato de etilo y acuosa, permitió detectar que la fracción de hexano tiene el mayor efecto activador sobre la actividad de ATPasa de H⁺ de la MP, así como del crecimiento vegetal. Mientras que en la fracción de acetato de etilo el efecto sobre la ATPasa es inhibitorio, así como también en el crecimiento de la planta.
- Se identificó que en las tres fracciones se encuentra el 6PP, sin embargo, este compuesto en forma pura no tiene un efecto activador de la ATPasa de H⁺ de la MP, pero sí un efecto promotor del crecimiento del maíz a ciertas concentraciones. Lo que sugiere que el 6PP tiene otro blanco celular que permite el crecimiento de la planta.
- Otros compuestos que se encontraron fueron el Viridiol en la fracción de acetato de etilo y acuosa que es un compuesto antimicótico y metabolito fitotóxico. En la fracción de hexano se encontró el Paquibasin que es antimicrobiano y en la fracción de hexano y de acetato de etilo se encontraron las Coninginas (A y C) que en algunas plantas son promotoras del crecimiento vegetal.

PERSPECTIVAS

1. Determinar si las Coninginas de *T. asperellum* tienen un papel en la activación de la ATPasa de H⁺ de la MP en la fracción de hexano y también si promueven el crecimiento del maíz.
2. Mejorar el protocolo de fraccionamiento del exudado
3. Identificar a todos los metabolitos presentes en el exudado de *T. asperellum*
4. Determinar la capacidad de promoción del crecimiento vegetal o biocontrol de patógenos de algunas de las moléculas de las que si se obtuvo su identificación.
5. Producir mutantes en *T. asperellum* que sean incapaces de secretar algunos metabolitos, para identificar si participan en la promoción del crecimiento del maíz.
6. Determinar el número y longitud de los pelos radiculares en las plantas que pasaron por los diferentes tratamientos para determinar si también hubo estos cambios que pudieran afectar la superficie radicular.

Referencias

- Altomare C., Norvell W., Björkman T., and Harman G., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*. 2926-2933
- Arciniega-Ruiz J.M., 2012. Cambios en los niveles hormonales de embriones de maíz inducidos durante su interacción con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.
- Ahluwalia V., Kumar J., Rana V., Sati O., and Walia S. Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Natural Product Research*. 29(10):914-20.
- Berkaew P., Soonthornchareonnon N., Salasawadee K., Chanthaket R. and Isaka M., 2008. Aurocitrin and Related Polyketide Metabolites from the Wood-Decay Fungus *Hypocrea* sp. BCC 14122. *Journal of Natural Products*. 71 (5): 902-904.
- Brian P. and McGowan J., 1945. Viridin: a Highly Fungistatic Substance Produced by *Trichoderma viride*. *Nature*. 156: 144-145.
- Bhatnagar I. and Kim S., 2015. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* reverses epithelial to esenchymal transition: Implications in renal fibrosis. *International Journal of Medical Microbiology*. 305(1): 11-19.
- Bonifaz A., 2012. *Micología médica básica*, 4ta Ed. McGraw Hill. 1-34.
- Cai F., Yu G., Wang P., Wei Z., Fu L., Shen Q., and Chen W., 2013. Harzianolide, a novel plant growth regulator and systemic resistance elicitor from *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 73: 106-113
- Contreras-Cornejo H., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., y 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):1579-92.

- Cutler H., Himmelsbach D., Arrendale R., Cole P., and Cox R., 1989. Koninginin A: A novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 53 (10): 2605-2611
- Du Plessis, J., 2003. Maize Production. Department of Agriculture, Directorate Agricultural Information Services Private Bag X144, Pretoria, 0001 South Africa, 38.
- Enders T. y Strader L., 2015 Auxin Activity: Past, present, and Future. *American Journal of Botany*. 102(2): 180-196.
- Ermakova E., and Zuev Y. 2017. Effect of ergosterol on the fungal membrane properties. All-atom and coarse-grained molecular dynamics study. Elsevier, *Chemistry and Physics of Lipids*. 209, 45-53.
- Falhof J., Pedersen J., Fuglsanj A., and Palmgren M., 2015. Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*. 9(3):323-337.
- Gajera H., Hirpara D., Katakpara Z., Patel S., and Golakiya B., 2016. Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier (45): 383-392.
- Garnica A., Barrera S., Muñoz E., Raya J., Méndez A., Macías L, Ruiz L., and 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 Phytology* 209(4): 1496-512.
- Ghisalberti E., and Rowland C. 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal of Natural Products*. 56(10): 1799-804.
- González-Romo P, Sánchez-Nieto S, and Gavilanes-Ruíz M. 1991. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry* 200: 235-238.
- Gruber S. and Seidl-Seiboth V., 2012. Self-versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34

