



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*PERFIL DE EXPRESIÓN DE LOS SWEETS EN HOJAS DE
PLANTAS DE MAÍZ INFECTADAS POR DOS CEPAS DE
FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

DANIELA MUÑOZ CHAPUL

TUTOR-DIRECTOR DE TESIS

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUSTENTANTE:

Daniela Muñoz Chapul

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis: “**Perfil de expresión de los SWEETs en hojas de plantas de maíz infectadas por dos cepas de *Fusarium verticillioides***”, fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** en el Laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece también a la M. en C. Beatriz King Díaz y a la Dra. Montserrat López Coria por el apoyo técnico proporcionado durante la realización del trabajo experimental de esta tesis.

El trabajo fue financiado por:

Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto A1-S-17269.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN220217 y IN225220.

Se agradece también a los miembros del jurado Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y Dr. Francisco Ruiz Terán por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

Índice General

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
Importancia del maíz.....	10
Pérdidas de cultivos asociadas a patógenos.....	11
<i>Fusarium verticillioides</i> hongos patógeno del maíz.....	12
Micotoxinas producidas por <i>Fusarium verticillioides</i>	14
Respuesta de la planta ante la presencia de microorganismos.....	17
Transporte de azúcares en plantas.....	19
Transportadores SWEET.....	24
Papel fisiológico de los SWEET.....	24
Participación de los SWEETs en la interacción planta-patógeno.....	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Preparación y calibración del inóculo de <i>Fusarium verticillioides</i>	32
Crecimiento de hongo.....	32
Conteo de conidios.....	32
Mantenimiento de las Cepas de <i>F. verticillioides</i>	33
Infección de las semillas de maíz Chalqueño con <i>F. verticillioides</i>	33
Desinfección de las semillas de maíz.....	33
Infección de semillas de maíz.....	34
Transplante de plantas a maceta.....	34
Evaluación del efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> sobre el crecimiento del maíz.....	34
Medición del crecimiento del tallo.....	34
Cuantificación de clorofila total.....	35
Análisis de la expresión de los transportadores SWEETs.....	35
Extracción de RNA de tejido foliar.....	35
Cuantificación, visualización en gel de agarosa y calibración de RNA total.....	36
Obtención de cDNA reacción transcriptasa reversa (RT).....	37
Reacción RT-PCR punto final (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa punto final).....	37
Análisis de los genes de defensa.....	39

Reacción de qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real).....	40
Estandarización de las condiciones para qRT-PCR.....	41
Cuantificación de la expresión de los SWEET por qRT-PCR.....	43
RESULTADOS	44
Características de crecimiento macroscópico y microscópico de las cepas de <i>Fusarium verticillioide MY3 Y MY5</i>	45
Establecimiento de las condiciones de infección con <i>Fusarium verticillioides</i> de las semillas de maíz de maíz Chalqueño.....	46
Efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> en plantas de maíz Chalqueño.....	50
Efecto de <i>F. verticillioides</i> sobre la expresión de los genes de defensa de la planta y del gen de patogenicidad del hongo (<i>FUM</i>).....	53
Obtención y calibración del RNA, y optimización de las condiciones de amplificación por PCR punto final de los SWEETs 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 de maíz.....	56
Expresión de los transportadores SWEET 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 durante la interacción de <i>F. verticillioides</i> en plantas de maíz por PCR punto final.....	57
Análisis de la expresión de los transportadores SWEET 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 tras la interacción de <i>F. verticillioides</i> en plantas de maíz por PCR tiempo real.....	59
DISCUSIÓN	60
<i>Fusarium verticillioides</i> cepa MY3 se propaga más en semillas y plantas de maíz que la cepa MY5.....	60
Expresión de los SWEET de hojas se reduce cuando se encuentra infectada por la planta por <i>Fusarium verticillioides MY3</i>	63
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	68
ANEXOS	75

Índice de figuras

Figura 1. Mazorca de la raza Chalqueño.....	11
Figura 2. Estructura microscópica, características de <i>Fusarium verticillioides</i>	12
Figura 3. Estructura de la FB1.....	15
Figura 4. Blancos moleculares de la FB1.....	17
Figura 5. Transporte de azúcares en plantas.....	22
Figura 6. Desarrollo experimental.....	31
Figura 7. Vista de la cámara de Neubauer.....	33
Figura 8. Curva de disociación de la amplificación para SWEET 4a y el gen endógeno 18s. A. SWEET 4a y B	42
Figura 9. Curva de calibración para la obtener el % E.....	43
Figura 10. Crecimiento macroscópico de <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5.....	44
Figura 11. Crecimiento microscópico de <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5.....	45
Figura 12. Efecto de <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 sobre la germinación y crecimiento de las semillas de maíz a las 24 h de germinación	48
Figura 13. Efecto de <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 sobre el crecimiento y germinación de las semillas de maíz a las 48 h de germinación	49
Figura 14. Efecto en el crecimiento de la parte aérea de plantas a los 7 días de infección de semillas a diferentes con <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5	50
Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas de <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 en plantas de 2 semanas de crecimiento	51
Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 en el contenido de clorofila en la parte aérea de plantas de 2 semanas de crecimiento.....	52
Figura 17. Efecto de la cepa <i>F. verticillioides</i> MY3 en la expresión de los genes de defensa y FUM1 en la parte aérea de plantas de 2 semanas a través PCR punto final...54	
Figura 18. Efecto de las cepas <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 en la expresión de los genes de defensa en la parte aérea de plantas de 2 semanas de crecimiento.....	55
Figura 19. Separación en gel de agarosa del RNA de la parte aérea de la planta de maíz de dos semanas de crecimiento.....	57
Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 en la expresión de los SWEETs en la parte aérea de plantas de 2 semanas en PCR- punto final	58
Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas <i>F. verticillioides</i> MY3 y MY5 en la expresión de los SWEETs en la parte aérea de plantas de 2 semanas de crecimiento.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Mezcla de reacción empleada en la reacción de Transcriptasa Reversa.....	37
Tabla 2. Número de acceso de las secuencias de los SWEETs analizados y oligonucleótidos diseñados para su amplificación por PCR punto final.....	38
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para PCR punto final.....	38
Tabla 4. Condiciones empleadas para la PCR punto final.....	39
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de proteínas de defensa.....	39
Tabla 6. Número de acceso de las secuencias de los SWEETs analizados y oligonucleótidos diseñados para su amplificación por PCR en tiempo real.....	40
Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real.....	41
Tabla 8. Condiciones de infección de las semillas de maíz con <i>F. verticillioides</i>	47

ABREVIATURAS

AOS	Aleno óxido sintasa	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa punto final
ASR	Resistencia sistémica adquirida	PDA	Papa-Dextrosa-Agar
ATP	Adenosina Trifosfato	PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
cDNA	DNA templado	q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad	RNA	Ácido ribonucleico
DEPC	Dietil pirocarbonato	RT	Transcriptasa reversa
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato	SA	Ácido salicílico
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SAR	Resistencia Sistémica adquirida
FB1	Fumonisina 1	STP	Sugar Transport Protein (proteína transportadora de hexosas)
ISR	Resistencia sistémica inducida	SUT	Sucrose Transporter (transportador de sacarosa)
JA	Ácido jasmónico	SWEET	Transportador difusional de azúcares.
PAL	Fenilalanina amino liasa	TAL	Transcription activator like (semejante a un activador transcripcional)

RESUMEN

Las plantas tienen la capacidad de sintetizar azúcares en los tejidos fotosintéticos y de repartirlos a las partes que son incapaces de generarlos. Una de las vías para repartir el carbono en la planta es el transporte difusional a través de transportadores membranales. El movimiento masivo de azúcares es necesario para el llenado del floema, el desarrollo del polen, la secreción de azúcares por los nectarios y las raíces y la germinación. La expresión de los genes de los transportadores difusionales tipo SWEET no solo está regulada en los distintos tejidos durante el desarrollo sino también responden a estímulos ambientales. *Xantomonas oryzae patovar oryzae* secreta efectores que activan la transcripción de los SWEETs para favorecer la salida de azúcares al apoplasto y promover la colonización de la bacteria en arroz. Se desconoce si en maíz hay SWEETs que puedan ser regulados transcripcionalmente por patógenos, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de los SWEETs en la parte aérea de las plántulas de maíz raza Chalqueño que fueron infectados por dos diferentes cepas del principal hongo patógeno del maíz, *Fusarium verticillioides*, MY3 y MY5, alta y baja productora de la micotoxina FB1, respectivamente. El tratamiento de las semillas con 10000 conidios de la cepa MY3/semilla redujo el crecimiento de la plántula a las 48 h de crecimiento. Sin embargo, a los 14 días no se encontraron diferencias en el crecimiento aéreo y el contenido de clorofila de las hojas de las plantas tratadas con los hongos en comparación con el control. Las hojas sí se encontraban infectadas, puesto que los transcritos para *FUM1*, el primer gen de la síntesis de FB1 en el hongo se encontraba presentes. También se encontraron de manera abundante los transcritos para la fenilalanina amonio liasa (*PAL*) y aleno óxido sintasa (AOS), sugiriendo que *F. verticillioides* es reconocido por las defensas de la planta. El análisis por PCR tiempo real del contenido de transcritos para los SWEETs que se expresan en hoja, SWEET1b, 4a, 13b, 13b y 17 mostró que la abundancia de todos ellos fue menor cuando las hojas proceden del tratamiento de las semillas con el hongo altamente productor de fumonisinas, la cepa MY3. Mientras que la cepa MY5 infecta a las plantas, pero no modificó la expresión de los SWEETs. A pesar de que ambas cepas de *F. verticillioides* son capaces de activar las defensas de la planta, los SWEETs de maíz solo fueron regulados transcripcionalmente cuando el maíz fue infectado con la cepa MY3. Es posible que tanto la planta como cada una de las cepas probadas tengan mecanismos distintos para responder durante la interacción planta-patógeno, por lo que es necesario determinar si la FB1 tiene un papel en la represión de la expresión de los SWEETs o si es una estrategia de la planta para evitar donar carbono al patógeno y continuar su desarrollo.

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL MAÍZ

El maíz (*Zea mays L.*) pertenece a la familia de las Gramíneas, ocupa el tercer lugar en la producción mundial después del trigo y el arroz. Es un cereal que se adapta a diversas condiciones ecológicas (Bonilla-Morales, 2009) a partir de una amplia diversidad genética. Se emplea para la producción de tortillas, forraje para animales, almidones e insumos en la generación de biocombustible, entre muchos otros usos (Castro-del Ángel, 2011).

El maíz es una planta anual con un gran desarrollo vegetativo, que puede alcanzar de 2 a 2.5 m de altura, pudiendo llegar hasta los 5 m. Posee un sistema radicular fasciculado bastante extenso formado por tres diferentes tipos de raíces. Cuenta con un tallo regularmente cilíndrico nudoso y macizo con 15 a 30 hojas alargadas y angostas que se distribuyen a lo largo del tallo en forma distinta y alterna, abrazando la base del tallo. Es una planta monoica, es decir, posee flor masculina, la cual se presenta como espiga o panoja agrupándose en una panícula terminal en el extremo superior del tallo; también presenta flor femenina y se agrupa en una ramificación lateral gruesa, de forma cilíndrica cubierta por brácteas foliadas, denominadas hojas envolventes (Deras-Flores, *S.F.*).

El maíz presenta una gran variabilidad en color del grano, textura, composición y apariencia. en América Latina se han descrito cerca de 220 razas¹ de maíz, de las cuales 64 se han identificado y descrito en su mayoría, para México; dentro de éstas se encuentra el maíz Chalqueño (CONABIO, 2017), que presenta una amplia disponibilidad en la región oriental del Estado de México (Herrera-Cabrera *et al.*, 2004), sus plantas son de porte alto, mazorcas grandes y de forma piramidal. El grano es dentado de color cremoso y tiene alto número de hileras (Fig.1). Presenta alto vigor de germinación y emergencia, ciclo largo y resistencia a la sequía en etapas medias de crecimiento (CONABIO, 2017).

¹ El termino raza se ha utilizado en el maíz para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, las razas se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales, los cuales se asocian a una distribución geográfica y climática más o menos definida y a una historia evolutiva común (CONABIO, 2017).



Figura 1. Mazorca de la raza Chalqueño. Tomada de CONABIO, 2017.

De acuerdo a SIAP en 2016 se cultivó una superficie de 21 millones de hectáreas donde el 35.4 % corresponde a la superficie sembrada por maíz (en todas sus variedades) siendo el 32 % de la superficie total, maíz blanco, variedad destinada a la alimentación de los mexicanos (SIAP, 2017).

PÉRDIDAS DE CULTIVOS ASOCIADAS A PATÓGENOS

Ante el crecimiento acelerado de la población, la demanda de alimentos es el principal motivo para incrementar la producción de las plantas cultivadas. El consumo *per capita* de maíz se calcula en 300 g/día, que aporta el 56 % de las calorías y el 47 % de las proteínas de la alimentación. En las áreas rurales estos porcentajes son 70 % y 56 %, respectivamente. Sin embargo, Reyes-Velázquez (2001) menciona que la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) estima una pérdida entre 5 y 10 % en los granos alimenticios cosechados, en América Latina las pérdidas varían de 25 a 50 %, principalmente debido al proceso post-cosecha y a la infección con diferentes organismos a lo largo de su procesamiento (Antonio-Velázquez, 2004).

Algunos factores que limitan la producción del maíz y su calidad de cosecha son las plagas y enfermedades causadas por hongos, bacterias, fitoplasmas, virus, nematodos, insectos, plantas parásitas entre otros, las cuales pueden atacar a la planta desde el inicio de su crecimiento, durante la cosecha, post-cosecha y en el almacén (Arispe-Velázquez, 2014).

El clima húmedo y cálido bajo el que crece gran parte del maíz en los trópicos es sin duda, favorable al crecimiento y a la dispersión de los patógenos causantes de las enfermedades, generando importantes daños económicos a su producción. Adicionalmente, el maíz al momento de ser cosechado puede llegar a tener más del 30 % de humedad, aspecto que puede ocasionar pérdidas post-cosecha (FAO, 2017), lo cual trae consigo grandes consecuencias económicas. Se estima que la producción de maíz ha disminuido desde 2003 en un 9.4 % por la presencia de patógenos bacterianos y fúngicos (Oerke, 2006).

Las semillas son importantes fuentes de inóculo de innumerables patógenos, resaltando entre ellos la familia de los hongos del género *Fusarium*, probablemente debido a que estos poseen múltiples mecanismos de infección y patogenicidad, uno de ellos es la producción y secreción de micotoxinas (Arispe-Velázquez, 2014). Uno de los hongos de gran interés por su distribución mundial y de mayor incidencia en las plantas es *F. verticillioides* (Reyes-Velázquez, 2001).

***FUSARIUM VERTICILLIOIDES* HONGO PATÓGENO DEL MAÍZ**

Los hongos constituyen un gran grupo de organismos de los cuales se han descrito aproximadamente 100,000 especies. Son eucarióticos, la mayoría multicelulares formando un entramado de filamentos denominados hifas cuyas paredes celulares tubulares rodean la membrana. Algunas hifas pueden formar ramas aéreas donde se desarrollan las esporas asexuales denominadas conidios, los cuales ayudan en la dispersión del hongo (de la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Los hongos pueden causar enfermedades con relevancia económica en plantas cultivadas como es el caso de *F. verticillioides* en el maíz, el cual es de distribución mundial, el hongo es frecuentemente aislado del maíz, prácticamente de cualquier órgano de la planta, (de la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

F. verticillioides es un ascomiceto, que presenta una fase sexual. En el estado anamorfo o de reproducción asexual hay abundante producción de microconidias (Fig. 2), sin embargo,

algunas cepas también generan macroconidias que están en el aire (de la Torre-Hernández *et al.*, 2014). *F. verticillioides* es un patógeno cosmopolita presente en la mayoría de los suelos donde ha crecido el maíz (Cantú-Rodríguez, 1998).

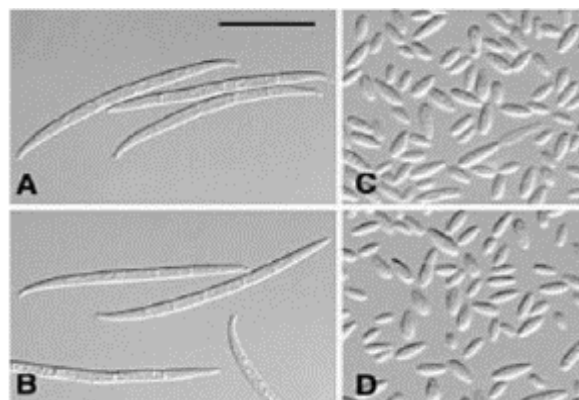


Figura 2. Estructuras microscópicas, características de *Fusarium verticillioides*. A, B: Macroconidios, C, D: Microconidios. (SAGARPA, 2011)

F. verticillioides es un hongo hemibiotrófo, es decir tiene la capacidad de infectar a la planta y mantenerse en ella como biótrofo o bien convertirse en necrótrofo cuando las condiciones ambientales así lo favorecen. Durante los periodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biótrofa, al grado de sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles (Munkvold y Desjardins, 1997). Las semillas de maíz infectadas pueden ser el paso inicial para producir una planta enferma en todos los estados del desarrollo, aunque sin síntomas visibles. Durante la fase de necrótrofo el hongo causa la muerte del tejido hospedero, para posteriormente sobrevivir como saprófito obteniendo los nutrientes del tejido muerto (Cantú-Rodríguez, 1998; Levin *et al.*, 2003; de la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Durante sus dos fases de crecimiento los hongos del género *Fusarium* producen micotoxinas que contribuyen a su virulencia, y si éstas se acumulan en el tejido vegetal pueden ser nocivas cuando son consumidas por humanos y animales (Rutherford *et al.*, 2002). En los tejidos enfermos se encuentran altas concentraciones de fumonisinas (FBs) y en la fase asintomática

con frecuencia contiene bajas concentraciones; esto es importante para la salud del ser humano (Cantú-Rodríguez, 1998).

La alta incidencia de *Fusarium* en el maíz se debe a varias causas, una de ellas es a las múltiples rutas de entrada de este en la planta, ocasionando enfermedades distintas (De la Torre-Hernández *et al.* 2014; Dotor-Robayo y Cabezas-Gutiérrez, 2014): **a)** Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico, el daño en la mazorca es generalmente ocasionado por insectos que al horadar los granos arrastran los conidios a los tejidos; **b)** Infección de la mazorca por medio del estigma, los conidios son transportados por el aire o el agua y se depositan en el estigma lo que facilita el acceso a las células del pericarpio, llevando a que las hifas del hongo se extiendan al grano y **c)** Infección sistémica de las plantas, la cual ocurre con la germinación de la semilla y permite que durante su desarrollo se extienda a diferentes tejidos de la planta.

Agrios (2005) citado por Briones (2013) indica que las enfermedades causadas por los hongos patógenos se ven favorecidas por el clima seco, que estresa a las plantas jóvenes en la fase temprana del cultivo y también se ven favorecidas por el clima húmedo antes y después de la floración femenina, condición que puede acentuarse por la alta densidad de plantas, altas concentraciones de nitrógeno y bajos niveles de potasio en la planta.

MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diversas especies de hongos, *F. verticillioides* es capaz de generar cantidades importantes de micotoxinas además de enzimas líticas que contribuyen a su proceso de infección (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014, Reyes-Velázquez, 2001). Las principales micotoxinas producidas por *F. verticillioides* son la moniliformina, fusarina C, ácido fusárico y las fumonisinas siendo las fumonisinas las de mayor abundancia y de las cuales se tiene un posible aspecto relevante en el papel de virulencia del hongo (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014). De hecho, aproximadamente el 25 % de los cultivos alimentarios del mundo son afectados cada año por las micotoxinas

siendo la contaminación por fumonisinas las de mayor importancia (Mwalwayo y Thole, 2016).

Las fumonisinas fueron aisladas y purificadas por primera vez en 1988, son un grupo de metabolitos secundarios derivados hidrocarbonados con varios grupos funcionales. Hasta la fecha se han identificado 28 análogos de fumonisinas los cuales se pueden agrupar en 4 grupos: A, B, C y P. Las fumonisinas más abundantes de incidencia natural son las del grupo B, la mayoría derivadas de las cepas de *F. verticillioides*. Las fumonisinas B o FB contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificado en C-14 y C-15. Estos compuestos difieren en la presencia o en la ausencia de un grupo hidroxilo (-OH) en C-5 y C-10. Dentro de esta familia se encuentran FB₁, FB₂ y FB₃, sin embargo, la FB₁ (Fig. 3), es la que conforma más del 75 % del total de las fumonisinas, y es considerada la de mayor relevancia y el derivado más tóxico (Cantú-Rodríguez, 1998; De la Torre-Hernández *et al.*, 2010; Mwalwayo y Thole, 2016).

Los efectos patogénicos debidos a la ingesta de fumonisinas en animales incluyen leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino, hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad en ratas y nefrotoxicidad. El consumo de maíz contaminado se ha asociado con un elevado riesgo de cáncer de esófago humano en la región de Transkei en Sudáfrica y China (Mwalwayo y Thole, 2016 y Cantú-Rodríguez, 1998).

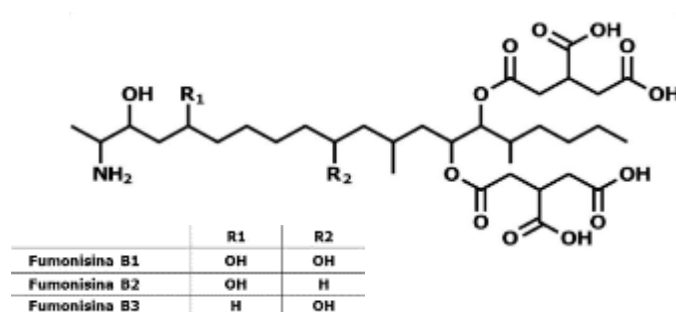


Figura 3. Estructura de las fumonisinas tipo B. (De la Torre-Hernández *et al.* 2014)

Uno de los mecanismos de la acción tóxica de las fumonisinas reside en la afectación de la vía de síntesis de esfingolípidos, de manera específica inhibe en el retículo endoplásmico a un grupo de enzimas, las ceramidas sintetas que catalizan la formación de las ceramidas a partir de las bases esfingoideas, esfinganina o esfingosina, y los sustratos acilos, por lo anterior también se denominan esfinganina N-aciltransferasa o esfingosina N-aciltransferasa (Fig. 4). La inhibición de las ceramidas por FB1 lleva a un desbalance en la concentración de esfingolípidos complejos que son importantes componentes de las membranas y también como participantes de algunos procesos de señalización en las células como la muerte celular programada (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020; Delgado *et al.*, 2006). También los efectos de la FB1 sobre el metabolismo de lípidos resultan en un aumento en el estrés oxidativo, así como apoptosis y necrosis. Se cree que la apoptosis alterada y la mitosis contribuyen a la carcinogénesis a través de un desequilibrio de la muerte y la división celular (Mwalwayo y Thole, 2016; De la Torre-Hernández *et al.*, 2010).

Adicionalmente, se ha identificado que en maíz la FB1 tiene otros dos blancos moleculares (Fig. 4): la ATPasa de protones de membrana plasmática (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005) y la β -1,3-glucanasa básica (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012). La ATPasa de protones es una enzima membranal que transporta protones del citoplasma al apoplasto a expensas de la hidrólisis del ATP. Con su actividad modifica el potencial eléctrico de la membrana y genera un gradiente pH, lo que puede ser usado para activar enzimas localizadas en la pared celular para permitir el reblandecimiento de la pared celular, además de que los protones pueden entrar a la célula acompañados de otros solutos para nutrirlas, ambos requisitos favorecen la elongación celular. La inhibición de la ATPasa de protones podría contribuir al efecto observado de reducción en la elongación de la raíz y el tallo (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). Mientras que las β -1,3-glucanasas son enzimas con actividad hidrolítica que se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas, principalmente ante el ataque de hongos filamentosos. El blanco de dicha enzima es el glucano, principal compuesto estructural de la pared celular fúngica. Se ha visto que la FB1 modula la actividad de tres β -1,3-glucanasas de maíz, involucradas en la defensa de la planta, para permitir la colonización de *F. verticillioides* en embriones de maíz (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

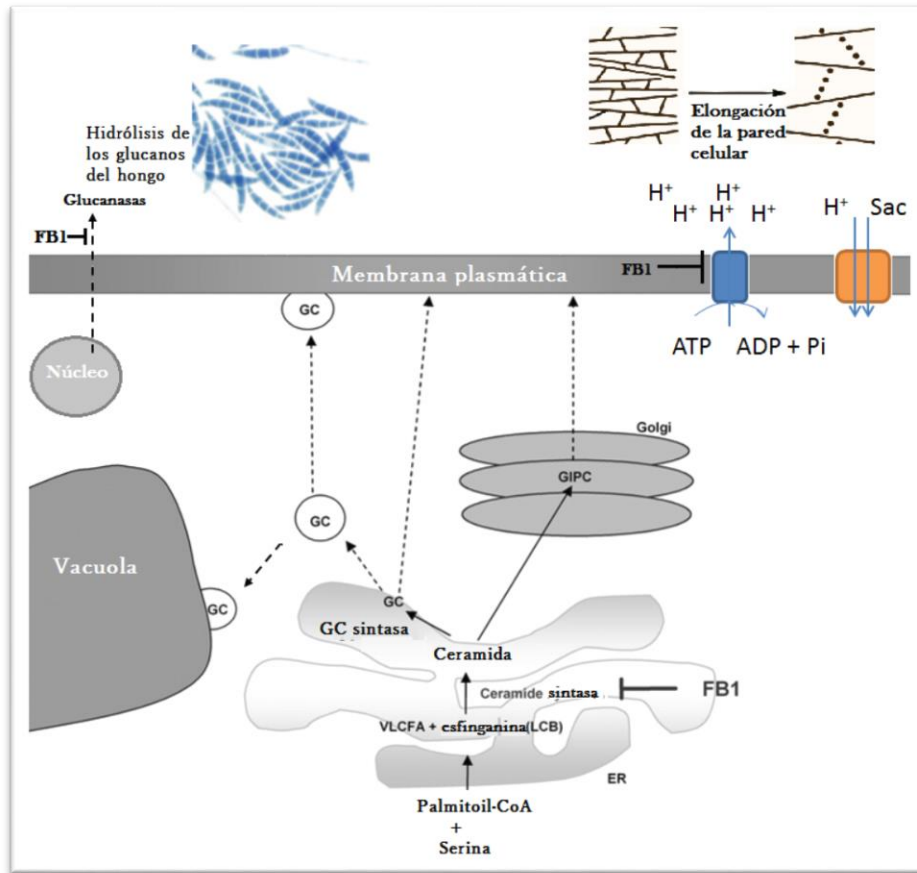


Figura 4. Blancos moleculares de la FB1. La micotoxina inhibe a la ceramida sintasa en el retículo endoplásmico, a la ATPasa de protones de la membrana plasmática y afecta a las glucanasas a varios niveles, aquí se representa la inhibición de su síntesis. ER, retículo endoplásmico; GC, glucosilceramida; GIPC, glicosilinositol fosforilceramida; LCBS, bases de cadena larga; VLCFA, componentes de ácido grasos de cadena muy largo.

RESPUESTA DE LA PLANTA ANTE LA PRESENCIA DE MICROORGANISMOS

Las plantas responden ante el ataque de un agente extraño, con defensas ya preformadas también llamadas constitutivas o bien con sistemas que se inducen ante la presencia del agresor. Dos vías de defensa se producen en la planta ante la presencia de un estrés biótico son la vía de resistencia sistémica adquirida (SAR) y el sistema de resistencia inducida (ISR),

siendo sus principales moléculas de señalización durante la respuesta ante el patógeno, el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), respectivamente (Dotor- Robayo y Cabezas-Gutiérrez, 2014; Camarena-Gutiérrez, 2007).

La percepción local de un patógeno biótrofo lleva a la planta a activar la vía SAR. Las células locales o adyacentes a donde se inicia la infección producen una respuesta denominada de hipersensibilidad, en donde para restringir la invasión del patógeno se induce una forma localizada de muerte celular y en las células adyacentes a éstas ocurre el engrosamiento de las paredes celulares por incorporación de proteínas estructurales o lignina², así como la síntesis de fitoalexinas y producción de peroxidasas, entre otras respuestas. Esto conduce al fortalecimiento mecánico y baja susceptibilidad a degradación de la pared celular. En las células más distantes o partes no infectadas, las primeras reacciones de defensa tipo SAR llevan a la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) entre las que destacan: las β -1,3-glucanasas, quitinasas e inhibidores de amilasas y proteasas (Camarena-Gutiérrez, 2007). En forma general la respuesta de hipersensibilidad lleva a la planta a la resistencia a la enfermedad.

El primer paso de la síntesis de lignina es la desaminación de fenilalanina a ácido cinámico, catalizado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), la cual constituye un marcador de la actividad de la vía SAR, también llamada del ácido salicílico (Camarena-Gutiérrez, 2007). Esto es debido a que hay una acumulación de SA en tejidos vecinos al sitio de infección. La acumulación de SA permite que este en el interior celular pueda unirse a proteínas, en específico a la enzima catalasa, cuando lo hace la inhibe, llevando a la acumulación de peróxido, el cual es parte del sistema de señalización de estrés. Normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta actividad de la catalasa es bloqueada por la unión del SA como ya se mencionó. El estallido oxidativo que sucede después de la infección por el patógeno puede tener su efecto óptimo cuando aumenta la síntesis de SA y la actividad de la catalasa es baja y entonces se induce la expresión de las proteínas PR, algunas de ellas como ya se mencionó

² La lignina se forma por polimerización y deshidrogenación de precursores producidos en la vía metabólica de fenilpropanoides.

se encargan de remodelar la pared celular que en conjunto con el peróxido acumulado puede favorecer el entrecruzamiento de las proteínas con los compuestos fenólicos de la pared celular, o un efecto microbicida (Camarena-Gutiérrez, 2007).

En contraste, la vía de defensa ISR lleva a la síntesis de JA y se activa ante situaciones de estrés como heridas, ataque por patógenos necrótrofos, plagas, exposición a sequía y ozono. Adicionalmente, el JA producido participa en diversos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Riveros-Angarita, 2010). La biosíntesis del JA usa como sustratos los lípidos de la membrana como el ácido linoléico y una de las enzimas clave de la vía es la aleno óxido sintasa (AOS), utilizada como principal marcador del encendido de la vía. El JA y sus derivados pueden sintetizarse en toda la planta, pero tienen mayor actividad en tejidos en crecimiento como ápices de tallos, raíces, hojas jóvenes y frutos inmaduros. En hojas de papa y tomate al activarse la vía del JA se induce la expresión de genes que codifican para la biosíntesis de inhibidores de proteinasas, mientras que, en cebada, soja y fríjol, las lipooxigenasas y la fenilalanina-amonio-liasa (PAL) y la chalcona sintetasa. La activación de varios genes de defensa como PR1, PR3, PR4, PR5, y PDF1.2 se ha encontrado con la adición de JA o sus análogos como el metil-JA (Jordan y Casaretto, 2006).

Los microorganismos al interactuar con las plantas buscan nutrirse y desarrollarse a expensas de los productos metabólicos de ellas. Para lo cual los microorganismos desarrollan diversas estrategias que les permiten acceder a los nutrientes, mientras que las plantas pueden llegar a evadir ser fuente de nutrimentos (Doity et al., 2012).

TRANSPORTE DE AZÚCARES EN PLANTAS

La sacarosa es la principal fuente de carbono y energía en la planta, producto de la actividad fotosintética en las hojas. La alta concentración de azúcares en las hojas conduce los procesos metabólicos en estos órganos y permite también almacenar carbono en forma de almidón, así como exportar los azúcares a los tejidos que tienen baja o nula capacidad fotosintética, como las hojas jóvenes, los tallos, las flores, los frutos, las raíces y los meristemos. Estos tejidos que dependen para su nutrición de los tejidos fotosintéticos se denominan tejidos demanda,

mientras que los tejidos fotosintéticos a menudo son llamados tejidos fuente (Fig. 5; Lemoine et al., 2013).

La movilización de azúcares desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda depende del sistema vascular, de los transportadores membranales y de los plasmodesmata. El sistema vascular de las plantas está formado por el xilema y el floema. En el xilema se transportan iones y agua desde las raíces a la parte aérea de la planta, mientras que en el floema se transportan azúcares, aminoácidos y otros solutos, movilizándolos desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda.

El floema está compuesto esencialmente por tres tipos de células, las exteriores son las del parénquima, seguidas por las células acompañantes y los elementos cribosos de la savia. A través del complejo células acompañantes-elementos cribosos es por donde se lleva a cabo el paso de los fotosintatos. El transporte de solutos en el floema ocurre en tres fases, el cargado del floema, el transporte a lo largo del floema y la descarga del floema. En la primera y tercera fase el transporte ocurre a corta distancia, mientras que en la segunda fase es a larga distancia. En las tres fases del transporte en el floema pueden converger diferentes vías o tipos de transporte (Chen et al., 2012, 2013).

Transporte simplástico y apoplástico

La vía de transporte simplástica ocurre cuando un soluto se mueve a través de los citoplasmas de células adyacentes, es decir a través de los simplastos. El paso de solutos vía simplástica ocurre por ejemplo entre las células acompañantes y los elementos cribosos de la savia (Fig. 5), debido a que ambas células están conectadas a través de un conducto formado por membrana plasmática, retículo endoplásmico y proteínas, este conducto es denominado plasmodesmo. El diámetro del conducto es variable, también el número de estos en una célula. Se ha propuesto que solutos hidrofílicos como azúcares, nitrógeno y péptidos pueden pasar a través de él de manera muy rápida, pero que también hay moléculas tan grandes como de 50 kDa que pueden pasar a través del plasmodesmo. Los plasmodesmata no son conductos simétricos y presentan cierta selectividad al paso de moléculas, sin embargo, aún se desconocen muchos detalles de su especificidad, forma y la regulación que ocurre para

reducir o aumentar el diámetro del poro tanto a respuestas del desarrollo como en situaciones de estrés (Faulkener, 2018).

Por otra parte, la vía de transporte apoplástica se refiere a que el soluto sale de la célula hacia el espacio apoplástico y luego de este entra a la célula contigua, para lograrlo la célula presenta proteínas transportadoras en sus membranas. Debido a que las células del parénquima del floema se encuentran aisladas simplásticamente de las células acompañantes, los transportadores membranales de ambas células son los encargados del transporte de nutrientes (Chen et al., 2013; Slewinski et al., 2013).

Transporte activo y pasivo

Si se clasifica al transporte dependiendo de la necesidad de invertir energía para mover al soluto a través de la membrana, el transporte puede ser independiente del gasto de energía, o dependiente, y son denominados transportador pasivo o activo, respectivamente. En el transporte activo de solutos, se requiere de proteínas amfipáticas, como los transportadores primarios y los secundarios. Un transportador primario de las células vegetales es la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática, la cual lleva a cabo la hidrólisis de ATP para mover en contra de gradiente de concentración a los protones desde el citoplasma hacia el apoplasto, generando no solo el gradiente químico de los protones sino también un gradiente eléctrico. A este tipo de transporte se le denomina de transporte primario debido a que el transportador directamente consume la energía del ATP para crear el gradiente electroquímico.

Mientras que un transportador activo secundario es capaz de mover los protones que se encuentran en gran concentración en el apoplasto hacia el interior celular, es decir a favor de su gradiente de concentración, pero además el transportador facilita el transporte de otro soluto en contra de gradiente de concentración. Así cuando las células vegetales necesitan acumular azúcares, lo pueden hacer a expensas de las dos familias de transportadores denominados simportadores de azúcar/protón, los transportadores SUT (Sucrose Transporter) y los STP (Sugar Transport Protein), que importan sacarosa y hexosas, respectivamente. En el esquema de la Figura 5 se pueden observar a los transportadores

activos en la célula acompañante del floema y en las células del tejido demanda, en donde se acumulan los azúcares (Fig. 5; Lemoine, 2013).

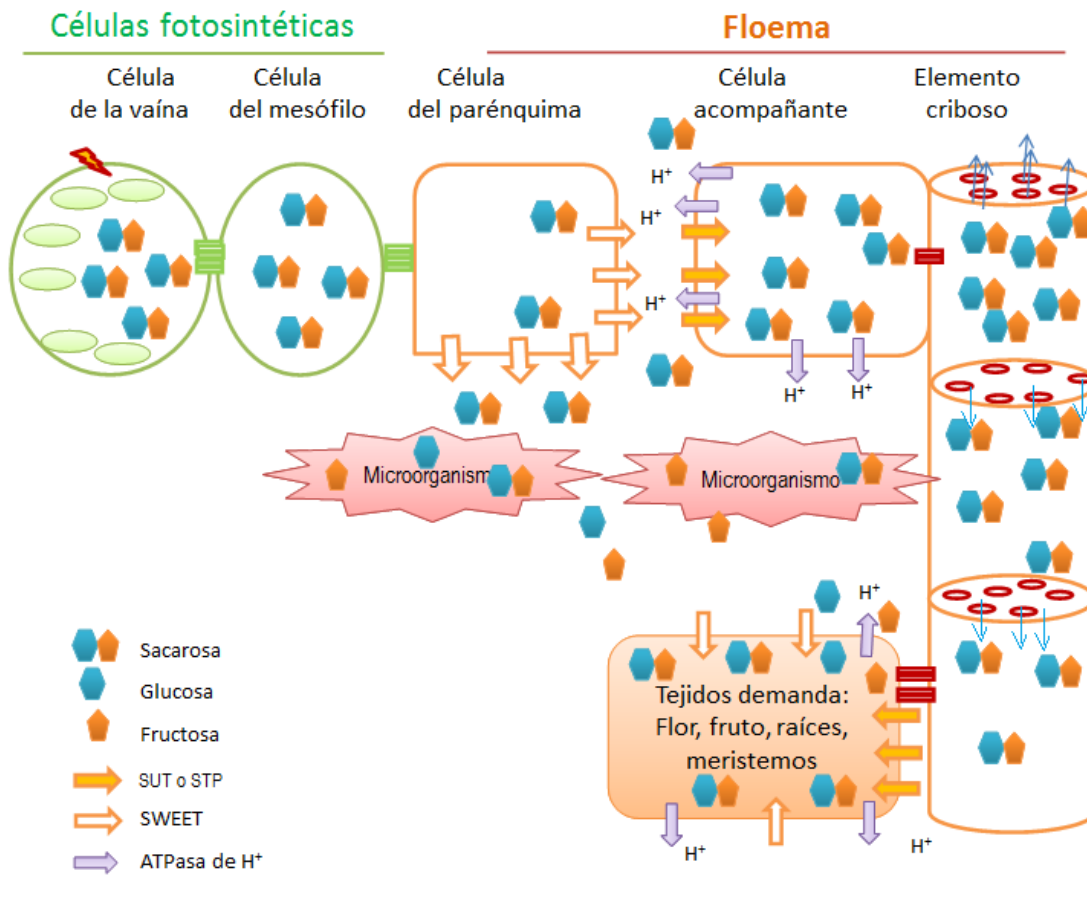


Figura 5. Transporte de azúcares en plantas. La sacarosa es sintetizada en las células fotosintéticas, las cuales están conectadas a través de conductos denominados plasmodesmata, el movimiento del azúcar es difusional entre estas células. Después la sacarosa se mueve hacia las células del floema. El floema está compuesto de tres tipos celulares distintos, las externas se denominan parénquima del floema y están unidas a las células fotosintéticas a través de plasmodesmata, en el lado opuesto están cercanas a las células acompañantes, pero no están conectadas a través de plasmodesmata, por lo que los azúcares tienen que salir de las células del parénquima por transportadores transmembranales, como los SWEETs que son transportadores difusionales. La entrada de los azúcares a las células acompañantes lleva a acumular una gran cantidad de azúcares y para que esto ocurra las células contienen tanto a la ATPasa de H⁺ en sus membranas plasmáticas como a los transportadores secundarios SUT y STPs. Los azúcares después son canalizados a las células del tubo criboso mediante conexiones plasmodesmata y distribuidos a toda la planta hacia los tejidos fotosintéticos que pueden estar o no conectados simplásticamente. Los microorganismos que interactúan con la planta pueden aprovechar la salida de los

Respecto al transporte pasivo de azúcares, éste puede llevarse a cabo por dos mecanismos. Uno de ellos incluye al transporte simplástico mencionado anteriormente, donde los citoplasmas de dos o más células pueden formar un continuo debido a que están conectadas a través de un conducto que atraviesa sus paredes celulares, este continuo es denominado simplasto y el conducto es el plasmodesmo. La vía simplástica permite que diversos solutos se encuentren en concentraciones similares en las células que están conectadas. Los solutos que generalmente se mueven a través de estos conductos son iones, azúcares, aminoácidos e incluso RNA y hormonas, aunque debido a la naturaleza dinámica del diámetro del conducto es posible que no siempre sean transportadas todas las moléculas mencionadas (Faulkner, 2018). En la figura 5 se observa que las células que se encargan directamente de llevar a cabo la fijación de CO₂ son las células del mesófilo de las hojas las que están conectadas simplásticamente con las células vecinas. Lo anterior le permite a la célula del mesófilo fácilmente repartir el carbono a la célula del parénquima del floema (Fig. 5). Asimismo, la célula acompañante del floema al estar conectada con las células del elemento criboso le permiten comunicarse y mantener una concentración de solutos similar (Slewinski et al., 2013).

La segunda vía por la que se transportan los azúcares de manera difusional es a través de transportadores membranales. En el laboratorio del Dr. Frommer (Carnegie Institution for Science, Stanford, California, EU) se descubrió y caracterizó a los transportadores difusionales de azúcares, los denominados SWEETs, por sus siglas en inglés Sugars Will Eventually be Exported Transporters. Los SWEETs eran la pieza faltante al sistema de transporte de azúcares hacia el floema (Chen et al., 2010), es decir, se conocía que el transporte simplástico ocurre entre la célula del mesófilo y la del parénquima del floema, pero ya que esta última célula carece de conexiones simplásticas con la célula acompañante, se planteaba que debía de existir un transportador difusional para transportar los azúcares a la célula acompañante (Fig. 5). En la siguiente sección se describen a los transportadores difusionales SWEETs.

TRANSPORTADORES SWEET

Los SWEET son proteínas amfipáticas en plantas la mayoría contiene 7 hélices transmembranales y son uniportadores bidireccionales de monosacáridos o de disacáridos (Chen et al, 2010). En Arabidopsis, hay 17 SWEETs identificados, pero aún se desconoce la localización subcelular de todos, pues su distribución es variada ya que se han localizado en la membrana plasmática, tonoplasto, retículo endoplásmico y Golgi (Chen et al., 2015b).

Los SWEETs de Arabidopsis se han clasificado con respecto a su similitud en secuencia resultando en cuatro grupos, que además coinciden con su especificidad por azúcares (Chen *et al.*, 2015b; Eom *et al.*, 2015):

Clado I agrupa a SWEET1 y SWEET2, son transportadores de hexosas; SWEET2 está en el tonoplasto.

Clado II contiene a los SWEET3-8, varios son transportadores de hexosas y SWEET4 se ha localizado en la membrana plasmática.

Clado III conforma a los SWEET9-15 capaces de transportar sacarosa y algunos de ellos se han localizado en la membrana plasmática.