- Guzmán-Chávez, F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias Bioquímicas. UNAM. 111p.
- Haruta M., Gray W., and Sussman M., 2015. Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. *Current opinion in Plant Biology*, ELSEVIER. 28:68-75.
- Hashimoto R., Takahashi S., Hamano K., and Nakagawa A., 1995. A new melanin biosynthesis inhibitor, melanoxadin from fungal metabolite by using the larval haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Antibiotics*. 48(9), 1052-4.
- Howell C., 2006. Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. *Phytopathology*. APS Journals. 96(2): 178-180.
- Hermosa R., Cardoza R., and Rubio M., et al., 2014. Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Ed Elsevier, 10: 125-137
- Index Fungorum Partnership ©, 2017 Página con bases de datos [en línea]. Disponible en : <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>, Consultado el 01-11-17.
- Işcan G., Kirimer N., Demirci F., Demirci B., Noma Y., and Başer K., 2012. Biotransformation of (-)-(R)- α -phellandrene: antimicrobial activity of its major metabolite. *Chemistry & Biodiversity*. 9(8):1525-32.
- Ishikawa M., Amaike M., Itoh M., Warita Y., and Kitahara T., 2003. Synthesis of the racemate and both enantiomers of massoilactone. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 67(10):2210-4.
- Keswani C., Mishra S., Sarma B., and Singh H., 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2): 533–544.
- Keswani C., Patel J., Sarma B., and Singh H., 2016. *Trichoderma* spp.: efficient inducers of systemic resistance in plants. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, 12: 185-195.

- Kubicek C., and Druzhinina I., 2005. Species concepts and biodiversity in Trichoderma and Hypocrea: from aggregate species to species clusters? Journal of Zhejiang University Science B. 6(2): 100-112.
- Kubicek C., Herrera-Estrella A., Seidl-Seiboth V., and Martinez A., et al., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. Genome Biology. (40):12-15.
- Kubicek C., Zelazowska M., and Druzhinina I., 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. Journal Zhejiang University Science B. 9(10): 753-763.
- Llina M., and Neilands J. Structure of ferricrocin. Elsevier, Bioinorganic Chemistry 2(2): 159-165.
- Li X., Liu G., Geng Y., Wu M., Pei W., et al., 2017. A genome-wide analysis of the small auxinup RNA (SAUR) gene family in cotton. BMC Genomics. 18: 815.
- López-Coria M., Hernández-Mendoza J., and Sánchez-Nieto S., 2016. *Trichoderma asperellum* induces maize seedling growth by activating the plasma membrane H⁺ ATPase. Molecular Plant-Microbe Interactions 29 (10): 797-806.
- López-Coria, Montserrat (2015) *Trichoderma asperellum* induce el desarrollo de plántulas de maíz y aumenta la actividad de la ATPase de H⁺ de la membrana plasmática. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias, UNAM, CDMX, México, 96p.
- Majda M., and Robert S., 2018. The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. International Journal of Molecular Sciences. 19 (4): 951.
- Mandala S., Thornton R., Frommer B., Dreikorn S, and Kurtz M., 1997. Viridifungins, novel inhibitors of sphingolipid synthesis. Journal Antibiot (Tokyo), 50(4): 339-43.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M., Sanchez J., Buckler E., and Doebley J., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. PNAS, 99(9): 6080-6084.

- Palmgren M., 2001. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817-845
- Qian-Cutrone J., Huang S., Chang L., Pirnik D., Klohr S., Dalterio R., Hugill R., Lowe S., Alam M., and Kadow K., 1996. Harziphilone and fleophilone, two new REV/RRE binding inhibitors produced by *Trichoderma harzianum*. *The Journal of antibiotics*. 49(10): 990-7.
- Qualhato T., Cardoso F., and Steindorff A., et al. 2013. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35: 1461-1468.
- Rayle D., and Cleland R., 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99(4): 1271-1274.
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J., Chacón-López A., Cruz-Ramírez A., Nieto-Jacobo F., Dubrovsky J., and Herrera-Estrella L., 2005. Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46 (1): 174–184.
- Sánchez-Nieto S., Tuena M., Rodríguez-Sotres R., Carballo A., and Gavilanes-Ruiz M., 1998. Comparison of plasma membrane H⁺ -ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrate maize embryos. *Biochimica et Biophysica Acta* 141: 175-187
- Saravanakumar K., Shanmuga V., and Kathiresan K., 2013. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Elsevier*, 104: 101-105.
- Schuster A., and Schmoll M., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 787-799
- Shibata S., and Takido M. 1955. Metabolic products of fungi. III. The coloring matters of *Pachybasium candidum* Saccardo. *Pharmaceutical Bull.* 3(2): 156-158.