Clado IV contiene a los SWEET16 y 17 presentes en tonoplasto y transportan fructosa.

PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS SWEET

A pesar de que en Arabidopsis se han estudiado más profusamente a los SWEETs aún se desconoce el papel fisiológico de todos ellos. Los transportadores SWEET participan en procesos donde se requiere un movimiento masivo de azúcares como en la formación del néctar (Lin *et al.*, 2014), en el cargado del floema (Baker *et al.*, 2012; Bezruczyk *et al.*, 2018), en la formación de la semilla (Sosso *et al.*, 2015), en la germinación (López-Coria *et al.*, 2016) y durante la interacción planta-bacteria (Chen *et al.*, 2010; Lemoine *et al.*, 2013).

La polinización es uno de los procesos que mantiene la producción de semillas y frutos y la diversidad de las plantas. Los polinizadores son los responsables de recolectar el néctar de

las plantas y al hacerlo toman y esparcen el polen. El néctar es rico en azúcares y se encuentra en estructuras denominadas nectarios. La mutante del SWEET9 de *A. thaliana* es incapaz de producir néctar, evidencia de que SWEET9 es un transportador esencial en la producción de éste. Al parecer los azúcares son secretados al espacio extracelular de las células del parénquima del nectario a través de SWEET9 (Lin *et al.*, 2014; Eom *et al.*, 2015).

En el cargado del floema se demostró que AtSWEET 11 y 12 se localizan en la membrana plasmática del floema de la hoja. Las doble mutantes de *Atsweet 11* y *12* presentaron niveles altos de almidón y crecimiento lento con clorosis leve, indicando que estos SWEETs están involucrados en el flujo de salida de sacarosa de las células del parénquima del floema hacia el apoplasto. En maíz, se describieron a *ZmSWEET13a*, *b* y *c*, las triples mutantes en estos tres genes reducen el movimiento de sacarosa al floema. Por lo que los SWEETs del clado III al parecer son importantes para el cargado del floema (Baker *et al.*, 2012; Bezruczyk *et al.*, 2018).

AtSWEET15 en conjunto con los AtSWEET11 y 12 están relacionados con el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*. Los SWEET11, 12 y 15 se encuentran en los integumentos de la semilla y el endospermo y la triple mutante *Atsweet 11*, *12* y *15* presenta retraso en el desarrollo del embrión y el fenotipo de la semilla es arrugada en la madurez, lo cual se debe a un retraso en el contenido de almidón y lípidos, sugere de que los SWEETs participan en la salida de azúcares de los tejidos maternos para el llenado de la semilla (Eom *et al.*, 2015). En maíz, se encontró que la mutante en *Zmsweet4c* presenta semillas con un reducido contenido de azúcares en el endospermo y un deficiente crecimiento del embrión (Sosso *et al.*, 2015). Resultados similares se reportaron para la mutante en arroz (*Ossweet4c*), evidenciando que la familia SWEET4c es esencial en el llenado de la semilla (Sosso *et al.*, 2015).

Durante el proceso de la germinación de maíz se encontró que *ZmSWEET4c* es uno de los SWEETs que se expresan más a nivel de transcritos en los tejidos que forman el embrión, este SWEET es un transportador de glucosa localizado en la membrana plasmática y podría participar en el movimiento de glucosa que proviene del endospermo hacia el embrión. Otro

miembro de la familia de SWEETs cuyos transcritos se incrementan en la germinación son los 13. Si se considera una correspondencia entre los niveles de transcritos con la cantidad de transportadores en la membrana plasmática, se infiere que podrían transportar la sacarosa desde el escutelo hacia el eje embrionario en crecimiento. Estos datos concuerdan con la capacidad de los SWEETs de movilizar altas cantidades de carbono de manera difusional y que en este caso la movilización sería de un tejido fuente de nutrimentos, el escutelo, hacia el eje embrionario que es tejido demandante de nutrimentos (López-Coria *et al.*, 2019).

PARTICIPACIÓN DE LOS SWEETS EN LA INTERACCIÓN PLANTA – PATÓGENO.

Durante la interacción planta-patógeno hay un flujo de carbono alterado, por lo que se ha propuesto que los SWEETs pueden ser afectados por los microorganismos para proporcionar azúcares para su crecimiento. Por ejemplo, la bacteria *Xanthomonas oryzae* induce la expresión de tres SWEETs en arroz, OsSWEET11, 12, y 14. La región promotora de algunos SWEETs de arroz contienen sitios de unión para los efectores TAL (Transcriptional Activator-like proteins) producidos por las bacterias. Los efectores TAL son proteínas capaces de actuar como factores de transcripción induciendo la expresión de los SWEETs, estos efectores son introducidos a través de un sistema de secreción tipo III (T3S) y llegan al núcleo. La manipulación por el microorganismo de la maquinaria de la célula vegetal le permite obtener azúcares en el apoplasto de las células infectadas. Se ha encontrado que cinco de los 21 genes de SWEETs en el genoma de arroz están involucrados en el crecimiento de patógenos (Streubel *et al.*, 2013; Eom *et al.*, 2015).

No solo los SWEETs de arroz son regulados a nivel transcripcional por la presencia de microorganismos patógenos, sino también hay otras familias, por ejemplo, en *Arabidopsis*, AtSWEET2, 4, 5, 7, 8, 10, 12 y 15 pueden ser inducidos por *Pseudomonas syringae*, por otro lado, la infección de *Botrytis cinerea* aumenta la expresión de AtSWEET 4, 15 y 17, lo que sugiere que los microorganismos aseguran su abastecimiento de fuentes de carbono (Chen *et al.*, 2010, Baker *et al.*, 2012).

A pesar de lo anterior, también hay que considerar que las plantas también pueden regular la expresión de los SWEETs para evitar la invasión. Durante la infección de *Arabidopsis* por *Phytium* se reprime la expresión de AtSWEET2, un transportador localizado en el tonoplasto, la reducción del transportador evita que los azúcares de la vacuola se movilen al citoplasma, por lo que la salida de azúcares hacia los apoplastos se reduce y también el desarrollo del hongo (Chen et al., 2015a).

JUSTIFICACIÓN

Los SWEETs son transportadores difusionales de sacarosa, glucosa o fructosa. Funcionalmente, contribuyen al llenado del floema de azúcares, a la acumulación de azúcares en los nectarios, a la exudación de azúcares en las raíces y los microorganismos inducen su expresión (Chen et al., 2015a, 2015b).

En maíz, la familia de SWEETs se compone de 22 miembros, en donde SWEET4c (Sosso *et al.*, 2015) y los SWEET13a, b y c han sido caracterizados (Bezruczyk *et al.*, 2017). ZmSWEET4c es un transportador de hexosas de la membrana plasmática que se encuentra altamente expresado en semillas de maíz en formación participando en el llenado del grano, su ausencia reduce la acumulación de reservas de almidón en el endospermo, así como afecta el desarrollo del embrión. Mientras que el grupo de los SWEET13 (a, b y c) son transportadores de sacarosa que están altamente expresados en la vasculatura de las hojas, la triple mutante reduce el crecimiento de la planta, por lo que es importante para la movilización de sacarosa en las hojas.

A la fecha, no se ha descrito en maíz la regulación de la abundancia de los transcritos para los SWEETs durante su interacción con patógenos, su análisis es importante desde dos puntos de vista, para definir los eventos moleculares que se suceden durante la interacción de la planta con patógenos, en donde pueden ocurrir cambios en el reparto de carbono tanto en la zona infectada como a la distancia. Segundo porque si se conocieran los blancos moleculares de los patógenos en la planta se podría disminuir la ocurrencia de enfermedades en plantas, se ha sugerido que provocar mutaciones en la región promotora de los SWEETs que son blanco de los efectores de bacterias reduciría la capacidad infectiva de los patógenos (Oliva *et al.*, 2019), aunque también se podrían inducir mutaciones en la producción de los efectores de los patógenos para reducir su capacidad infectiva.

Fusarium verticillioides infecta al maíz en diferentes estadios de su desarrollo, por lo que es posible que este microorganismo afecte la expresión de diferentes genes en maíz, entre ellos a los transportadores de azúcares tipo SWEET. Las cepas de *Fusarium* se conocen que

presentan contenidos distintos de micotoxinas, como la FB1 (Sánchez-Rangel et al., 2005), siendo las micotoxinas importantes para producir los síntomas de la enfermedad es probable que una cepa que produce FB1 en altas cantidades pueda regular la expresión de los transportadores SWEET para obtener el carbono de la planta durante su etapa biotrófica. Galeana y colaboradores (2017) demostraron que la cepa MY3 prolifera rápidamente en el tejido que infecta y produce altas concentraciones de FB1 de manera temprana, observándose síntomas de enfermedad más agresivos en los embriones y tallos de plantas de maíz que los encontrados con la cepa MY5, quien produce pocas cantidades de FB1 y prolifera menos en el tejido infectado. Varios son los blancos de la FB1 que pueden explicar los síntomas en el tejido vegetal, por lo que en este trabajo se planteó el uso de esas dos cepas de *F. verticillioides* para infectar semillas de maíz y analizar si las plantas presentan diferente expresión de los SWEETs de la parte aérea de las plantas. Se analizaron aquellos que se conoce se encuentran en la parte aérea, ZmSWEET1b, ZmSWEET4a, ZmSWEET13a, ZmSWEET13b, ZmSWEET15a y ZmSWEET17 (Delgado-Rubio, 2017).

HIPÓTESIS

Fusarium verticillioides es un organismo que demanda a la planta carbohidratos para su desarrollo, su interacción con la planta es menos severa en cepas que producen baja cantidad de FB1, por lo que cepas con baja producción de FB1 producirán un aumento en la expresión de los transportadores de azúcares tipo SWEET presentes en la parte aérea de las plantas de maíz.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de expresión de seis SWEETs localizados en la parte aérea de las plantas de maíz durante su interacción con dos cepas del hongo *F. verticillioides* subespecie MY3 y MY5, con alto y bajo contenido de FB1, respectivamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un protocolo para la infección de las semillas de maíz con las dos cepas de *Fusarium verticillioides*.
2. Evaluar el efecto fisiológico de dos cepas de *F. verticillioides* (MY3 y MY5) en el crecimiento de plántulas de maíz.
3. Determinar la respuesta de defensa de la planta ante la infección por las dos cepas de *F. verticillioides*, SAR e ISR mediante la detección de la expresión de los genes de defensa AOS y PAL, respectivamente.
4. Determinar los niveles de expresión de los genes relacionados con los 6 SWEETS en las hojas de las plántulas de maíz germinadas en presencia de las dos cepas de *F. verticillioides*, MY3 y MY5.

MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental que se siguió para responder a los objetivos del trabajo se dividió en tres partes (Figura 6). En breve, se obtuvieron los conidios de las dos cepas de *F. verticillioides* para infectar semillas de maíz. Éstas fueron germinadas en 1 % agar y a las 48 h las plántulas fueron trasplantadas en sustrato y crecidas en invernadero hasta alcanzar 14 días, después se colectó la parte aérea y se obtuvo el RNA total de los tejidos, luego se sintetizó el cDNA. Para la determinación de la expresión de los SWEET se usaron las técnicas de RT-PCR y qRT-PCR, usando oligonucleótidos específicos.

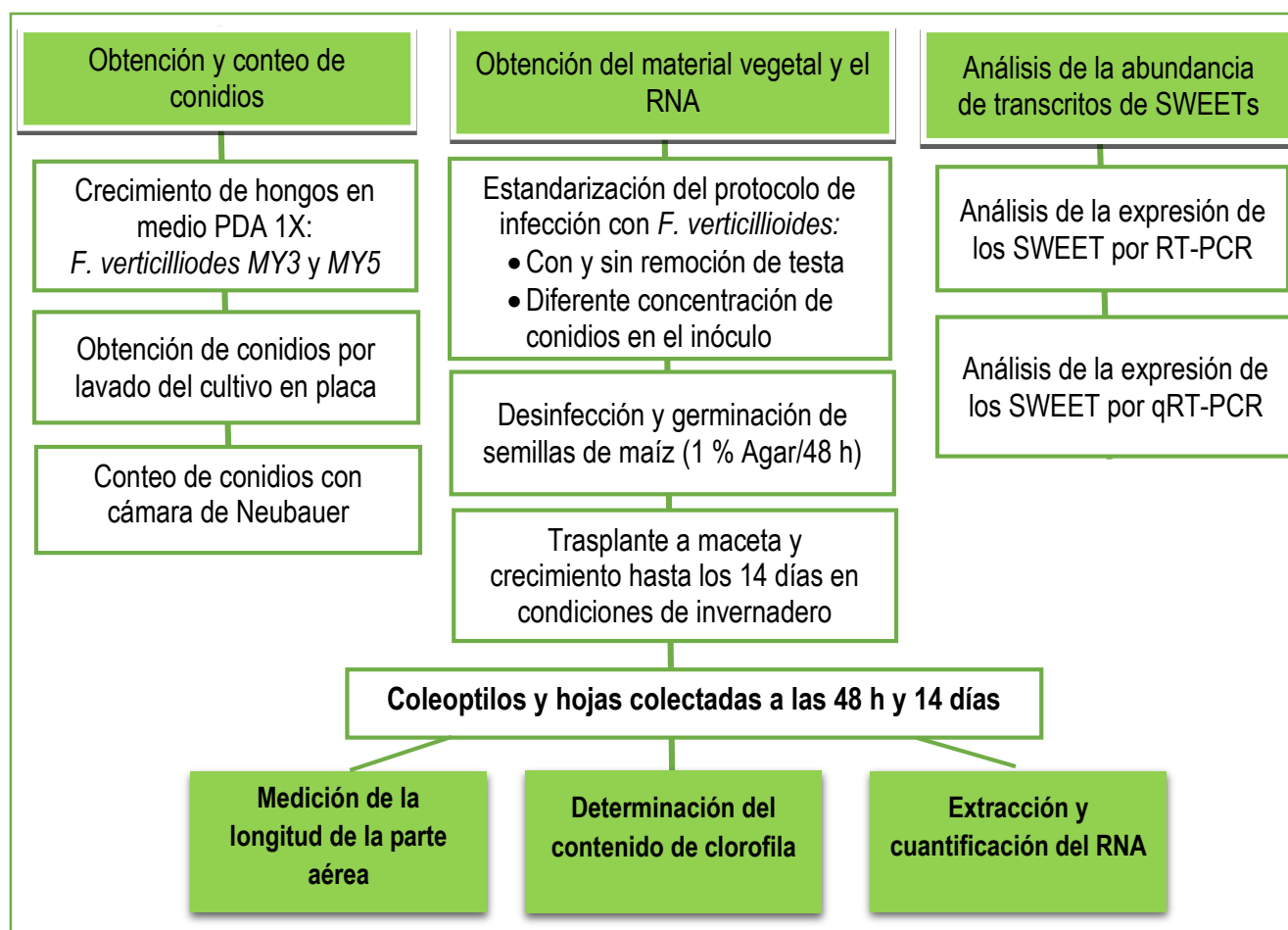


Figura 6. Desarrollo experimental. Se germinaron semillas de maíz sin infectar (control) o infectadas con los conidios de dos cepas de hongos de *F. verticillioides*, la cepa MY3 y MY5. Se usó la parte aérea de las plántulas para realizar el análisis de la expresión de los SWEETs.

Preparación y calibración del inóculo de *Fusarium verticillioides*

Crecimiento de hongo

Se cultivaron las cepas de *F. verticillioides* MY3 y MY5, aisladas de mazorcas de maíz (proporcionadas por el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Sánchez-Rangel *et al.*, 2005) en cajas de Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) al 1X en condiciones de esterilidad. Las cajas se incubaron a 29 °C en la oscuridad. Después de 3 semanas de crecimiento, a cada caja se le añadieron 5 mL de agua estéril desionizada y se colocaron en agitación moderada constante de 200 rpm durante 30 min a 29°C. La suspensión de conidios obtenida se recolectó en microtubos estériles de 1.5 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C en la centrífuga Universal 320R Hettich. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 1.5 mL. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y el botón final se resuspendió en 1 mL de agua estéril desionizada para obtener la suspensión concentrada de conidios (Guzmán-Chávez, 2013).

Conteo de conidios

En un microtubo estéril de 1.5 mL, se mezclaron 15 µL de agua estéril desionizada y 1 µL de la suspensión concentrada de conidios de cada una de las cepas (dilución 1:16). Se tomaron 10 µl para cargar la Cámara de Neubauer y se realizó el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes señalados en la Figura 7, con el microscópico óptico CH30RF100 Olympus. Con los datos obtenidos se calculó el volumen necesario de las suspensiones concentradas para preparar los inóculos a 2×10^3 conidios/mL, 4×10^3 conidios/mL y 6×10^3 conidios/mL, para cada una de las cepas en un volumen de 25 mL.

Ejemplo de cálculo para el conteo de conidios: Cuando se obtuvo la lectura promedio de conidios de 52 de una dilución de 10:1000, se sustituyeron los datos de la siguiente ecuación:

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

Por lo tanto:

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

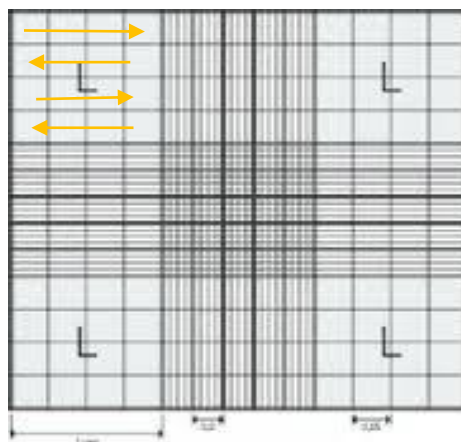


Figura 7. Vista de la cámara de Neubauer 10x. Tomada de la página Serviquimia. L: cuadrantes que se tomaron en cuenta. Las flechas en amarillo describen la dirección en la que se llevó a cabo el conteo.

Mantenimiento de las cepas de *F. verticilloides*.

Se utilizaron dos estrategias para la propagación de *F. verticilloides*. de un cultivo en placa, se cortó un cuadro de agar con conidios de 0.5 cm X 0.5 cm, la cual fue resembrada en una caja Petri nueva con PDA 1.0X. Por otra parte, a partir de la solución concentrada de conidios, se inocularon 5 μ L en cajas de Petri con PDA 1.0X. Ambos modelos de propagación se incubaron a 29 °C en la oscuridad. Todo el material que estuvo en contacto con los hongos se desinfectó en una disolución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 2 % por una noche.

Infección de las semillas de maíz Chalqueño con *F. verticillioides*.

Desinfección de las semillas de maíz.

Un lote de 105 semillas se desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 2 % por 2 min con agitación manual. Inmediatamente se enjuagaron las semillas 3 veces con 200 mL de agua estéril desionizada, hasta que el olor del hipoclorito de sodio no se percibiera.

Infección de semillas.

Se realizaron varias pruebas para lograr la infección deseada (ver sección de resultados), aquí se da el tratamiento que al final se escogió para infectar a las semillas

- **Semillas control:** se colocaron lotes de 15 semillas con testa, previamente desinfectadas. Las semillas se embebieron en 25 mL de agua estéril durante 1.5 h a 29 °C en agitación constante en una incubadora Labnet 211DS. Posteriormente las semillas fueron colocadas entre dos capas de papel filtro húmedo con agua estéril desionizada, las capas fueron enrolladas e incubadas durante 48 h a 29°C dentro de una bolsa de cierre hermético.
- **Tratamiento con *F. verticillioides*:** Las semillas fueron tratadas de igual manera que en el tratamiento control, salvo que previo a la agitación, se embebieron en 25 mL de suspensión de conidios en agua. Las cantidades de conidios que se establecieron como óptimas para trabajar fueron de 3333, 6666 y 10000 conidios de *F. verticillioides* MY3 o MY5/semilla.

Trasplante de plántulas a maceta.

Una vez transcurridas las 48 h de germinación, las plántulas se transfirieron a macetas con sustrato inerte, Peat moss (PREMIER®), y se llevaron al invernadero. Las plantas crecieron bajo fotoperiodo natural de luz y temperatura ambiente. El riego se aplicó cada tercer día con agua corriente.

Después de 14 días de crecimiento, se cortó la parte aérea de 4 plantas de maíz por cada tratamiento (control e infección con cepas). El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso. El ensayo se realizó por triplicado, para obtener la réplica de los tratamientos biológicamente independientes.

Evaluación del efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el crecimiento del maíz.

Medición del crecimiento del tallo. De cada tratamiento se realizó la medición del tejido aéreo, desde la punta de la última hoja hasta el primer nodo del tallo. Para dicha medición, se tomaron en cuenta las 8 plantas que conformaba cada tratamiento. El experimento se

realizó por duplicado y por triplicado para los tratamientos con la concentración 10,000 conidios /semilla.

Cuantificación de clorofila total

Debido a que las plantas podrían presentar clorosis³ por la presencia del hongo, se extrajo la clorofila total (Chl) de las hojas de 14 días, de acuerdo con el método descrito por Arnon (1949). El tejido se pulverizó con N₂ líquido en un mortero. Se homogenizó 0.1 g del pulverizado con 4 mL de acetona al 80 %, después se aforó a 10 mL con acetona. Después de agitarlo se incubó durante 5 min en hielo y oscuridad. Posteriormente, se centrifugó a 2000 rpm por 5 min a 4 °C para eliminar las membranas y proteínas. El sobrenadante se recuperó y se midió la absorbancia a 663 nm para obtener la concentración de la clorofila a (A₆₆₃) y 645 nm para la clorofila b (A₆₄₅). La medición se hizo en un espectrofotómetro Beckman.

Para obtener la concentración de clorofila se utilizó la siguiente fórmula:

$$Chl = A_{663}(8.02) + A_{645}(20.29) = X \frac{mg\ Chl}{mL}$$
$$X \frac{mg\ Chl}{mL} \left(\frac{10\ ml}{0.1g\ tejido} \right) = X \frac{mg\ Chl}{g\ de\ tejido}$$

Análisis de la expresión de los transportadores SWEETs

Extracción de RNA de tejido foliar.

Se realizó la extracción de RNA del tejido aéreo de las plantas de maíz por el método de tiocinato de guanidina (Carvente-García, 2014). El tejido almacenado a -70°C se pulverizó con N₂ líquido en un mortero libre de RNasas (el material fue desinfectado con cloralex al 2

³ Clorosis. Amarillamiento del tejido foliar causado por la falta de clorofila (http://extension.illinois.edu/focus_sp/chlorosis.cfm)

% posteriormente se enjuago y se dejó secar, finalmente se esterilizó cubierto de papel aluminio).

Aproximadamente 500 mg de tejido molido se colocaron en un microtubo estéril de 1.5 mL al cual se le agregó 1mL de Trizol (Carvente-García, 2014). El tubo se homogeneizo en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Después se agregaron 200 μ L de cloroformo. La muestra se homogeneizó manualmente por 15 s y posteriormente se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Después las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro microtubo estéril de 1.5 mL y se agregaron 500 μ L de isopropanol, el tubo se mezcló por inversión 5 veces y se incubó 10 min a temperatura ambiente para precipitar el RNA. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el botón se lavó tres veces con 1 mL de alcohol etílico frío al 70 %. En cada lavado la muestra se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Finalmente, el botón obtenido se secó a temperatura ambiente por 5 min y se resuspendió en 45 μ L de agua dietil-pirocarbonato (DEPC; Mezcla de 5 mL del DEPC concentrado en 1 L de agua estéril, después de la agitación durante toda la noche se esterilizó por 30 min a 120 °C). El RNA se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Cuantificación, visualización en gel de agarosa y calibración de RNA total

El RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 ThermoScientific. Se tomó el volumen necesario para tener 1 μ g de RNA y se añadió a un microtubo estéril de 1 mL se mezcló con 2 μ L de amortiguador de carga 6X DNA (Thermo Scientific) y el volumen necesario para completar 10 μ L con agua DEPC. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa a 1X con amortiguador de corrida 1X TAE (200 mM Tris sin ajuste de pH, 100 mM Ácido acético glacial y 5 mM EDTA/NaOH pH 8.0) frío, y como intercalante bromuro de etidio (concentración final 0.5 mg /mL) en una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT. La electroforesis se corrió a 88 V durante 45 min.

Para determinar si el RNA era de buena calidad, es decir, que no estuviera degradado, se buscó obtener en el gel dos bandas claras correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S. Se obtuvieron imágenes del gel en el fotodocumentador XRS ChemiDoc™ (BIO RAD). Además, se realizó la calibración del RNA, es decir, se ajustaron los volúmenes de RNA para obtener bandas con la misma intensidad de cada muestra en el gel. Se realizó un análisis de

densitometría de las bandas con el equipo XRS ChemiDoc™ marca BIO RAD para comprobar la calibración.

Obtención del cDNA. Reacción Transcriptasa reversa (RT)

En un microtubo estéril de 200 µL se mezcló 1 µL de oligo dT a una concentración 20 µM, el volumen de RNA calibrado anteriormente y se aforó con agua DEPC para llegar a un volumen final de 10 µL. Luego se incubó a 70 °C por 5 min, después se dejó en hielo por 5 min y se le agregaron 10 µL de la mezcla de reacción descrita en la Tabla 1. La mezcla final se colocó en un termociclador Maxy Gene II (Axygen). Las condiciones fueron 25 °C por 5 min para realizar el alineamiento, 42 °C por 1 h de extensión, y finalmente, para inactivar la enzima 70 °C por 15 min. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso. El procedimiento se realizó para cada una de las muestras de RNA.

Tabla 1. Mezcla de reacción empleada en la reacción de Transcriptasa Reversa, las cantidades descritas son para una reacción.

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer ImProm-II 5X (Promega)	4
MgCl ₂ (25 mM)	2.4
dNTP's (10 mM)	1
RT (Trascriptasa reversa)	1
H ₂ O – DEPC	1.6

Reacción RT-PCR punto final (Transcriptasa Reversa- Reacción en cadena de la polimerasa punto final)

Para evaluar la expresión de los SWEETs se utilizaron los datos de RNA-seq depositados en la base de datos Maizegdb (<https://www.maizegdb.org/>), se buscaron aquellos SWEET que se expresaran en el tejido aéreo del maíz (Delgado-Rubio, 2017). Los oligonucleótidos diseñados y probados para realizar la amplificación de los SWEETs por PCR punto final se encuentran en la Tabla 2. Los productos posibles de amplificación se encuentran marcados en las secuencias del anexo 1.

Tabla 2. Número de acceso de las secuencias de los SWEETs analizados y oligonucleótidos utilizados para la PCR punto final. Los oligonucleótidos fueron diseñados en el programa primer3 o en la página de NCBI.

Número de acceso NCBI	SWEET	Datos de localización (MaizeGDB)	Secuencias de oligonucleótidos	Peso molecular esperado del producto (pb)
NM_001154214.1	ZmSWEET1b	Hoja planta madura	F 5'TCCATATAAGCGCAAGCAGACA3' R- 5' CAGAACGTAGGCACTGGGG 3'	151
NM_001175008.1	ZmSWEET4a	Hoja de planta madura	F- 5'CAGCGTCGTCCTACCCATAT 3' R- 5' CTTCCAGATGCGGATGAACG 3'	177
NM_001155615.1	ZmSWEET13a	Coleóptilo y hojas	F-5'CGTGGAGTACATGCCCTTCT 3' R- 5'CACGTAGAGCACCCATCTGGT 3'	151
NM_001148182.1	ZmSWEET13b	Hojas	F- 5'ACAAATACGTCGCGCTACCA 3' R- 5' GCTTGCTTGCGATGATGGAG 3'	361
NM_001155556.1	ZmSWEET15a	Base de las hojas	F- 5' CCCTGGCCTCTTCTTCGTTC 3' R- 5' GAGAAGGGCTGTAAGCGAGG 3'	107
DAA54392.1	ZmSWEET17	Coleóptilo	F- 5' TCATGCCGTTCTTCCTATCC 3' R- 5' CAAAGAAATAGCGTCGCCTC3'	195

La reacción de PCR punto final se realizó en un volumen de 12.5 μ L de acuerdo a como se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para PCR punto final.

Reactivo	SWEET					
	1b	4a	13a	13b	15a	16
PCR Master Mix 2X (μ L)	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
20 μ M Oligonucleótido Sentido (μ L)	0.5	0.5	0.5	0.25	1	0.5
20 μ M Oligonucleótido Antisentido (μ L)	0.5	0.5	0.5	0.25	1	0.5
1 μ g cDNA (μ L)	2	2	2	2	1.5	2
H ₂ O libre de DNAsas (μ L)	3.3	3.3	3.3	3.8	2.8	3.3

La amplificación de cada uno de los SWEETs se llevó a cabo bajo las condiciones que se detallan en la Tabla 4 en un termociclador Maxy Gene II de la marca Axygen.

Tabla 4. Condiciones empleadas para la PCR punto final.

Número de ciclos	Pre- desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
35 ciclos	94°C /5 min	Desnaturalización 95°C / 40s Alineación 57°C / 60s Extensión 72°C / 40s	72°C / 7 min

A los productos finales de la PCR se les agregó 2.5 µL de amortiguador de carga Blue/Orange 6X (Promega). Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1X, bromuro de etidio (0.5 mg/mL) y usando TAE 1X como amortiguador de corrida a 88 V por 35 min. Se utilizó el marcador de peso molecular de 500 pb (Fermentas). Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el gel en el equipo XRS ChemiDoc™ marca BIO RAD.

Análisis de los genes de defensa

Para evaluar que la planta hubiera sido infectada se realizó el análisis de la expresión de los genes de las proteínas relacionadas con la patogénesis del maíz: la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la aleno oxido sintasa (AOS), las secuencias de los oligonucleótidos usados se presentan en la Tabla 5.

Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 2 % con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio (0.5 mg/mL) a 88 V por 35 min. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en el gel en el equipo XRS ChemiDoc™ marca BIO RAD.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcritos de proteínas de defensa. Oligonucleótidos diseñados por Guzmán-Chávez, 2013.

Transcrito	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del producto (pb)
PAL	F- 5' AGA GAA GTA CGC CGC ACA GA 3' R- 5' GTA GTG GCC ACA CAC CTT GC 3'	196

AOS	F- 5' AGC TCC AGT CCT TCT TCG TA 3' R- 5' ACT CGA AGT ACT TGT CCT GC 3'	238
-----	--	-----

Reacción de qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Con base en los perfiles de expresión que se obtuvieron a partir del PCR punto final, se decidió cuantificar por PCR tiempo real los transcritos de los SWEETs tanto en las plantas control como en las infectadas con las cepas de *F. verticillioides* MY3 y MY5, a una concentración de 10000 conidios/mL, ya que a esa concentración de las cepas se observaron cambios significativos en la expresión de los transportadores.

Los oligonucleótidos diseñados tenían las siguientes características: productos esperados amplificados de 50 a 200 pb, un contenido de GC de 40 – 60 %, 18-30 nucleótidos de longitud, se buscó evitar la complementariedad de secuencias entre los oligonucleótidos, además se evaluó la especificidad (<https://www.idtdna.com/calc/alyzer>). En la Tabla 6 se encuentran los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los transcritos de los SWEETs, se eliminó el SWEET 15 debido a que mostró baja expresión. Se usó como gen de referencia el RNA ribosomal 18S, gen cuya expresión se mantiene relativamente constante en los tratamientos empleados. El diseño de los oligonucleótidos se hizo usando el programa en línea Primer3. El producto amplificado usando estos oligonucleótidos se marca en las secuencias de los SWEETs que se encuentran en el anexo 2.

Tabla 6. Número de acceso de las secuencias de los SWEETs analizados y oligonucleótidos diseñados en este trabajo para su amplificación por PCR en tiempo real.

Número de acceso NCBI ¹	Nombre propuesto comparado con arroz ²	Datos de localización (MaizeGDB) ³	Secuencia de oligonucleótidos
NM_001154214.1	Zm_SWEET1b	Hoja planta madura	F - 5'GACCTGTGCCTGTCCAATTT 3' R - 5'AAATCCTCCGTCGACTTCCT3'
NM_001175008.1	Zm_SWEET4a	Hoja de planta madura	F- 5'CAGCGTCGTCCTACCCATAT 3' R- 5' CTTCCAGATGCGGATGAACG 3'

NM_001155615.1	Zm_SWEET13a	Coleóptilo y hojas	F- 5' CGTGGAGTACATGCCCTTCT 3' R- 5' CACGTAGAGCACCATCTGGA 3'
NM_001148182.1	Zm_SWEET13b	Hojas	F- 5' GACCTTCCTAGCCCCGATAC 3' R- 5' GAACAGCTTGGCTTTCTTGG 3'
DAA54392.1	Zm_SWEET17	Coleóptilo	F- 5' ATGCCACAAGGGTTAAGACG 3' R- 5' GGATAGGAAGAACGGCATGA 3'
	Ribosomal 18S	Gen de referencia	F- 5' CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT 3' R- 5' CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC 3'

La reacción de q-PCR se realizó en un volumen final de 20 µL, con los componentes que se encuentran en la Tabla 7 en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El análisis de los resultados se realizó en el software 7500 Software V.2.0.6.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción para PCR en tiempo real para los 6 pares de oligonucleótidos correspondientes a cada SWEETs a analizar.

Reactivo	Para una reacción (µL)
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	5.0
Oligonucleótido sentido	0.15
Oligonucleótido antisentido	0.15
cDNA	2
H ₂ O libre de nucleasas	12.7

Estandarización de las condiciones para qRT-PCR

La estandarización de la técnica consistió en: 1) Evaluar la especificidad de los oligonucleótidos y 2) Establecer la eficiencia de amplificación para cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

- 1. Evaluación de la especificidad de la reacción.** Se verificó que los oligonucleótidos amplificaran un solo producto. El criterio para determinar dicho análisis fue la presencia de un solo pico después de realizar la curva de disociación del producto

amplificado, lo cual indicó que solo hay una secuencia amplificada. El análisis se realizó tanto para las secuencias de interés como para la secuencia empelada como gen de referencia (18S). Un ejemplo de la curva de disociación se ilustra en la Figura 8. Para un mayor análisis de las curvas ver Anexo 3.

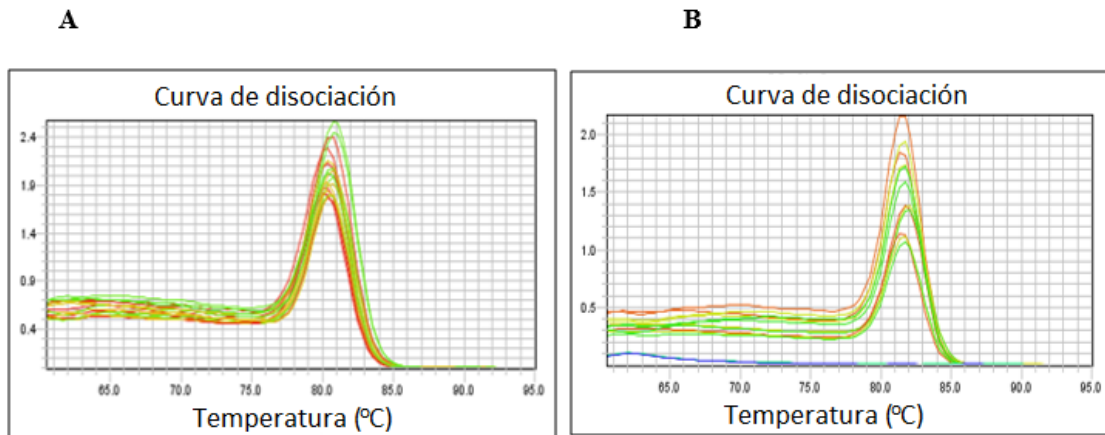


Figura 8. Curva de disociación de la amplificación para SWEET 4a y el gen de referencia 18s. **A.** SWEET 4a y **B.** Gen de referencia (18s). Cada una de las curvas en color corresponde a una concentración de cDNA diferente.

- 2. Establecimiento de la eficiencia de amplificación.** Para determinar la eficiencia primero se debe conocer la CT, que es el número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral establecido con respecto al logaritmo base diez de la concentración de cDNA. A mayor CT menor cantidad de moléculas del molde inicial. El ensayo se validó mediante una curva estándar construida con los valores de Ct vs. el logaritmo de la concentración del cDNA, se utilizaron diluciones en serie para cada uno de los productos de los genes estudiados. La curva estándar se realizó por triplicado y se verificó que en cada dilución apareciera la curva típica de amplificación. Se buscó que la pendiente estuviera dentro de los valores -2.8 a -3.32, lo que corresponde a una eficiencia de amplificación cercana al 100 % (Figura 9). La fórmula para calcular el porcentaje de eficiencia de amplificación (% E) es la siguiente:

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

Dónde:

m= Pendiente de la curva Ct vs. Log concentración. Considerando como aceptable un coeficiente de correlación entre 92 % - 120 %.

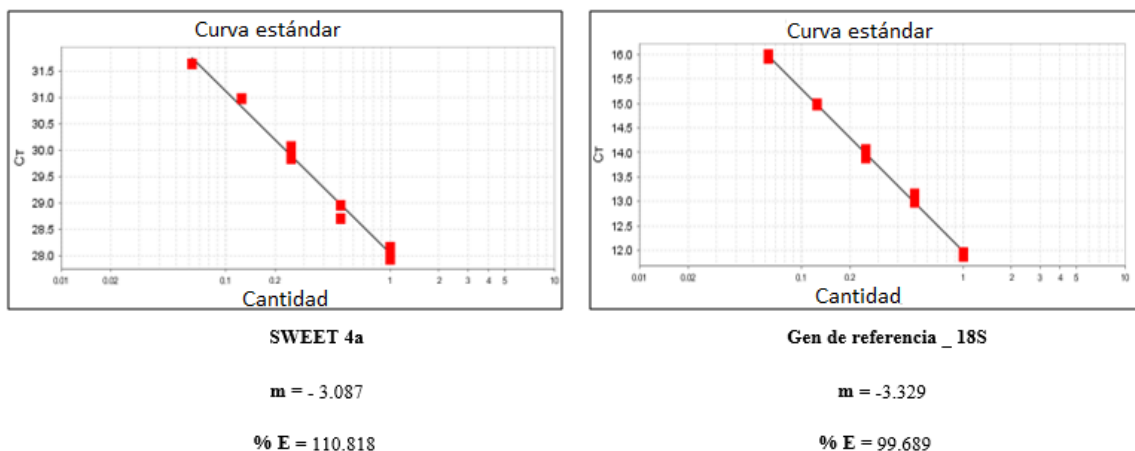


Figura 9. Curva de calibración para la obtener el porcentaje de eficiencia (% E). **A.** SWEET 4a y **B** gen de referencia (Zm18s). Cada una de las cinco concentraciones de cDNA se realizó por triplicado.

Se validó al gen Zm18s como gen de referencia al comprobar que, bajo cualquier tratamiento, los valores de Ct no se modificaron significativamente, lo que indica una expresión constante.

Cuantificación de la expresión de los SWEETs por qRT-PCR

Para realizar la cuantificación relativa se empleó el método de Pfaffl (2001), el cual permite considerar las diferencias en la eficiencia de amplificación de cada gen. Se obtuvieron los índices de expresión de los diferentes SWEETs normalizados con el gene de referencia (zm18s). Para calcular la expresión relativa se empleó la siguiente fórmula:

$$Expresión\ relativa = \frac{(E_{blanco})^{\Delta Ct\ blanco\ (control-muestra)}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct\ referencia\ (control-muestra)}}$$

En donde:

E_{blanco} = Eficiencia de amplificación de ZmSWEET.

$\Delta Ct\ blanco$ = La diferencia de Ct entre: Ct a tiempo 0 y Ct en otro tiempo.

$E_{referencia}$ = Eficiencia de amplificación del gen de referencia (Zm18s o ubiquitina).

$\Delta Ct\ referencia$ = La diferencia de Ct entre: Ct a tiempo 0 y Ct en otro tiempo.

RESULTADOS

Características de crecimiento macroscópico y microscópico de las cepas de *Fusarium verticillioides* MY3 y MY5.

En este trabajo se utilizaron dos cepas del hongo *F. verticillioides*, las cuales tienen la capacidad de producir cantidades muy diferentes de la micotoxina FB1, la cepa MY3 puede llegar a producir 1700 µg/g, mientras que la cepa MY5 1.3 µg/g (Sánchez-Rangel et al., 2005; Galeana-Sánchez et al., 2017). Su morfología colonial es ligeramente diferente (Fig. 10), ambas cepas presentan micelio aéreo blanco y abundante y un crecimiento radial que se observa desde etapas tempranas del desarrollo. Al madurar la colonia produce pigmentación que fluctúa de naranja-violeta a violeta oscuro, de acuerdo con el código de colores propuesto por Nelson *et al.* (1983; Citado por Reyes-Velázquez 2001).

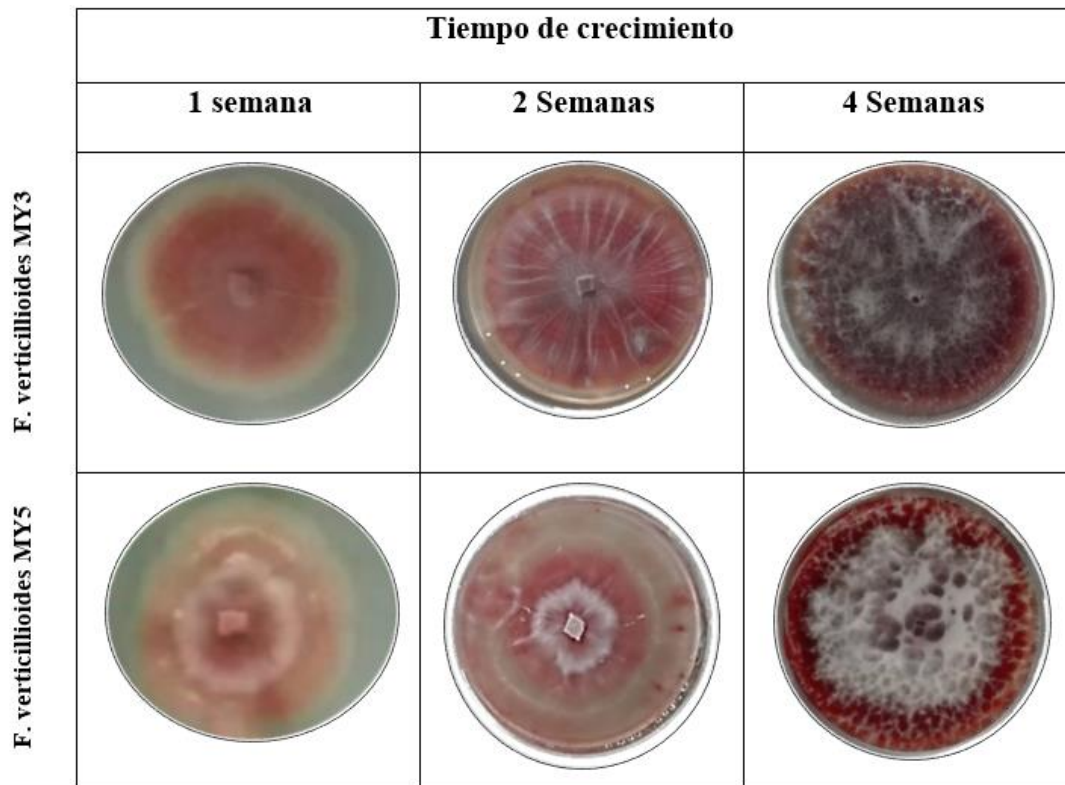


Figura 10. Crecimiento macroscópico de *F. verticillioides* MY3 y MY5. Medio PDA a 1X con 1, 2 y 4 semanas de crecimiento. Crecimiento en condiciones de oscuridad a 29 °C, el experimento se realizó por triplicado para cada una de las cepas.