- Sikorski J., 2007. Therapeutic Areas I: Central Nervous System, Pain, Metabolic Syndrome, Urology, Gastrointestinal and Cardiovascular. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. 6(20): 459-494.
- Singh V, Sanmukh R., Kumar B., and Harikesh B., 2016. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research* 193: 74-86.
- Spartz K., Ren H., Park Y., Lee S., Murphy A., Sussman M., Overvoorde P., and Gray W., 2014. SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H⁺-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis. *Journal List: The plant Cell Physiology* . 26(5): 2129-2142.
- Suga T., Asami Y., Hashimoto S, Kenichi N, Iwatsuki M., Nakashima T., Watanabe Y., Sugahara R., et al 2015. Trichopolyn VI: A new peptaibol insecticidal compound discovered using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* screening system. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 61(3): 82-87.
- Sunil S., and Siu K., (2014). Chapter 8, *Trichoderma* secretome: An overview. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier, 103-114.
- Toghueo R., Eke P., Zabalgoceazcoa Í., Aldana B., Nana L., and Boyom F., 2016. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of *Common Bean* Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96: 8-20.
- Tromas A., Paponov I., and Perrot-Rechenmann C., 2010. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Science*. 15 (8): 436-446.
- Velásquez S., Barbez E., Vehn J., and Estévez J., 2016. Auxin and Cellular Elongation. *Plant Physiology*, 170: 1210-1215.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Woo S.L., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., and Ruocco M. 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *The Open micology Journal*. 8: 127-139.

- Vinale F., Marra R., Scala F., et al., 2005. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*; 43: 143-148.
- Wielandt A., Pedersen J., Falhof J., Kemmer G., et al 2015. Specific Activation of the Plant P-type Plasma Membrane H⁺-ATPase by Lysophospholipids Depends of Autoinhibitory N- and C-terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 290 (26): 16281-91.
- Wulansari D., Jamal Y., Praptiwi, and Agusta A., 2014. Pachybasin, a major metabolite from culture broth of endophytic coelomyceteous AFKR-18 fungus isolated from a yellow moonseed plant, *Arcangelisia flava* (L.) Merr. *HAYATI Journal of Biosciences*.21(2): 95-100.
- Zelazowska M., Neuhof T., Dieckmann R., Döhren H., Herrera-Estrella A., Kubicek c., and Irina S., 2007. Formation of Atroviridin by *Hypocrea atroviridis* Is Conidiation Associated and Positively Regulated by Blue Light and the G Protein GNA3. *Eukaryot Cell*. 6(12): 2332-2342.
- Zeilinger S., Gruber S., Bansal R., and Mukherjee P., 2016. Secondary metabolism in *Trichoderma* – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*. 30 (2): 74-90.
- Zhao Y., Huang Y., Fang Y., Zhao H., Shi W., Li J., Duan Y., Sun Y., Gao L., and Luo Y., 2018. Chrysophanol attenuates nitrosative/oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of pharmacological sciences*. (18): 30133-6.

Anexo A Metabolitos secundarios buscados en el exudado y las fracciones de *Trichoderma asperellum*