A partir del cultivo de la cuarta semana se obtuvieron los conidios de ambas cepas de *F. verticillioides* (Fig. 11). Barnett y Hunter en 1998 (citado por Castro-del Ángel, 2011) describieron que *F. verticillioides* produce conidios de dos clases, los macroconidios, que son células ligeramente curvadas o encurvadas en las puntas y microconidios de forma ovoide u oblonga simples o que se presentan en cadenas. Observando los conidios al microscopio encontramos que la única diferencia entre ambas cepas radica en que las macroconidias son más abundantes en la cepa MY3 (Fig. 11 A y B). Mientras que en la cepa MY5 abundan más las microconidias de forma ovoide (Fig. 11 C y D). Las observaciones en ambas cepas coinciden con la descripción citada por Barnett y Hunter (1998).

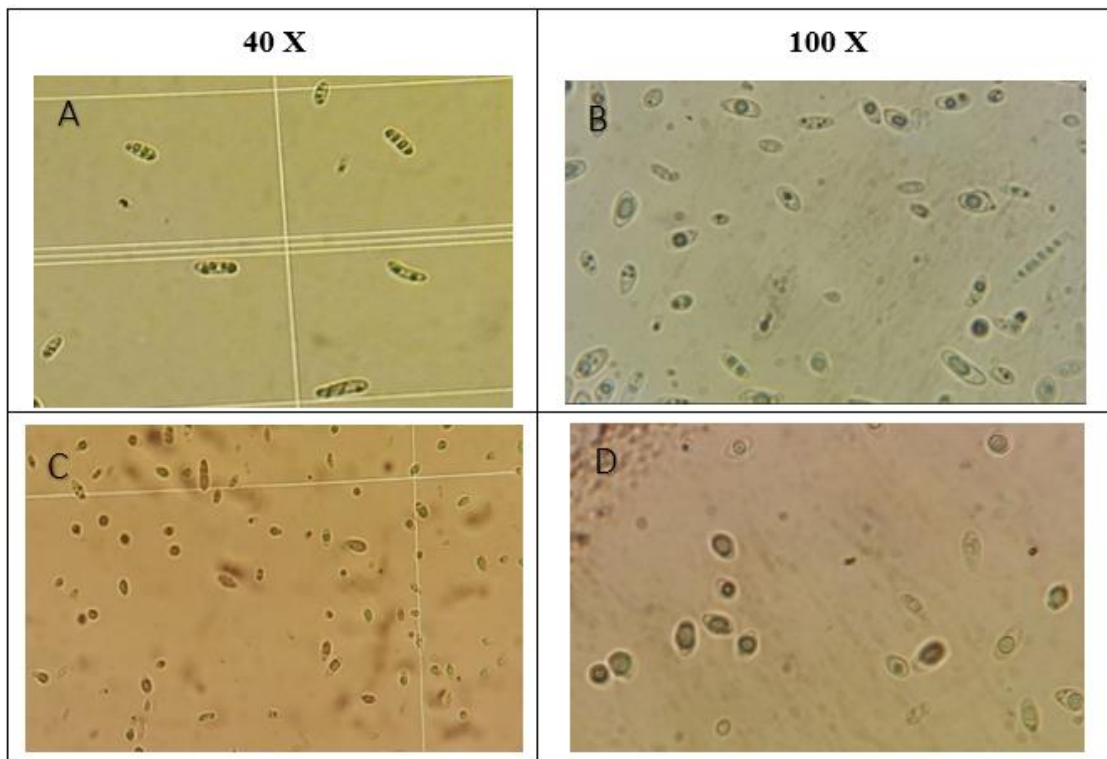


Figura 11. Crecimiento microscópico de *F. verticillioides* MY3 y MY5. Imágenes tomadas en microscopio Olympus CH3ORF100 con dos diferentes objetivos; **A.** Alícuota de una dilución 1:100; **B, C y D.** Alícuota obtenida de la solución concentrada de conidios inicial de MY3: 4.19×10^7 conidios / mL, MY5: 3.7×10^7 conidios / mL

Establecimiento de las condiciones de infección con *Fusarium verticillioides* de las semillas de maíz de maíz Chalqueño.

Las semillas de maíz que están en el proceso de germinación pueden ser atacadas por patógenos, ya sea que los hongos entren en contacto con suelo contaminado o bien porque residen como endófitos en la semilla y pueden causar su pudrición antes de germinar (Franke *et al.*, 2014). También las plantas se pueden desarrollar y ser asintomáticas, y cuando las condiciones de humedad y crecimiento cambian la enfermedad se presenta, pudiendo causar pudrición del tallo y mazorca y tizón en las hojas (Briones, 2013; CYMMYT, 2004).

Para determinar el efecto de *F. verticillioides* sobre las semillas de maíz Chalqueño se estableció el protocolo de infección con ambas cepas, MY3 y MY5, buscando que las semillas se infectaran pero que al germinar la planta tuviera una apariencia sana. Para establecer la metodología de infección se usaron semillas de maíz Chalqueño a las cuales se les quitó el pedicelo y algunas de ellas se les removió la testa y a otras se les dejó. Después las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio y se colocaron 15 semillas en un volumen total de 25 mL y fueron agitadas durante 1.5 h. El agua contenía una suspensión de conidios de *F. verticillioides*, para que al final el tratamiento las semillas estuvieran expuestas a distintos niveles de inóculo (Tabla 8). Estos niveles de inóculo provocaron una disminución en el porcentaje de germinación y crecimiento. Por lo que se decidió tratar a las semillas con cantidades menores de inóculo y sin remover la testa de las semillas (Tabla 8). Bajo estas condiciones sí se observó que las semillas germinaron incluso a 10000 conidios/ semilla, diferente a cuando se removía la testa, ya que a 10800 conidios la semilla no germinaba. En adelante solo se removió el pedicelo de las semillas, y estas se trataron con 3333, 6666 y 10,000 conidios/semilla.

Tabla 8. Condiciones de infección de las semillas de maíz con *F. verticillioides*.

Semillas	Solución concentrada (Conidios de <i>F. verticillioides</i> por mL)	Conidios totales de <i>F. verticillioides</i> en 25 mL	Conidios de <i>F. verticillioides</i> por semilla	Observaciones
Sin testa	65 x 10 ³ 80 x 10 ³ 95 x 10 ³	1625 x 10 ³ 2000 x 10 ³ 2375 x 10 ³	108.3 x 10 ³ 133.3 x 10 ³ 158.33 x 10 ³	Después de las 24 h hubo crecimiento de <i>F. verticillioides</i> en el tejido. La mayoría de las semillas no produjo planta. Por lo que se propuso usar menos conidios
Sin testa	6.5 x 10 ³ 8 x 10 ³ 9.5 x 10 ³	162 x 10 ³ 200 x 10 ³ 237 x 10 ³	10.8 x 10 ³ 13.33 x 10 ³ 15.8 x 10 ³	La mayoría de las semillas germinó y produjo plantas de 48 h. No se logró establecer el crecimiento de la planta en maceta, ni cuando se trataron con 10800 conidios/semilla.
Con testa	2 x 10 ³ 4 x 10 ³ 6 x 10 ³	50 x 10 ³ 100 x 10 ³ 150 x 10 ³	3333 6666 10000	Se observó un buen desarrollo de los de las plantas a las 48 h y posteriormente fue posible establecer el crecimiento de las plantas en maceta.

Las semillas sometidas a 3333 y 6666 conidios/semilla presentaron a las 24 h de germinación un desarrollo mayor respecto a las semillas geminadas a 10000 conidios/semilla. Sin embargo, comparando entre cepas, se observó que *F. verticillioides* MY3 (10000 conidios/semilla) produjo una reducción del crecimiento de la radícula y la germinación que no se observó con la cepa MY5 (Fig. 12).

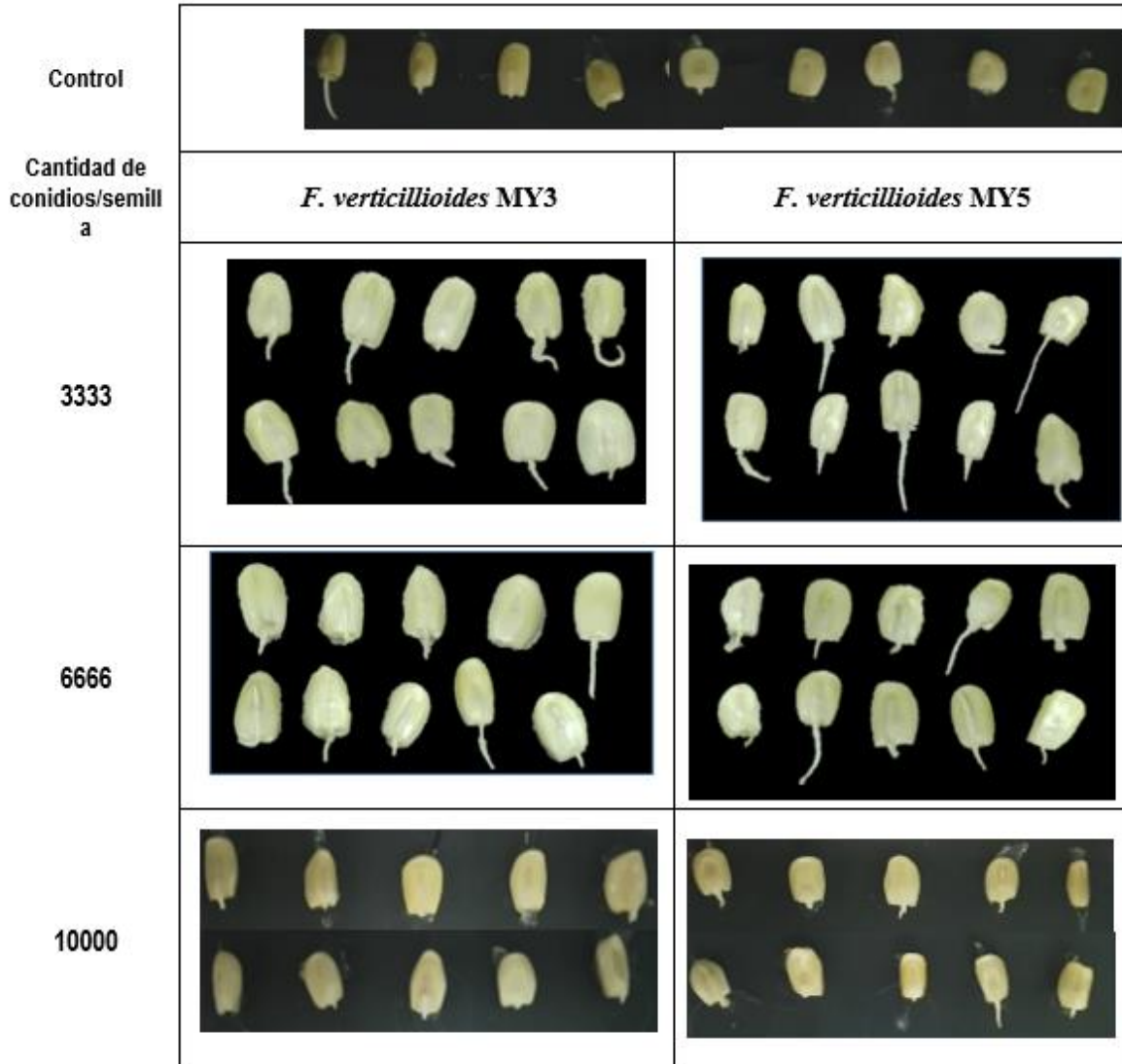


Figura 12. Efecto de *F. verticillioides* MY3 y MY5 sobre la germinación y crecimiento de las semillas de maíz a las 24 h de germinación. El experimento se repitió tres veces con un total de 105 semillas en cada experimento y se observaron resultados similares. Las imágenes para MY3 y MY5 infectadas con 3333 y 6666 conidios/semilla corresponde a la primera réplica, para las semillas infectadas con 10000 conidios/semilla y control corresponden a la tercera réplica.

A las 48 h de germinación fue notoria la colonización de las semillas de maíz Chalqueño por ambas cepas de *F. verticillioides* (Fig. 13). Hay un mayor número de plantas del tratamiento

de las semillas que fueron tratadas con *F. verticillioides* MY5 y tienen un crecimiento mayor que las que fueron obtenidas del tratamiento con *F. verticillioides* MY3 (Fig. 13).

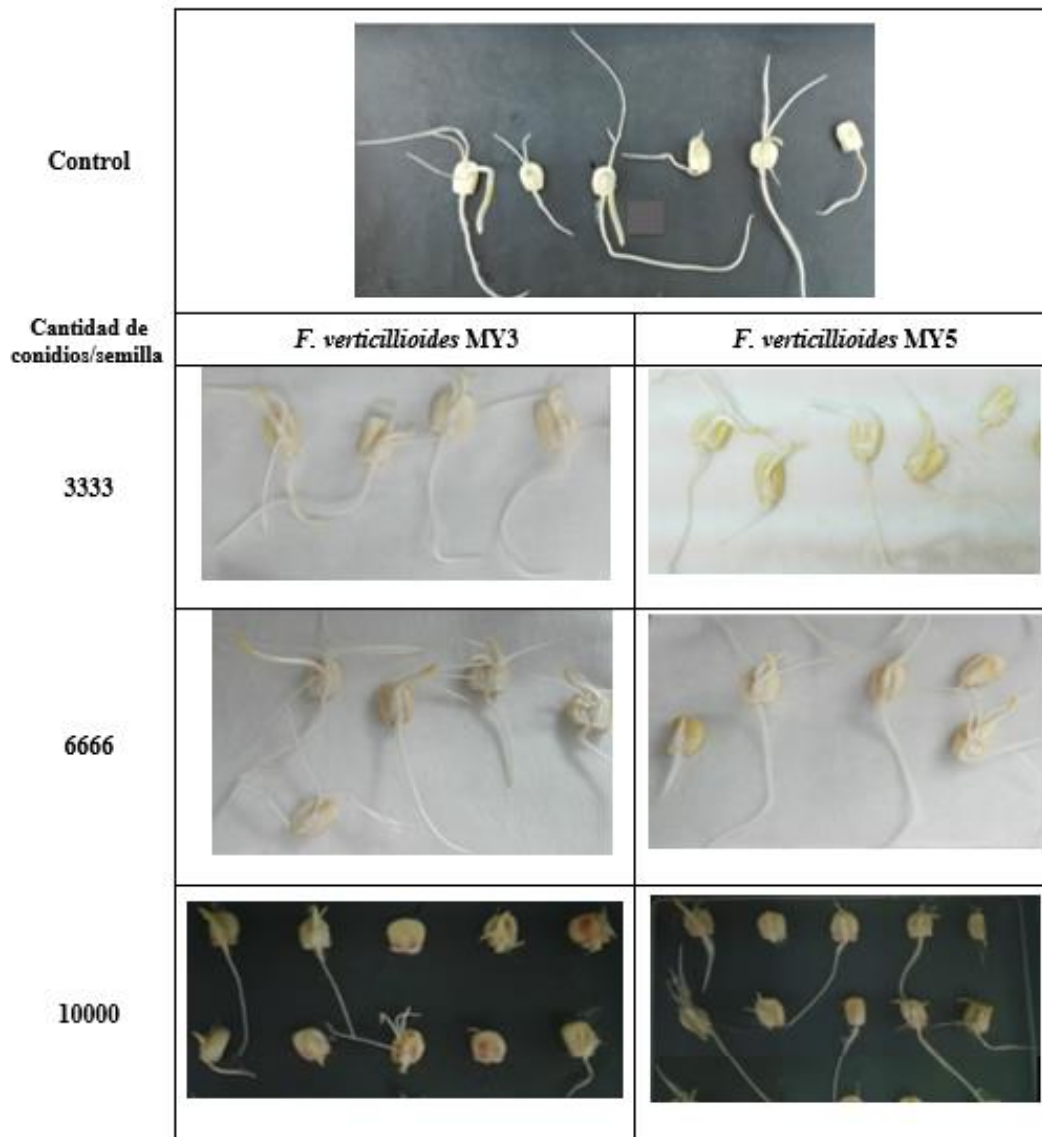


Figura 13. Efecto de *F. verticillioides* MY3 y MY5 sobre el crecimiento y germinación de las semillas de maíz a las 48 h de germinación. El experimento se repitió tres veces con un total de 105 semillas en cada experimento y se observaron resultados similares.

Efecto de *Fusarium verticillioides* en plántulas de maíz Chalqueño

Debido a que la presencia de *F. verticillioides* MY3 en las semillas de maíz disminuyó el crecimiento de las plantas, fue necesario determinar si éstas podían aún continuar su crecimiento, por lo que a las 48 h de germinación fueron trasplantadas a maceta con sustrato inerte. Se midió la parte aérea de las plantas de maíz al quinto y séptimo día del trasplante. Los tratamientos con los hongos no produjeron ninguna diferencia en el crecimiento de la parte aérea de las plantas de maíz (Fig. 14).

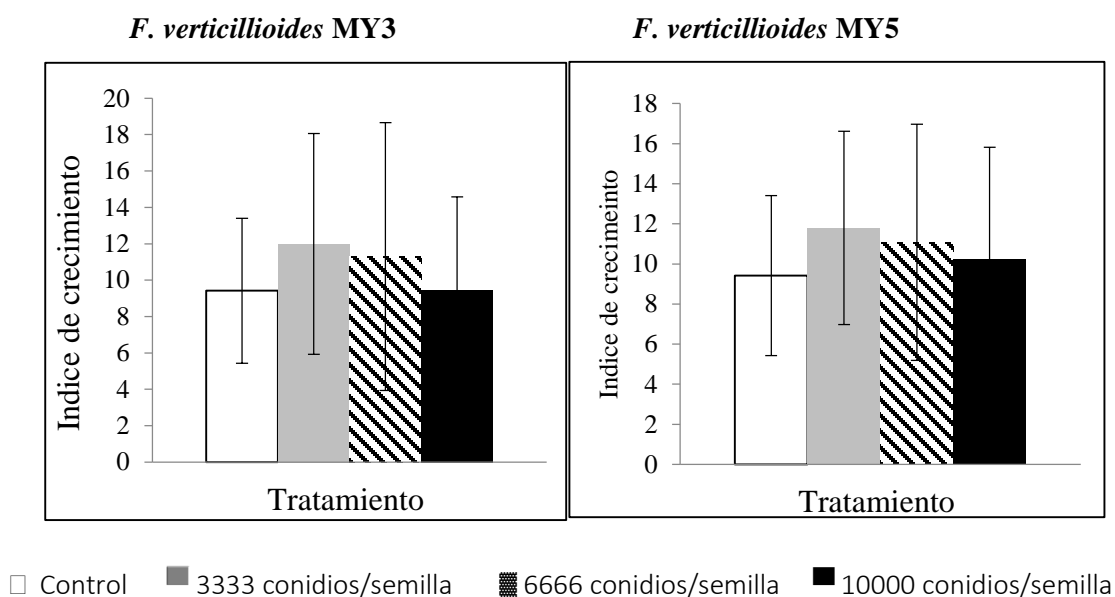


Figura 14. Efecto en el crecimiento de la parte aérea de plantas a los 7 días de la infección de semillas con *F. verticillioides* cepas MY3 y MY5. El experimento se realizó por triplicado, con 10 macetas para cada tratamiento para un total 70 macetas por réplica. La barra representa el promedio con su desviación estándar. El índice de crecimiento expresado como la diferencia de longitud entre el día 5 y el día 7 de cada una de las plantas.

Se crecieron las plantas hasta las dos semanas y se observó que aquellas que habían sido inoculadas con cualquiera de los dos hongos presentaban un ligero color café en algunas zonas de la hoja en, la punta o borde de la hoja (Fig. 15), lo que constituye un síntoma de tizón de plántula por *Fusarium*.