Compuesto	Aplicación	M. monoisotópica	Fórmula mínima	Concentración	Efecto	Referencia	Exudado	F. hexano	F. EtOAc	F. acuosa
6-pentil-2 H-piran-2-ona	Antifúngico, promotor del crecimiento, aroma de coco	166.0994	C10H14O2	0.166 mg / L	Efectos inhibitorios a alta concentración y promoción del crecimiento a baja concentración en plántulas de trigo	Vinale et al., 2008	no	no	si	no
ácido harziánico	Inhibidor de crecimiento	365.1838	C19H27NO6	100 y 10 µg / semilla	Inhibición de hasta 45% y 33% en la longitud del tallo en plantas de canola	Vinale et al., 2009a	no	no	no	no
Atroviridin	Actividad antagónica y micoparasitaria	1962.13	C92H151N23O24			Zelazowska et al., 2007	no	no	no	no
Aurocitrin	Anti cancerígeno, antibiótico	286.1569	C18H22O3			Berkaew et al., 2008	no	no	no	no
Chrisopanól	Neuroprotector	254.0579	C15H10O4			Zhao et al., 2018	no	no	no	no
Ciclonerodiol	Inhibidor de crecimiento	223.1698	C14H23O2	0.001 M	Inhibió el crecimiento de coleóptilos de trigo hasta en un 61%	Cutler et al., 1991b	no	no	no	no
Coningininas (A y C)	Antifúngico, regulador del crecimiento de plantas	284.1988	C16H28O4	10 -3 M	Inhibición de coleóptilos de trigo etiolados	Cutler et al. 1991a; Ghisalberti and Rowland 1993, Parker et al. 1995a, b	no	si	si	no
Coningininas B y E	Inhibidor de crecimiento	282.3988	C16H26O4	10 -3 M	Inhibición completa del crecimiento de coleóptilos de trigo etiolados	Cutler et al., 1991a , Parker et al., 1995a)	no	no	no	no
Ergosterol	Reduce la difusión lateral de los lípidos y aumenta el grosor de la bicapa	396.3392	C28H44O			Ermakova y Zuev 2017	no	no	no	no
Ferrococina	Transporte de hierro	717.3293	C28H47N9O13			Lina y Neilands 1973	no	no	no	no
Fleophilona	Inhibición de proteína REV	441.179	C24H27NO7	hasta 200 µg/mL		Quan-Cutrone et al., 1996	no	no	no	no
Gliotoxina	Supresor del sistema inmune	326.0395	C13H14N2O4S2			Bhatnagar y Kim 2015	no	no	no	no
Harzianolide	Antifúngico, regulador del crecimiento de plantas	222.1256	C13H18O3	1 mg / L	Crecimiento y la respuesta de defensa en plántulas de Brassica napus y Solanum lycopersicum	Vinale et al. 2006, 2008	no	no	si	no
Harzianopiridona	Inhibidor de crecimiento	281.1263	C14H19NO5	10 -3 M	Inhibición completa y citotoxicidad	Cutler y Jacyno 1991	no	no		no
Massoilactone	Control biológico	168.115	C10H16O2			Ishikawa et al., 2003	no	no	no	no
Melanoxadina	Inhibidor de la biosíntesis de la melanina	169.0739	C8H11NO3			Hashimoto et al., 1995	no	no	no	no
Mevastatin	Antienviejamiento	390.2406	C23H34O5			Sikorski 2007	no	no	no	no
Pachybasin	Antifúngico, antiviral, anticancerígeno	238.063	C15H10O3			Liu et al., 2009	no	si	no	no
Trichocarane C	Inhibidor de crecimiento	256.2038	C15H28O3	10 -3 M	Inhibidor en coleóptilos trigo ahiladas (hasta 80%)	Macias et al. 2000	no	no		no
Trichocaranes A y B	Inhibidor de crecimiento	254.1882	C15H26O3	10 -4 M	Inhibidor en coleóptilos trigo ahiladas (hasta 40%)	Keswani et al., 2014	no	no	no	no
Trichopolyns	Insecticida	1187.826	C61H109N11O12			Sugat T. et al., 2015	no	no	no	no
trichosetina	Inhibidor de crecimiento	302.163	C17H22N2O3	10 µg / ml	Inhibidor del crecimiento de raíces y brotes en ensayos de crecimiento de plántulas de Oryza sativa (87% y 32%), Vigna radiata (67% y 68%, respectivamente), Medicago sativa (82 % y 81%, respectivamente), Capsicum frutescens (93% y 67%, respectivamente) y Lycopersicum esculentum (91% y 88%, respectivamente)	Marfori et al. (2002	no	no	no	no
Viridín	Antimicótico de amplio espectro, antineoplásico, antiaterosclerosis	352.0947	C20H16O6			Brian y McGowan 1945	no	no	no	no
Viridiofungin C	Antifúngico	614.3203	C33H46N2O9			Mandala S. et al., 1997	no	no	no	no
Viridiol	Herbicida y antienviejamiento	354.1103	C20H18O6			Sakuno et al. 2000; Heraux et al. 2005b	no	no	si	si
α-phellandrene	Antimicrobiano	136.1252	C10H16	4 mg/mL		İşcan et al., 2012	no	no	no	no