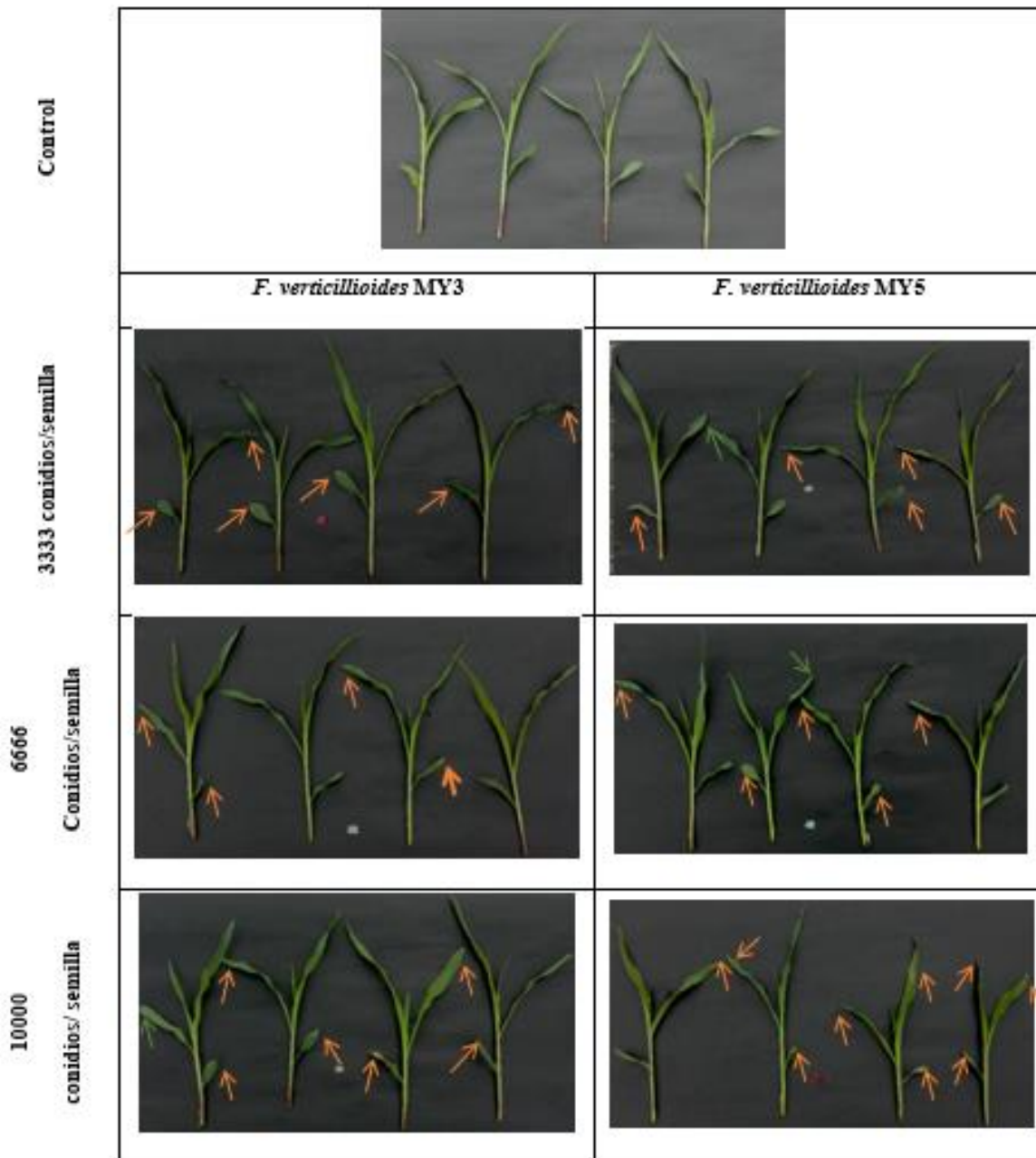


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas de *F. verticillioides* MY3 y MY5 en plantas de 2 semanas de crecimiento. El experimento se realizó por triplicado, con 10 macetas por tratamiento con un total 70 macetas por réplica. Las flechas en color naranja indican la zona de daño presente en la planta.

Debido a que no se observó cambio en el crecimiento de la parte aérea de las plantas entre cepas, pero sí una pérdida de color en las puntas de las hojas se determinó la concentración de clorofila en el tejido aéreo (Fig. 16). No se encontró un cambio significativo en la cantidad de clorofila en las hojas procedentes de los tratamientos con ambas cepas. Lo anterior puede deberse a que se usó todo el tejido aéreo para determinar la cantidad de clorofila, y no de las zonas discretas que presentaban los cambios en color.

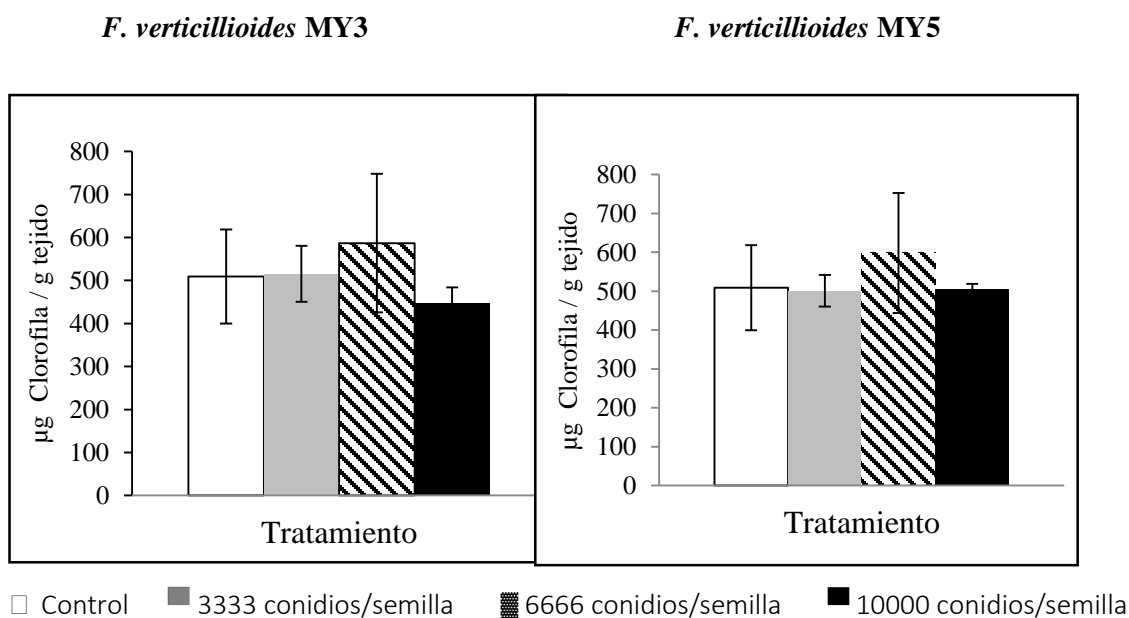


Figura 16. Efecto del biopriming con diferentes concentraciones de las cepas *F. verticillioides* MY3 y MY5 en el contenido de clorofila en la parte aérea de plantas de 2 semanas. La determinación se hizo por duplicado en las tres réplicas de cada uno de los tratamientos. La barra representa el promedio con su desviación estándar.

En resumen, a pesar de observar que *F. verticillioides* cepa MY3 afecta más al crecimiento de la planta de 48 h que la cepa MY5 (Fig. 13), el crecimiento de las plantas a los 7 (Fig. 14) y 14 días (Fig. 15 y 16) es similar. Debido a que apareció afectación en el crecimiento a tiempos cortos de la infección era posible que la planta estuviera desplegando sus mecanismos de defensa por lo que esto era necesario probarse.

Efecto de *F. verticillioides* sobre la expresión de los genes de defensa de la planta y del gen de patogenicidad del hongo (*FUM*).

Para determinar que las plantas se encontraban infectadas por *F. verticillioides* se determinó la expresión de uno de los genes 15 *FUM*, puesto que estos se expresan cuando el hongo entra en contacto con la planta. Los genes *FUM* codifican para las enzimas responsables de la síntesis de fumonisinas, siendo *FUM1* el que codifica para una policétido sintasa (Da Silva *et al.*, 2007). Como se observa en la Figura 17 el gen *FUM1* se expresa en las hojas a los 14 días de la infección con ambos hongos, MY3 y MY5.

Adicionalmente, como ya se mencionó anteriormente los organismos biótrofos activan la vía de defensa mediada por el ácido salicílico (SA). Mientras que los organismos necrótrofos o el daño por herida inducen la vía del ácido jasmónico (JA) (Guzmán-Chávez, 2013; Dotor-Robayo y Cabezas-Gutiérrez, 2014; Carvente-García, 2014). Debido a que *F. verticillioides* es un hongo hemibiótrofo se analizaron la abundancia de transcritos de los genes marcadores para la vía del SA y del JA, PAL y AOS, respectivamente, mediante la técnica de PCR punto final (Fig. 17) en la parte aérea de las plantas de maíz de 14 días de crecimiento y que provienen del tratamiento de infección con *F. verticillioides* MY3 y MY5, 10000 conidios/semilla. Se encontró que la expresión de PAL y AOS fue similar entre las hojas controles y las que provenían del tratamiento con *F. verticillioides*. Sin embargo, debido a que si se encontró al gen *FUM1* en las hojas de plantas de 14 días que provenían del tratamiento de infección de las semillas, se analizaron los transcritos de los genes de defensa mediante qPCR (Fig. 18).

La expresión del gen marcador de la vía de SA se indujo en la planta cuando fueron tratadas con *F. verticillioides* MY3 como en la MY5. Sin embargo, en el tejido que fue infectado con la cepa que produce un bajo contenido de FB1, la MY5, los niveles de transcrito son mayores que cuando se infecta el tejido con MY3. De manera similar, ocurre con el gen marcador de la vía del JA, AOS, también hay una inducción en su expresión, pero está es mayor cuando el tejido es infectado por la cepa MY5 (Fig. 18).

Lo anterior sugiere que la planta si enciende sus defensas pero es posible que la respuesta diferencial a cada una de las cepas pueda deberse a la capacidad proliferativa y de producción de FB1 de estas (Galeana et al., 2017).

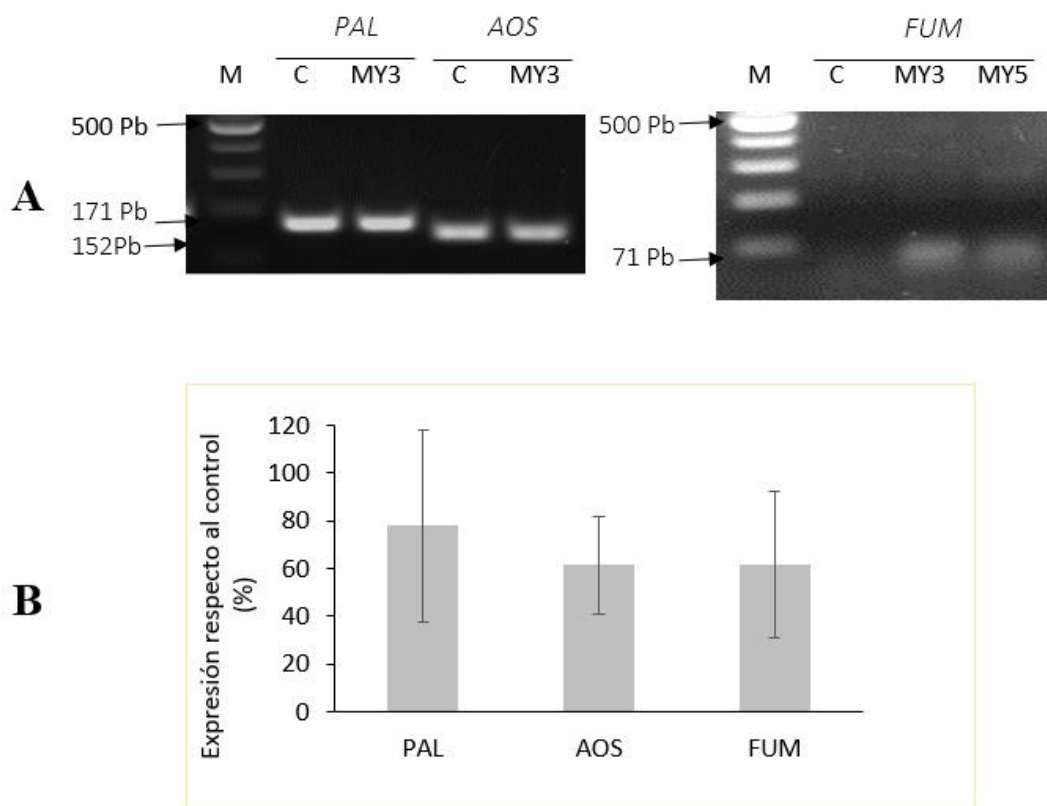


Figura 17. Efecto de la cepa *F. verticillioides* MY3 en la expresión de los genes de defensa y *FUM1* en la parte aérea de plantas de 2 semanas de crecimiento a través PCR punto final. (A) Separación de los productos de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa. (B) La intensidad de las bandas producidas se obtuvo por densitometría. El % de expresión se determinó restando la intensidad del tratamiento con infección al tratamiento control respectivo. El experimento se realizó por triplicado en tejido que provenida de semillas tratadas con 10000 conidios de *F. verticillioides* MY3 o MY5/semilla. Se reporta el promedio con su desviación estándar, M: marcador; C: plantas control (sin infección)

Por lo anterior, confirmamos que los niveles de inóculo empleados permiten que la planta se desarrolle, aun cuando las plantas se encuentran conteniendo contra el patógeno, puesto que ambas cepas inducen las dos vías de defensa de la planta.

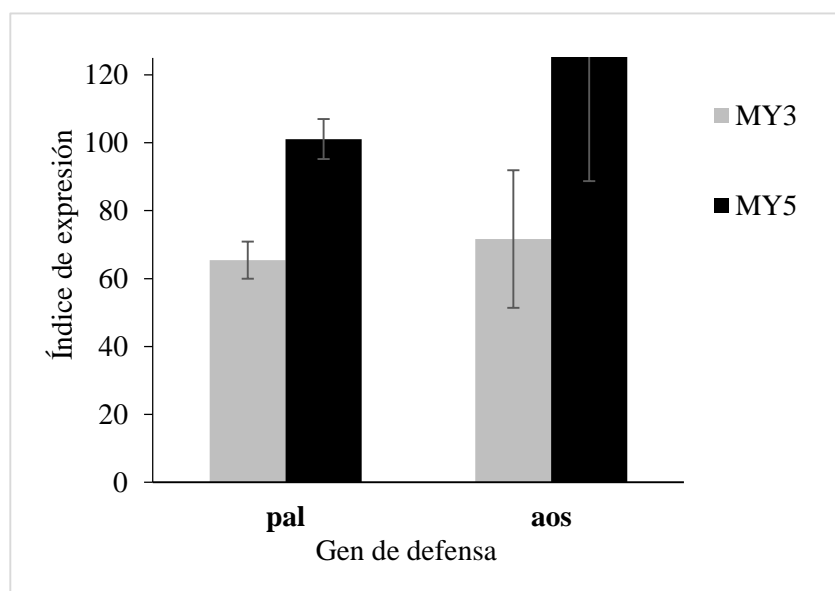


Figura 18. Efecto de las cepas *F. verticillioides* MY3 y MY5 en la expresión de los genes de defensa en la parte aérea de plantas de 2 semanas. A través de la técnica de qPCR. El análisis se realizó con el tejido que fue infectado con una concentración de 10000 conidios/semilla de cada cepa. Se reporta el promedio con su desviación estándar. El índice de expresión se determinó usando la ecuación que propone Pfaffl (2001).

Obtención y calibración del RNA y optimización de las condiciones de amplificación por PCR punto final de los SWEETs 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 de maíz.

Los microorganismos que interactúan con las plantas usan diferentes estrategias para invadirla, sin embargo, uno de los blancos comunes es obtener los azúcares de la planta para sustentar su crecimiento (Doody *et al.*, 2012). Se tiene evidencia que la expresión de ciertos SWEETs aumenta cuando un patógeno infecta a la planta y se sugiere que esto llevaría a que el SWEET exporte azúcares de la planta favoreciendo el crecimiento del microorganismo (Xuan *et al.*, 2013; Carvente-García, 2014).

Con el objetivo de determinar el efecto de la interacción del maíz con el hongo *F. verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de azúcares difusionales tipo SWEET se realizó primero un análisis bioinformático, con la finalidad de determinar cuáles son los SWEETs que se expresan en la parte aérea del maíz. Al examinar la base de datos de MaizeGDB y los datos obtenidos por Delgado-Rubio (2017), se encontró que los que se expresan en la parte aérea son SWEET 1b, 4a, 13b, 13b y 17. Se diseñaron varios oligonucleótidos para realizar la determinación de la expresión por PCR tiempo final y real de los SWEETs elegidos. Las condiciones óptimas de amplificación de algunos de ellos para su detección por QPCR punto final fueron obtenidas por Delgado-Rubio (2017), mientras que aquellos que fueron usados para la detección por PCR tiempo real fueron diseñados y optimizados en este trabajo (Anexo 3).

El RNA fue obtenido de 4 plantas de cada tratamiento por cepa y se calibró el RNA de cada una de las tres réplicas utilizadas. En la Figura 19 se muestra una de las calibraciones realizadas. La intensidad de la banda del RNA ribosomal 28s fue el que se tomó como base para la calibración.

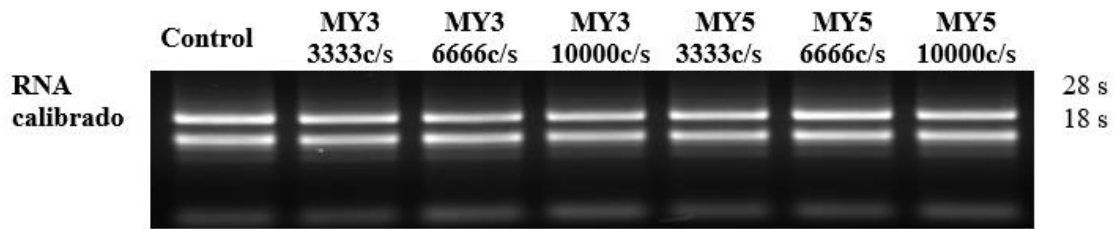


Figura 19. Separación en gel de agarosa del RNA de la parte aérea de la planta de maíz de dos semanas de crecimiento. El volumen de RNA que se utilizó en el gel, fue el mismo usado para la obtención de cDNA y este se usó para la amplificación de los SWEETs mediante PCR punto final y PCR tiempo real. Las cantidades de conidios/semilla fueron 333, 666 y 10000, para ambos hongos.

Expresión de los transportadores SWEET 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 durante la interacción de *F. verticillioides* en plantas de maíz por PCR punto final.

La abundancia de los transcritos para SWEET1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 fueron analizados en las hojas de plantas tratadas con *F. verticillioides*, 3333, 6666 y 10000 conidios/semilla. El SWEET que se expresó menos fue el 15a en las tres réplicas (Anexo 4), también el SWEET1b tuvo baja expresión. Para analizar los resultados se obtuvo la densitometría de las bandas en las tres réplicas, se realizó el índice de expresión de los SWEETs de las hojas de los diferentes tratamientos con la expresión del gen de referencia, el 18s y se consideró la expresión en los tejidos control como el 100 % (Fig. 20). No se encontró diferencia en la expresión de ninguno de los SWEETs analizados con ninguno de los hongos ni con el control. Aunque la expresión de SWEET13 dio valores diferentes entre réplicas.

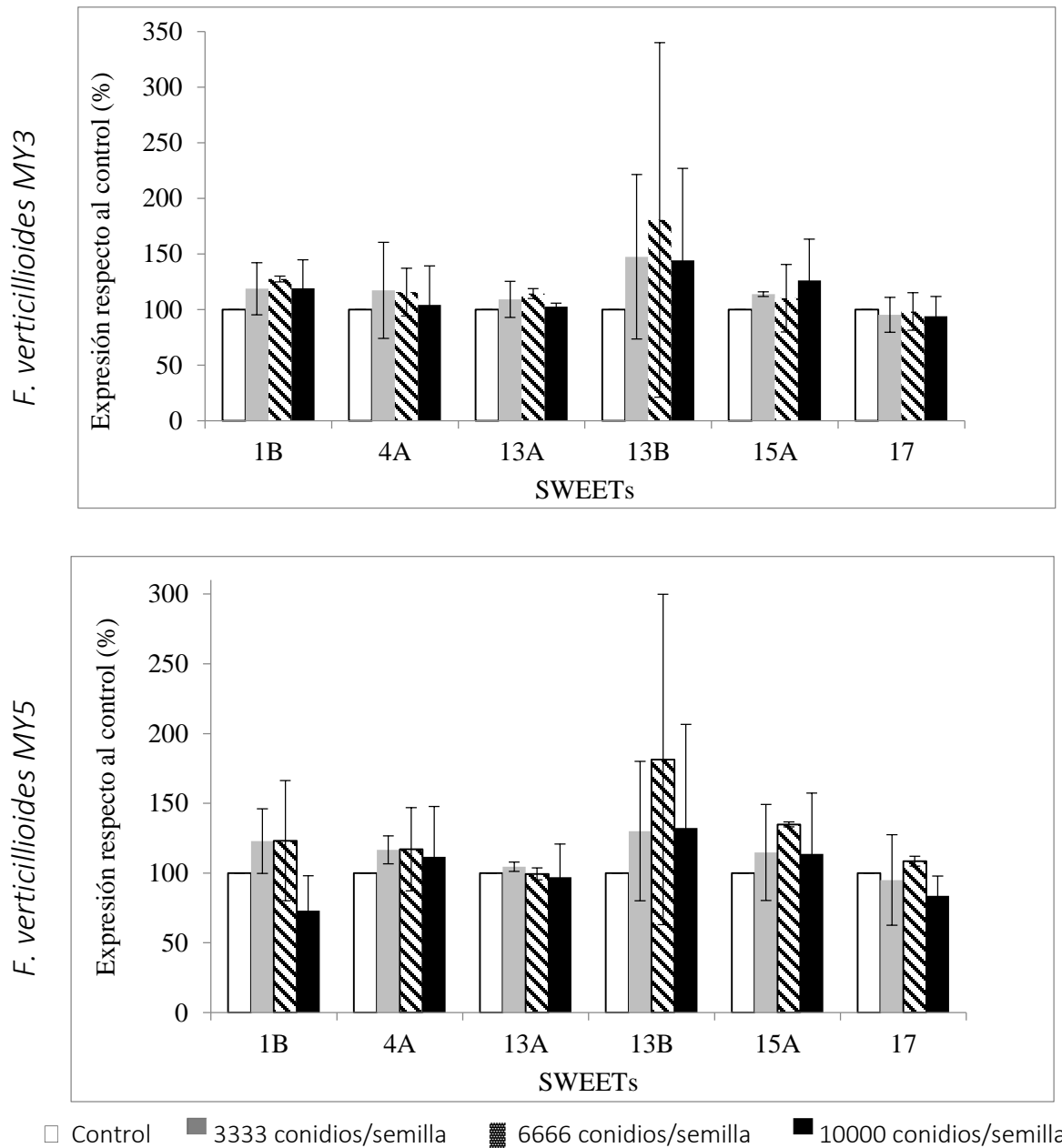


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de las cepas *F. verticillioides* MY3 y MY5 en la expresión de los SWEETs en la parte aérea de plantas de 2 semanas, análisis por PCR punto final. Los niveles de expresión se obtuvieron al obtener el índice de la intensidad de las bandas amplificadas y separadas por electroforesis en gel de agarosa al 2 % sobre la intensidad de banda del gen de referencia (18s) de cada tejido en las tres réplicas biológicas, tomando como tratamiento control el 100 %. La barra representa el promedio con su desviación estándar. N=2 en los tratamientos 3333 y 6666 conidios /semilla y N=3 en el tratamiento 10000 conidios/semilla.