Anexo B

Tabla 4. Protocolo seguido para la determinación de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales de coleoptilo y raíz de maíz Chalqueño.

a) Coleoptilo

Tubos eppendorf	Medio de hidrólisis (μL)	Na_3VO_4 (10mM)	Mezcla de inhibidores	Proteína (10 μg)	Extracto (8 μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150 μL)
1	140.75	-	-	9.25 μL	↓	↓	0	↓
2		-	-				0.5	
3		-	-				1	
4	137.75	3 μL	-	↓			1.5	
5		↓	-				2	
6		↓	-				2.5	
7	119.75	-	21 μL	↓			3	
8		-	↓				3.5	
9		-	↓				4	
10	140.75	-	-	9.25 μL (Buffer)			4.5	
11		-	-				5	
12		-	-				5.5	
13	140.75	-	-	150 μL	↓	↓	-	-
14		-	-	SDS+ 9.25 μL (prot)	↓	↓	-	-
15		-	-	-	↓	↓	-	-

b) Raíz

Tubos eppendorf	Medio de Hidrólisis (μL)	Na_3VO_4 (10mM)	Mezcla de inhibidores	Proteína (10 μg)	Extracto (μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150 μL)
1	132.75	-	-	7.40 μL	↓	↓	0	↓
2		-	-				0.5	
3		-	-				1	
4	129.75	3 μL	-	↓			1.5	
5		↓	-				2	
6		↓	-				2.5	
7	111.75	-	21 μL	↓			3	
8		-	↓				3.5	
9		-	↓				4	
10	132.75	-	-	7.40 μL (Buffer)			4.5	
11		-	-				5	
12		-	-				5.5	
13	132.75	-	-	150 μL	↓	↓	-	-
14		-	-	SDS+ 7.40 μL (prot)	↓	↓	-	-
15		-	-	-	↓	↓	-	-

*MI: Mezcla de inhibidores compuesta de KNO_3 (1M), NaN_3 (100 mM), Na_2MoO_4 (100 mM)

*MH: Medio de hidrólisis

Tabla 5. Protocolo seguido para la determinación de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales de raíz de maíz Chalqueño, utilizando la **Fracción Hexánica.**

Tubos eppendorf	MH (μL)	MI (μL)	Fracción / Solvente (μL)	F. Microsomal (μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150μL)
1.1	146.7		150μL SDS +	-	↓	-	-
1.2			3.3 SDS μL	-		-	
1.3			Prot	-		-	
F. Hexánica							
1	146.45	-	0.25	3.3 ↓	20' a 30°C ↓	0	150μL ↓
2	146.2	-	0.5				
3	145.95	-	0.75				
4	145.7	-	1				
5	145.2	-	1.5				
6	144.7	-	2				
7	143.2	-	3.5				
8	141.7	-	5				
9	125.45	21 ↓	0.25				
10	125.2		0.5				
11	124.95		0.75				
12	124.7		1				
13	124.2		1.5				
14	123.7		2				
15	122.2		3.5				
16	120.7		5				
DMF							
17	146.45	-	0.25	3.3 ↓	20' a 30°C ↓	8	150μL ↓
18	146.2	-	0.5				
19	145.95	-	0.75				
20	145.7	-	1				
21	145.2	-	1.5				
22	144.7	-	2				
23	143.2	-	3.5				
24	141.7	-	5				
25	125.45	21 ↓	0.25				
26	125.2		0.5				
27	124.95		0.75				
28	124.7		1				
29	124.2		1.5				
30	123.7		2				
31	122.2		3.5				
32	120.7		5				

Tabla 6. Protocolo seguido para la determinación de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales de raíz de maíz Chalqueño, utilizando la Fracción de Acetato de etilo.