Análisis de la expresión de los transportadores SWEET 1b, 4a, 13a, 13b, 15a y 17 tras la interacción de *F. verticillioides* en plantas de maíz por PCR tiempo real.

También se analizó la expresión de los transcritos para los SWEETs de hoja mediante qPCR. La concentración de conidios usada para los tratamientos con *F. verticillioides* fue de 10000 conidios/semilla. Se tomó como gen de referencia al *zm18s*. Se encontró que los transcritos de los SWEETs analizados tuvieron una menor abundancia en las hojas que provienen del tratamiento con *F. verticillioides* MY3 con respecto a los controles no inoculados, mientras que la cepa MY5 no afectó la expresión de los genes SWEETs estudiados.

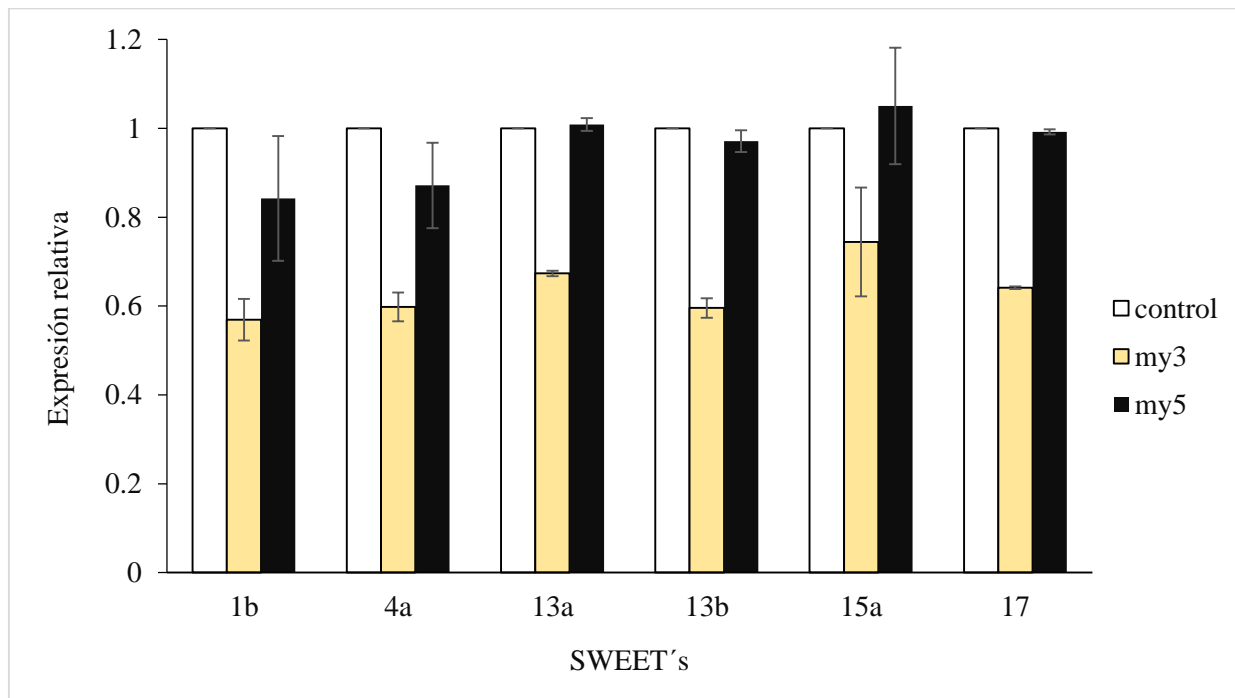


Figura 21. Efecto de las cepas *F. verticillioides* MY3 y MY5 en la expresión de los SWEETs en la parte aérea de plantas de 2 semanas de crecimiento, análisis por q-PCR. Estandarizado con gen referencia *Zm18s*. las barras muestran el promedio y la desviación de dos réplicas biológicas cada una realizada con 3 réplicas técnicas.

DISCUSIÓN

***Fusarium verticillioides* cepa MY3 se propaga más en semillas y plantas de maíz que la cepa MY5**

Los transportadores SWEETs son uno de los blancos de diferentes microorganismos (Eom et al., 2015). Por ejemplo, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryza* (Xoo) es el agente etiológico de la enfermedad del tizón bacteriano en arroz, es capaz de producir e inyectar a plantas de arroz efectores proteicos, los denominados TAL (transcription activator-like factor). Estos son capaces de reconocer a los EBES (effector-binding elements) en los genes SWEETs de la planta, induciendo su transcripción, sugeriendo de que la unión de los TAL a las EBES es lo que lleva a que los azúcares estén disponibles para el patógeno y la planta sea susceptible a la enfermedad.

La mayor parte de los SWEETs que pertenecen al clado III, aquellos que se sugiere pueden transportar sacarosa, son el blanco de los efectores de Xoo (Streubel et al., 2013; Zhou et al., 2015). Debido a que es posible producir efectores artificiales (Cox et al., 2017; Doucouré et al., 2018) y a que también se pueden inducir mutaciones en la región promotora de los SWEETs (Oliva et al., 2019), se ha sugerido que alguna de esas estrategias podría ayudar a reducir la sensibilidad de los cultivos a enfermedades.

Es importante determinar si otros microorganismos tienen estrategias similares de infección en plantas de interés agronómico. En este trabajo se utilizaron como organismos de estudio al maíz, por ser un cultivo de importancia mundial, y a su principal hongo patógeno *F. verticillioides*, para determinar si la presencia del hongo afecta la abundancia de transcritos para los SWEETs de hoja.

Fusarium verticillioides afecta el desarrollo de la planta, produciendo diferentes tipos de enfermedades dependiendo del estadio del desarrollo y del tejido. La pudrición del tallo es común en climas secos y cálidos y comienza antes de la floración; mientras que la pudrición de la mazorca por *F. verticillioides* generalmente ocurre porque las mazorcas son invadidas por los barrenadores del tallo, los granos presentan una acumulación de hongo de aspecto algodonoso y de color rosa, además se forman rayas blancas en el pericarpio. Las semillas aún germinan en presencia del hongo (CYMMYT, 2004).

La infección y propagación de *F. verticillioides* en las semillas y plantas depende de muchos factores, se ha sugerido que la presencia de micotoxinas tiene un papel en la virulencia y la infección de plántulas, aunque parece no ser indispensable para la infección del tallo y mazorca, así como su pudrición (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014). *F. verticillioides* es capaz de sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios entre ellos las fumonisinas, dentro de esta familia predominan las fumonisinas tipo B, siendo la FB1 la que conforma más del 75 % del total. Sin embargo, la concentración de FB1 producida por las cepas de *Fusarium verticillioides* es variable (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

Para determinar los efectos de *F. verticillioides* sobre los transportadores SWEETs del maíz, se evaluó el efecto de dos cepas de *F. verticilliodes* sobre la producción de plantas de 48 h de crecimiento y el establecimiento de las plantas de 14 días de crecimiento de maíz Chalqueño. El crecimiento de plantas de 48 h de germinación fue menor cuando se inoculó la semilla de maíz con *F. verticillioides* cepa MY3, que cuando se hizo con la cepa MY5, además se observó en las primeras la aparición de micelio algodonoso. Sánchez-Rangel y colaboradores (2005) caracterizaron la producción de FB1 en diferentes cepas de *Fusarium verticillioides*. La cepa MY3 es capaz de producir grandes cantidades de FB1 (1699 µg/g) en comparación con la cepa MY5 (1.3 µg/g), sugerente de que los efectos de cada una de las cepas sobre el maíz Chalqueño puede ser un efecto de la cantidad de FB1 producida por el hongo, aunque desconocemos si cada uno de estos hongos también produzca una cantidad y variedad de metabolitos secundarios distintos que también puedan afectar el crecimiento de la planta.

Se comprobó que ambas cepas se encontraban transcribiendo el gen FUM1, esto fue utilizando los oligonucleótidos reportados por Sánchez-Rangel *et al.*, (2005), quienes los diseñaron para amplificar el dominio α -cetoacil reductasa de la primera enzima de la vía de síntesis de fumonisinas, una policétido sintasa (FUM1). Si bien ambas cepas extraídas de las semillas de maíz Chalqueño que habían sido inoculadas con el hongo, transcribían al gen FUM1, desconocemos los niveles de FB1 en las plantas con 48 h de crecimiento.

Las plantas de 14 días obtenidas de las semillas que fueron inoculadas *F. verticillioides* MY3, presentaron daño macroscópico en la parte aérea de la planta, aunque escaso. Es posible que el hongo haya generado necrosis en partes discretas de la hoja, aunque al realizar el análisis

del contenido de clorofila no se observó cambio, probablemente debido a que se tomó toda la parte aérea de las plantas.

A pesar de no observar cambios en el crecimiento de las plantas de 14 días infectadas respecto al control, si se encontró que ambos hongos tanto MY3 como MY5 incrementaban los transcritos para PAL y AOS, genes que fueron usados como marcadores del encendido de las vías de defensa del ácido salicílico y del ácido jasmónico, respectivamente. Por lo que la plantas están respondiendo ante la infección de ambos hongos, percibiéndolos probablemente como hemibiotrófos (Ruthertford et al., 2002), puesto que ambas vías, la que responde a patógenos biótrosos y la que responde a patógenos necrótrofos, se encontraban encendidas. De la Torre y colaboradores (2010) reportan la presencia de ácido salicílico y la activa degradación del DNA en embriones que fueron inoculados con FB1, evidencia de la actividad necrotrófica de los hongos productores de FB1.

La producción de fumonisinas depende de factores nutricionales como la disponibilidad de carbono y nitrógeno. El amonio reprime la producción de micotoxina y un bajo contenido de almidón también lleva a una pobre producción de esta (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014). El contenido de amonio y almidón es distinto en la semilla, en la planta de 48 h de crecimiento (Sánchez-Linares et al., 2012) y en las plantas de 15 días (Guzmán-Chávez, 2013), los dos últimos son tiempos en los cuales se obtuvieron los tejidos para este estudio. En la semilla de maíz es conocido que tiene altas concentraciones de almidón, cerca del 80 % de su peso y localizada en el endospermo (Bewley *et al.*, 2013), mientras que, en las plantas de 48 h, se reduce el porcentaje de almidón en el endospermo de la semilla, puesto que se metaboliza para el desarrollo de la planta, al menos en este trabajo esto fue así, ya que las semillas se mantuvieron en agar en oscuridad por 48 h, lo que no permite que los cloroplastos se desarrollen. Mientras que en las plantas de 15 días se obtuvieron a partir de las semillas crecidas por 48 h en agar y su posterior trasplante a maceta y crecimiento en condiciones de invernadero con fotoperiodo natural, estas plantas tienen cierto contenido de almidón en sus hojas, puesto que en la noche la planta sobrevive con esa reserva de carbono.

Por lo anterior, la cantidad de fumonisinas a diferentes tiempos del crecimiento de las plantas podría variar, lo que afectaría de manera distinta la capacidad de infección del hongo. Sugerimos que se reduce la cantidad de FB1 a tiempos más prolongados del crecimiento,

puesto que los efectos más pronunciados en el crecimiento de las plantas los encontramos a las 48 h más que a los 14 días. En campo, se ha encontrado que las especies del género *Fusarium* que infectan al maíz producen fumonisinas principalmente antes de la cosecha, aunque también se ha observado que hay producción de fumonisinas después de cosechar el grano, solamente que en condiciones adversas de crecimiento (Chulze, 2010). Debido a que desconocemos cuales son las concentraciones de fumonisinas en los tiempos que se estudiaron proponemos que es necesario obtenerlas para determinar el posible escenario de efectos que se podrían explicar debido a estas concentraciones.

Puesto que lo que se buscaba en este trabajo era que las plantas se encontraran frente al reto de un patógeno, para determinar posteriormente su efecto en la expresión de los transportadores difusionales tipo SWEETs en la planta, se buscaron las concentraciones de conidios que permitieran la infección, pero que la planta pudiera continuar su crecimiento. Es por ello se eligió utilizar 10000 conidios del hongo/semilla para hacer las inoculaciones, puesto que a las 48 h y a los 14 días las plantas sobrevivían y se encendía la respuesta de defensa de la planta. Además, de que al menos a las 48 h si había una diferencia en el crecimiento de la planta infectada con *F. verticillioides* MY3 contra la cepa MY5.

Expresión de los SWEET de hojas se reduce cuando se encuentra infectada por la planta por *Fusarium verticillioides* MY3.

Los SWEETs son transportadores difusionales bidireccionales, con Kms que se encuentran en el intervalo de 10 a 100 mM, lo cual les permite el transporte de cantidades grandes de azúcares, mismas que son necesarias en procesos como el llenado del floema, la secreción de néctar, la germinación y durante la interacción planta-patógeno (Eom *et al.*, 2015; López-Coria *et al.*, 2019).

En este trabajo se encontró que solo la cepa de *F. verticillioides* MY3, o alta productora de fumonisinas, afectó la abundancia de los transcritos para ZmSWEET1b, 4a, 13a, 15a, y 17. La abundancia de transcritos se redujo, e indica que podría ser una respuesta de la planta ante la presencia del hongo para reducir el escape de azúcares. Lo anterior se observó pese a que las plantas no presentaban síntomas de la enfermedad. Galeana y colaboradores (2017)

describieron que la cepa MY3 es más agresiva que la cepa MY5, se producen más conidios en el tejido infectado así como pigmentación rosada y hasta necrosis. La cepa MY3 es capaz de reducir la actividad de una de las

En maíz, la familia contiene 22 miembros, algunos aún putativos y no todos se expresan en todos los tejidos y estadios del crecimiento de la planta. ZmSWEET4c es importante en la embriogénesis, durante el llenado del endospermo y la formación del embrión en maíz y arroz (Sosso et al., 2015). Durante la germinación, los transcritos para ZmSWEET4c son abundantes en el eje embrionario y en el escutelo, ambas estructuras que conforman el embrión del maíz, sugere que el transporte de hexosas es necesario para que se lleve a cabo la germinación del maíz (López-Coria et al., 2019), puesto que ZmSWEET4c es un transportador de hexosas de la membrana plasmática (Sosso et al., 2015). Aquí encontramos que la transcripción de ZmSWEET4a se redujo, si se traduce a proteína y por pertenecer al clado II y ser parálogo a ZmSWEET4c podría ser un transportador de hexosas.

Otros transcritos que son abundantes en los tejidos embrionarios del maíz a lo largo de la germinación son ZmSWEET6b, 11, 13a, 13b y 14a (López-Coria *et al.*, 2019), de estos solo ZmSWEET6b es transportador de hexosas y los otros son específicos para sacarosa, todos de la membrana plasmática (comunicación personal López-Coria Montserrat).

Plantas triples mutantes de la familia ZmSWEET13 (a, b y c) acumulan azúcares en la hoja y presentan un crecimiento reducido, sugere de la importancia de la familia SWEET13 en el cargado del floema (Bezruczyk *et al.*, 2018). Delgado-Rubio (2017) encontró que diferentes miembros de la familia ZmSWEET13 se expresan en las hojas a los diferentes estadios del desarrollo de la planta, excepto en las hojas que envuelven la mazorca, en donde los transcritos más abundantes son los del ZmSWEET4a. Los coleóptilos que son la cubierta de las primeras hojas de la planta, presentan una estructura de arreglo del floema que no es el típico de una planta C4, como el maíz, y contiene en abundancia a los transcritos para ZmSWEET4a. Además, ZmSWEET1b se expresa abundantemente en hojas de 1 y 3 meses. Por lo que se propone que dependiendo de la morfología y capacidad fotosintética de las hojas se expresaran diferentes SWEETs, en tejidos jóvenes con baja actividad fotosintética ZmSWEET4a y en los otros ZmSWEET13 y 1b. Estos SWEETs se transcribieron menos en

presencia de *F. verticillioides* MY3, por lo que es probable que en la planta haya una reducción general del transporte de sacarosa y hexosas.

Sin embargo, la disminución de los transcritos para los SWEETs de hoja solo ocurre con la cepa altamente productora de FB1, lo que podría ser un efecto precisamente de la presencia de la micotoxina. Hay evidencias de que la FB1 es capaz de aumentar la fluidez de la membrana plasmática en macrófagos y de aumentar la peroxidación de lípidos (Ferrante *et al.*, 2002). En plantas, también se han encontrado efectos directos sobre la membrana. Por ejemplo, en membranas aisladas de tejido embrionario de maíz, FB1 es capaz de inducir la salida de electrolitos, la peroxidación de lípidos e incrementar la fluidez de la membrana, (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005), aunque *in vivo* también modifica la composición de las membranas y en lugar de incrementar la fluidez la reduce (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020). El efecto en la síntesis de esfingolípidos se debe a que la FB1 es capaz de atravesar no solo la membrana plasmática, sino que puede llegar hasta el retículo endoplásmico, inhibiendo de manera específica a la ceramida sintasa (Delgado *et al.*, 2006). Lo anterior ocasiona que los niveles de esfinganina se incrementen, mientras que otros como la glucosilceramida disminuyan, llevando a que la membrana plasmática tenga un incremento en su permeabilidad y un decremento en su fluidez (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2020). El cambio en la composición membranal o el estado en la fluidez de la membrana podría ser una señal para cambiar la expresión de las proteínas membranales como la de los SWEETs. Lo anterior necesitaría verificarse tratando a las plantas con FB1 y observando si hay cambios en la expresión de los SWEETs, o bien utilizando mutantes que presenten una composición distinta de esfingolípidos que nos pudiera dar claves sobre como ocurre el cambio en la expresión de los SWEETs.

Otra posibilidad, es que de manera general la expresión de genes se esté cambiando en las plantas tratadas con *F. verticillioides* MY3, por lo que habría que medir la expresión de otros genes que no sean transportadores, aunque observamos que el gen de referencia que se usó no cambio entre las plantas tratadas con las diferentes cepas ni en el control.

En maíz, se ha estudiado la expresión de los ZmSWEET cuando la planta ha sido sometida a un tratamiento con hongos benéficos del género *Trichoderma*, los cuales promueven el crecimiento de la planta y aumentan las defensas de la planta contra el reto posterior con un

hongo patógeno (Guzmán-Chávez, 2013). Las plantas tratadas con *T. asperellum* presentan una reducción en transcripción de ZmSWEET1b, 4a, 13a, 15a, y 17 entre el 10 y 20 %, mientras que *T. virens* induce la expresión de ZmSWEET 13a, 13b y 17 y *T. atroviridae* no modifica la expresión de ninguno de los SWEETs de las hojas. De los tres hongos *T. asperellum* es el del crecimiento más acelerado, por lo que es probable que la planta reduzca la expresión de los ZmSWEETs en la hoja, para que el carbono que se dirige hacia los tejidos demanda se reduzca (Méndez-Ramírez, 2018).

Los hongos del género *Trichoderma* se establecen en las raíces, y cuando están en contacto con la planta de maíz, inducen la expresión de un transportador de sacarosa, así como también de una invertasa intracelular (Vargas *et al.*, 2011). Lo anterior indica que los hongos del género *Trichoderma* requieren sacarosa para su crecimiento. De hecho, Palacios-Vargas (2016) encontró que hay mayor abundancia de transcritos para los SWEETs 2, 12a y 14b en las raíces del maíz. López-Coria comprobó que SWEET14b es un transportador de Sac y que en los exudados de las raíces hay una mayor cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa (datos por publicar). Estos resultados apoyan la sugerencia de que el hongo se encuentra solicitando azúcares de la planta, principalmente sacarosa, para mantener su crecimiento. Desconocemos si los SWEETs de las raíces también se ven afectados cuando la planta es infectada por *F. verticillioides*, y si cambian podría deberse al efecto de la menor transcripción de los transportadores de la hoja, ya que *F. verticillioides* prefiere infectar tejido aéreo, es una posibilidad que podría explorarse.

CONCLUSIONES

Se estudió la expresión de los transportadores SWEETs de las hojas de maíz durante la interacción de la planta con dos cepas del hongo patógeno *F. verticillioides*, encontrando que la cepa MY3 provocó una reducción en la expresión de los SWEETs de hojas de maíz de 14 días de crecimiento e incrementa la expresión de los genes de defensa, aun cuando las plantas no presentan síntomas de enfermedad. Por su parte, la cepa MY5 de *F. verticillioides* también induce las vías de defensa, pero no tiene un efecto en la expresión de los SWEETs de hoja. Una de las diferencias entre ambas cepas es su capacidad muy distinta de producción de FB1, MY3 puede producir más que MY5, sin embargo, desconocemos si esa diferencia fue la responsable de la reducción de la expresión en los SWEETs de hojas o bien que la planta respondió distinto ante la presencia del hongo.

PERSPECTIVAS

- Para determinar si la FB1 es la responsable de la reducción en la abundancia de los transcritos de los SWEETs, se realizaría la inoculación de la FB1 en embriones de maíz de acuerdo a Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005, Sánchez-Rangel *et al.*, 2012 y De la Torre-Hernández *et al.*, 2010, o bien la infiltración de hojas de plantas de 14 días de crecimiento y después aislar el RNA para determinar mediante PCR cuantitativa la expresión de los SWEETs.
- Analizar la abundancia de los SWEETs en las raíces de plantas de 48 y 14 días de crecimiento, provenientes de semillas tratadas con *F. verticillioides* cepa MY3, para determinar si los SWEETs de hojas también se están afectando.
- Determinar el contenido de FB1 mediante HPLC (high-performance liquid chromatography) o por un análisis tipo ELISA (Nguegwouo *et al.*, 2017) en coleóptilos de 48 h y hojas de 14 días de crecimiento.