Tubos eppendorf	MH (μL)	MI (μL)	Fracción / Solvente (μL)	F. Microsomal (μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150μL)
1.1	146.7		150μL SDS + 3.3 SDS μL Prot	-	↓	-	-
1.2				-		-	
1.3				-		-	
AcEtOH							
1	146.45	-	0.25	3.3 ↓	20'a 30°C ↓	0	150μL ↓
2	146.2	-	0.5				
3	145.95	-	0.75				
4	145.7	-	1				
5	145.2	-	1.5				
6	144.7	-	2				
7	143.2	-	3.5				
8	141.7	-	5				
9	125.45	21 ↓	0.25				
10	125.2		0.5				
11	124.95		0.75				
12	124.7		1				
13	124.2		1.5				
14	123.7		2				
15	122.2		3.5				
16	120.7		5				
DMF							
17	146.45	-	0.25	3.3 ↓	20'a 30°C ↓	8	150μL ↓
18	146.2	-	0.5				
19	145.95	-	0.75				
20	145.7	-	1				
21	145.2	-	1.5				
22	144.7	-	2				
23	143.2	-	3.5				
24	141.7	-	5				
25	125.45	21 ↓	0.25				
26	125.2		0.5				
27	124.95		0.75				
28	124.7		1				
29	124.2		1.5				
30	123.7		2				
31	122.2		3.5				
32	120.7		5				

Tabla 7. Protocolo seguido para la determinación de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomales de raíz de maíz Chalqueño, utilizando la **Fracción Acuosa**.

Tubos eppendorf	MH (μL)	MI (μL)	Fracción / Solvente (μL)	F. Microsomal (μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150 μL)	
1.1	146.7		150 μL SDS +	-	↓	-	-	
1.2			3.3 SDS μL	-		-		
1.3			Prot	-		-		
F. Acuosa								
1	146.45	-	0.25	3.3 ↓	20'a 30°C ↓	0	150 μL ↓	
2	146.2	-	0.5			0.5		
3	145.95	-	0.75			1		
4	145.7	-	1			1.5		
5	145.2	-	1.5			2		
6	144.7	-	2			2.5		
7	143.2	-	3.5			3		
8	141.7	-	5			3.5		
9	125.45	21 ↓	0.25			4		
10	125.2		0.5			4.5		
11	124.95		0.75			5		
12	124.7		1			5.5		
13	124.2		1.5			6		
14	123.7		2			6.5		
15	122.2		3.5			7		
16	120.7		5			7.5		
S/Disolvente								
17	146.7 ↓	-	-	3.3 ↓	20'a 30°C ↓	8	150 μL ↓	
18		-	-			8.5		
19		-	-			9		
20		-	-			9.5		
21		-	-			10		
22		-	-			10.5		
23		-	-			11		
24		-	-			11.5		
25	125.7 ↓	21 ↓	-	3.3 ↓	20'a 30°C ↓	12	150 μL ↓	
26			-			-		12.5
27			-			-		13
28			-			-		13.5
29			-			-		14
30			-			-		14.5
31			-			-		15
32			-			-		15.5

Tabla 8. Protocolo seguido para la determinación de hidrólisis de ATP en las fracciones microsomas de raíz de maíz Chalqueño, utilizando **6PP**.

Tubos eppendorf	MH (μL)	MI (μL)	Fracción / Solvente (μL)	F. Microsomal (μL)	20 min a 30°C	t (min)	SDS (150 μL)
1.1	146.7		150 μL SDS +	-	↓	-	-
1.2			3.3 SDS μL	-		-	
1.3			Prot	-		-	
6-pp							
1	146.2	-	0.5	3.3 ↓	20' a 30°C ↓	0	150 μL ↓
2	145.7	-	1			0.5	
3	145.2	-	1.5			1	
4	144.45	-	2.25			1.5	
5	143.7	-	3			2	
6	142.95	-	3.75			2.5	
7	142.2	-	4.5			3	
8	141.45	-	5.25			3.5	
9	125.2	21 ↓	0.5			4	
10	124.7		1			4.5	
11	124.2		1.5			5	
12	123.45		2.25			5.5	
13	122.7		3			6	
14	121.95		3.75			6.5	
15	121.2		4.5			7	
16	120.45		5.25			7.5	
EtOH							
17	146.2	-	0.5	3.3 ↓	20' a 30°C ↓	8	150 μL ↓
18	145.7	-	1			8.5	
19	145.2	-	1.5			9	
20	144.45	-	2.25			9.5	
21	143.7	-	3			10	
22	142.95	-	3.75			10.5	
23	142.2	-	4.5			11	
24	141.45	-	5.25			11.5	
25	125.2	21 ↓	0.5			12	
26	124.7		1			12.5	
27	124.2		1.5			13	
28	123.45		2.25			13.5	
29	122.7		3			14	
30	121.95		3.75			14.5	
31	121.2		4.5			15	
32	120.45		5.25			15.5	