REFERENCIAS

- Antonio-Velázquez C. 2004. Detección no destructiva de los periodos críticos del maíz. Tesis Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN.pp5
HTTP://WWW.CTRL.CINVESTAV.MX/~MOISES/TESISMAESTRIA/TM_CAROLINA310504.PDF
- Arispe-Velázquez JA. 2014. Biocontrol de la pudrición de mazorca causada por *Fusarium sp.* en cuatro genotipos de maíz con *Trichoderma spp.* bajo condiciones de campo en la región de Tepalcingo, Morelos. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.pp1,7
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 1 (24), 1-16.
- Baker RF, Leach KA, Braun DM. 2012. SWEET as sugar: New sucrose effluxer in plants. *Molecular Plant* 5(4), 766-768.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H, Nonogaki H. 2013. Seeds. Physiology of development, germination and dormancy. 3^{ra} Edición Springer. Pp 183-246. ISBN 978-1-4614-4693-4
- Bezruczyk M, Hartwig T, Horschman M, Char SN, Yang J, Yang B, Sosso, D. 2018. Impaired phloem loading in Zmsweet13a, b, c sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytol.* 218(2), 594–603. <https://doi.org/10.1111/nph.15021>
- Bonilla-Morales N. 2009. Manual de recomendaciones técnicas cultivo de maíz. Instituto Nacional de innovación y Transferencias en Tecnología Agropecuaria. San José, Costa Rica. Recuperado de: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00178.pdf>, [consultado:16/08/2017.](#)
- Briones-Reyes D. 2013. Diversidad genética en el patosistema maíz-Fusarium. Tesis Doctorado, Instituto de Enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Edo. México, 53
- Camarena-Gutiérrez G, 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual, *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 13(2), 157-162.
- Cantú-Rodríguez J.M. 1998. Distribución de cepas de *Fusarium moniliforme* productoras de fumonisinas B1 en maíz cultivado en el estado de Nuevo León. Tesis Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Sn Nicolás de los Garza, N.L pp 5-16

- Carvente-García R. 2014. Clonación molecular y perfil de expresión del RNAm de un transportador de azúcares tipo SWEET durante la infección del maíz por los hongos *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Castro-del Ángel, E. 2011. Interacción de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Sin. *F. moniliforme* Sheld.) en diferentes materiales de maíz y evaluación *in vitro* con *Trichoderma* spp. como biocontrol. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria. Pp 1. Recuperado de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4310/T18623%20CASTRO%20DEL%20ANGEL,%20EPIFANIO%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Frommer WB. (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468(7323), 527–532. doi:10.1038/nature09606
- Chen HY, Huh JH, Yu YC, Ho LH, Chen LQ, Tholl D, Frommer WB, Guo WJ. 2015a. The Arabidopsis vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts Pythium infection. *Plant J* 83 (6): 1046-1058.
- Chen, L.-Q., Lin, IW, Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, HE, Londoño, A., ... Frommer, WB 2015b. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the Arabidopsis Embryo. *The Plant Cell* 27 (3), 607–619. doi: 10.1105 / tpc.114.134585.
- Chulze S. 2010. Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review. *Food Addit. Contam.* 27, 651–657.
- CIMMYT. 2004. Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F.: CIMMYT. ISBN: 970-648-128-1
- CONABIO <http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/maices/grupos/chalqueno.html>
- Cox K, Meng F, Wilkins K, Li F, Wang P, Booher NJ, Carpender SCD, Chen LQ, Zheng H, Gao X, Zheng Y, Fei Z, Yu JZ, Isakeit T, Wheeler T, Frommer WB, He P, Bodanove AJ, Shan L. 2017. TAL effector driven induction of a SWEET gene confers susceptibility to bacterial blight of cotton. *Nat. Commun.* 8, 15588. <https://doi.org/10.1038/ncomms15588>

- Da Silva VN, de Araujo J, Durigon EL, Corrêa B. 2007. Sequence variability in the FUM1 gene of *Fusarium verticillioides* strains. *Can J Microbiol.* 53(3), 446-449.
- De la Torre-Hernández ME, Sánchez-Rangel D, Galeana Sánchez E, Plasencia de la Parra J. 2014. Fumonisin- síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91
- De la Torre- Hernández ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernández N, Cruz-Ortega R, Plasencia J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germination maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74, 337-345.
- Delgado A, Casas J, Llebaria A, Abad JL, Fabrias G. 2006. Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1758 (12), 1957-1977.
- Delgado-Rubio NE. (2017). Perfil de expresión de seis transportadores de azúcares tipo SWEET en diferentes etapas del desarrollo de las hojas de maíz. Tesis para obtener el grado de Químico en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Deras-Flores SIN FECHA. Guía técnica El cultivo del maíz. <http://repiica.iica.int/docs/b3469e/b3469e.pdf>
- Doidy, J., Grace, E., Kühn, C., Simon-Plas, F., Casieri, L., & Wipf, D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Sci.* 17(7), 413-422. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.009
- Dotor-Robayo M.Y., Cabezas-Gutiérrez M. 2014. Mecanismo de resistencia Sistémica en Plantas, *Acta Iguazu*, 2(2): 1-19
- Doucouré H, Pérez-Quintero AL, Reshetnyak G, Tekete C, Auguy F, Thomas E, Koebnik R, Szurek B, Koita O, Verdier V, Cunnac S. 2018. Functional and genome sequence-driven characterization of TAL effector gene repertoires reveals novel variants with altered specificities in closely related malian *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains. *Front. Microbiol.* 9, 1657.
- Eom J, Chen L, Sosso D, Julius BT, Lin I, Qu X, Braun DM, Frommer WB. 2015. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25, 53-62.

- FAO. 2017. Inventario y análisis de las pérdidas post-cosecha. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://www.fao.org/docrep/004/AC301S/ac301s04.htm>
- Faulkner C. 2018. Plasmodesmata and the symplast. *Current Biology* 28, R1365–R1381.
- Ferrante MC, Meli R, Mattace-Raso G, Esposito E, Severino L, DiCarlo G, Lucisano A. 2002. Effect of fumonisin B1 on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol. Letters* 129 (3), 181-187
- Franke J, Geary B, Meyer SE. 2014. Identification of the infection route of a *Fusarium* seed pathogen into nondormant *Bromus tectorum* seeds. *Biol. Control* 104 (12), 1306-1013.
- Galeana-Sánchez E, Sánchez-Rangel D, De la Torre-Hernández ME, Nájera-Martínez M. Ramos-Villegas P, Plasencia J. 2017. Fumonisin B1 produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize b-1,3-glucanase activity and increased aggressiveness. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100 (2017) 75e83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.07.003>
- Gutiérrez-Nájera NA, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz, M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221, 589–596.
- Gutiérrez-Nájera NA, Saucedo-García M, Noyola-Martínez L, Vázquez-Vázquez C, Palacios-Bahena S, Carmona-Salazar L, Plasencia J, El-Hafidi M, Gavilanes-Ruíz M. 2020. Sphingolipid Effects on the Plasma Membrane Produced by Addition of Fumonisin B1 to Maize Embryos. *Plants* 9, 150; doi:10.3390/plants9020150
- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Herrera-Cabrera ED, Castillo-González F, Sánchez-González J, Hernández-Casillas JM, Ortega-Pazka RA, Goodman MM. 2004. Diversidad del maíz chalqueño. *Agrociencia* 38(02), 191-206.
- Jordan J, Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. *Universidad de La Serena, Chile* 16 (1): 1-28

- Levin L, Ridao A, Castaño F. 2003. Fusariosis de la espiga de maíz. Boletín informativo, Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias.
- Lemoine R, Camera SL, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau, N, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Sci.* 4. doi: 10.3389 / fpls.2013.00272
- Lin IW, Sosso D, Chen L, Gase K, Kim S, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou B, Qu X, Carter CJ, Baldwin IT, Frommer WB. 2014. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature*, 508(7497), 546-549. Doi: 10.1038/nature13082
- López-Coria M, Sánchez-Sánchez T, Martínez-Marcelo VH, Aguilera-Alvarado GP, Flores-Barrera M, King-Díaz B, Sánchez-Nieto S. 2019. SWEET transporters for the nourishment of embryonic tissues during maize germination. *Genes (Basel)* 7;10(10). pii: E780. doi: 10.3390/genes10100780.
- Méndez-Ramírez M. 2018. Efecto del hongo *Trichoderma* sobre la expresión de los transportadores ZmSWEET en tejido aéreo. Tesis para obtener el grado de Químico en Alimentos. Facultad de Química. UNAM.
- Munkvol GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence, *Plant Disease* 81: 556-565.
- Mwalwayo D. S., Thole B. 2016. Prevalence of aflatoxin and fumonisins (B1+B2) in maize consumed in rural Malawi. *Toxicol. Rep.* 3(1), 173–179.
- Nguegwouo E, Njumbe EE, Njobeh PB, Medoua GN, Ngoko Z, Fotso M, De Saeger S, Fokou E, X. Etoa FX. 2017. Aflatoxin and fumonisin in corn production chain in Bafia, centre Cameroon: Impact of processing techniques. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5, 579-590 doi: 10.17265/2328-2150/2017.08.014
- Oerke EC. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science* 144:31-43
- Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, Huguet-Tapia JC, Pérez-Quintero A, Li T, Eom JS, Li C, Nguyen H, Liu B, Auguy F, Sciallano C, Luu V, Dossa GS, Cunnac S, Schmidt SM, Slamet-Loedin IH, Vera Cruz C, Szurek B, Frommer WB, White FF, Yang B. 2019. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat. Biotechnol* 37, 1344–1350. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0267-z>

- Palacios-Vargas I. (2016). Identificación de los transportadores SWEET de las raíces de plantas de maíz y su regulación por la infección con *Trichoderma asperellum* (Tesis de pregrado), Universidad Autónoma de México, México.
- Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29 (9), 45e-45.
- Reyes-Velázquez WP. 2001. Detección del hongo *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz y efecto de la nixtamalización sobre la producción de sus hidrolizados. Tesis de Doctorado. Universidad de Guadalajara, Zapopan. pp 3-5
- Riveros-Angarita AS. 2010. Inducción de resistencia en plantas. Interacción: planta-patógeno. Universidad del Tolima, Colombia, 66-71.
- Rutherford RS, Van antwerpen T, Conlong DE, Keeping MG, McFarlane SA, Vogel JL. 2002. Promoting plant health: Potential for the use of plant-associated microorganisms in the biological control of pathogens and pests in sugarcane. *Proceeding Congress of the South African Sugar Technologists Association* 76, 289-300.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Loaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *J. Exp. Bot.* 63 (12): 4513-4526.
- Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. 2012. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta* 235, 965-978.
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53(22), 8565-8571.
- SIAP. 2017. Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México, D. F. http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/identidad/index.jsp, acceso 5-06-2017.
- Slewinski TL, Zhang C, Turgeon R. 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport *Frontiers in Plant Sciences* 4 (244): 1-11 doi: 10.3389/fpls.2013.00244

- Sosso D, Luo D, Li Q-B, Sasse J, Yang J, Gendrot G, ... Frommer WB. 2015. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. *Nature Genetics* 47 (12), 1489–1493. doi: 10.1038 / ng.3422
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Ralfkoebnik R, Boch J, Szure B. 2012. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae*. *New Phytol.* 200, 808-819.
- Tamay de Dios L, Ibarra C. Valasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2(2), 70-78.
- Vargas WA, Crutcher FK, Kenerley CM. 2011. Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytol.* 189(3), 777-89. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03517.x.
- Xuan YH, Hu YB, Chen L-Q, Sosso D, Ducat DC, Hou BH, Frommer WB. 2013. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, E3685-E3694.
- Zhou J, Peng Z, Longj, Sosso D, Liu B, Eom J, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, white FF, Yang B. 2015. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J* 82, 632-643. DOI: 10.1111/tpj.12838

ANEXOS

Anexo 1. Productos de la amplificación mediante PCR punto final de las secuencias de los posibles transportadores SWEETs de la parte aérea plantas de maíz.

Las secuencias tomadas de MaizeGDB maize genetics and genomic database. Se muestra en blanco el par de oligonucleótidos usados en la reacción de PCR punto final y sombreada la secuencia que se amplificó.

Zm_SWEET1b

NM_001154214.1; GRMZM2G153358

Secuencia amplificada 151 pb

```
>lcl|GRMZM2G153358_T01 GRMZM2G153358_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:6:148107348:148110301:-1 gene:GRMZM2G153358
transcript:GRMZM2G153358_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"
CATCCATGTATCCATCCATCCACACACACAAACAGACAAGCATAACAACACCGTTGCCATTTAGCTGTTCTTGC
TAGGCAGTTGCGCGCTTACATTGAGCCGCGAGCTAGCTGTCTACTACGGCACAACACTATCTCCTGCGCGCGTGCT
CGATCGATCTGAAGGCCAGACCTGTGCCTGTCCAATTTTGCTTGTCTACCCACCACACCAGTAGTCGAGAA
GGTTCCATATAAGCGCAAGCAGACAGCAGCAAAAAGAGCTAAGGAGAGTCTGAGACAAGGTTTCGAACAGATGGA
GGATGTGGTGAAGTTTCGTCTTTGGAGTTTCCGGAAATGTCATCGCTCTCTTCCCTCTTCCCTTTCCCCAGTGCTT
ACGTTCTGGAGGATCATCAGGAGGAAGTCGACGGAGGATTTCTCGGGGGTGCCGTACAGCATGACACTCCTCA
ACTGCCTCTTGTGACGCTTGGTACGGGCTGCCGTTTCGTGTCCCCGAACAACATGCTGGTGTGACGATCAACGG
CGCGGGCGCGGCGATCGAGGCCGCTGTACGTGGTGTATCTTCCCTGGCGTTCGCGTCCAGCCAGCGGACGCGGCTG
CGGATGCTGGGCCTGGCGTTCGGCGGTCTCGGCGGCGTTCGCCGCCCGTGGCGCTGGCGTTCGATGCTGGCGCTGC
ACGGACAGGGCCGAAGCTCATGTGCGGCCTCGCCGCCACCGTCTGCTCCATCTGCATGTACGCCTCGCCGCT
CTCCATCATGAGGCTGGTGGTGAAGACCAAGAGCGTGGAGTACATGCCGTTCCCTGCTGCTGCTGGCCGTGTTT
CTGTGCGGCACGTCCTGGTTCGTCTACGGCCTGCTCGGCCGGGACCCCTTCGTCGCGATTTCCCAACGGGTGCG
GGAGCTTTTCTGGGCGCAGTGCAGCTGGTCTTGTACGCCATCTACCGCGACAGCAACAGCGGCGGCAAGCAGCA
GGCCGGCGACGACGTTGAGATGGCCTCCGACGCCAAGAGCAGCAAGAAGGTCGCCGACGACGTCGGCGGCAAG
GAGGACCGCCTGGTCTAGCATGGAGCTAGCCACTTTCTCTTTTCGGTTCGCGGAGCGTATGTTTCCCTCCCCCGT
GATTGTGTGTGTGTGCATGTATAACGAGAGTGGTGTGCTGTACTGTACTACCTCTGCGTGTGTGCAATAATGTAA
CTGGGTGTTTTCATCTCGCAATGGGGTGTCTCTCTCCAAGCGCGATTTGCTGGCCGTCGGAGGCCAAGGTGGAC
GATAGGGATGCCGTAGTTTTCCGGCGCCGCTATGCTAGCTGTTTACATGGTGCCGATCGGCGATCGTGAGCCA
CGGACGGAGTGCCTTCCAGGCCGCATGGCTGCTTCGCGGGCCAGCCATA
```

Zm_SWEET4a

NM_001175008.1, GRMZM2G000812

Secuencia amplificada 177pb

```
>lcl|GRMZM2G000812_T01 GRMZM2G000812_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:5:126853038:126855915:-1 gene:GRMZM2G000812
transcript:GRMZM2G000812_T01 description:"cdna|est|protein"
ATCACTCACCAAGAACCAGAGAGGAGCTTCATCAGCTCATTCAATTCTCGTTCCATCCCTCGTCTCTTGTGTC
CCGCCTCCGTTCCATAATTACCAGCGTCGTCTTACCCATATCTCCCATCGTCTTCTCCCTCGCGCCATCAGC
TTCCCCAAGCCAGCGGCGACCATGATCTCCCCGGACACCATCCGCACGGCCATCGGCGTCATCGGCAATGGAA
```

CTGCACTCGTGCTCTTCCCTCTCCCCAGTGCCTACGTTTCATCCGCATCTGGAAGAAAGGGTCGGTGGAGCAGTA
CTCGCCGATCCCCTACGTGGCGACGCTGCTGAACTGCATGATGTGGGTGCTGTACGGGCTGCCGGCGGTGCAC
CCGCACAGCATGCTGGTGATCACCATCAACGGCACCGGCATGGCGATCCAGCTGACCTACGTGGCGCTCTTCC
TCCTCTACTCGGTGGGGGCTGCGCGGCGCAAGGTGGTCTGCTGCTGGCCGCCGAGGTGGGCTTCGTGGCGC
CGTCGCCGCGCTGGTGCTCAGCCTGGCGCACACGCACGAGCGCAGGTCCATGGTGGTGGCGCATCCTCTGCGTC
CTCTTCGGCACCGGCATGTACGCCGCCCGCTCTCCGTCATGAAAATGGTGATCCAGACAAAGAGCGTGGAGT
ACATGCCCCCTGTTCCCTGTGCTGGCTTCCCTCGTGAATGGCATCTGCTGGACTGCTTACGCGCTCATCCGCTT
CGACCTCTACATTACTATCCCCAACGGGCTGGGCGTGTGTTCCGCGGTGGCGCAGCTGGTGTGTACGCCATC
TACTACAAGTCCACCCAGGAGATCATCGAGGCGCGCAAGCGCAAGGCCGACCAGATCGCCATGACCCGGGTGG
TCGTCGACGGCGCAAGACCAACAACCAAGCCGCGCGGGCCAATACTGACCGACGATCAAGTGACGATCGAC
ACCAATATGCTCAAGCAAGAAGCCAGCGGCAAATCAATTATGTGCGCGCTGGGTTTTATGTATTTTTGTGATTC
TATATGCACGCTGCTTGTCCGTCCCGCCAATGGAAAAAAGGGGGAAGAAAAAATGTCTGTCGGTATATGT
GTTCTCGCCGAATAACTCTCGCGCATAGCTAGCTGGTGGGGCTGAGTCACTGCCTTCGCTATATGTATACGTG
CAAAAATTAGAGGTGGAGGGTTGTTTTAGCTAATCCACCTTAATTCCAAGGCAGAGTGACCTTTTTTTTTTCT
CCTTCTGTTTTCGGCTAGGATTTTGTATAATTGAGCAATTTAGCGCGACTTGTATTGGTGGTGTGTCTC
AATCAAATAGTAAAATGTTTACTTTTCAATCGCATC

Zm_SWEET13a

NM_001155615.1; GRMZM2G173669

Secuencia amplificada 151 pb

```
>lcl|GRMZM2G173669_T01 GRMZM2G173669_T01 cdna:known  
chromosome:AGPv3:10:14767640:14770295:1 gene:GRMZM2G173669  
transcript:GRMZM2G173669_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"  
GCCTATATAAAGCCACCCACAGCCCTGCCTATCATTGCAAGAGTTTGAGCCAACACACACAGAGAGAGGACAA  
CTCCTCACAACTCTCCCTTCCCTCCTGTAGGGGCCAAAAGGGTTAGAGAGTAGGAGAAGTAGTTCCTAGCCC  
AACACAAGAAAAACAAGCTCGATCTCCTCATCACCTAATCCAAGCAACTGCTTTGTGTGTTGGGAAATTCTT  
GTGACCCCTGTTATATTATTATCCGTGTAGCTACTAGCTTCATTCCCCCCTTTGTACCCATCAAATGGCTGGC  
ATGCTCTCTGACAACACCCCTGGGCGTTTGGCTTTCCGCTACTAGGTAACGTCATCTCCTTCATGACCTTCCTGG  
CCCCGATACCGACGTTCTACCGCATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGGCTTCCAGTCGGTTCCCTACGTGGT  
TGCCCTGTTTACGCGCCATGCTGTGGATCTTCTACGCACTGATCAAGTCCAACGAGACCTTCTCATCACCATC  
AACGCCGCCGGCTGCGTCATCGAGACCATCTACGTGCTCATGTACTTCGTCTACGCGCCCAAGAAAGCCAAGC  
TGTTACAGGCCAAGATCATGGTCCCTCAATGGCGGCGTCTTTGGGGTCATCCTCCTGCTCACCCCTTCTCCT  
CTTCAAGGGCAGTAAGCGGTTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTCGGCTTCTCCGTCAGTGTCTTCGTGCGG  
CCACTCAGCATCATGAGACGAGTGATCCAGACGAAGAGCGTGGAGTACATGCCCTTCTCCCTCTCCCTCTCGC  
TCACCCCTCAGCGCCGTCGTCTGGTTCCCTCTACGGCCTCCTCATCAAGGACAAATACGTCGCGCTTCCAAACAT  
CCTGGGGTTTACCTTCGGCGTGGTCCAGATGGTGCTCTACGTTTGTACATGAACAAGACGCCGGTGGCGGCG  
ACTGCCGAGGGCAAGGATGCCGGCAAGCTTTCCCTCAGCTGCAGACGAGCACGTCCTCGTCAACATCGCCAAGC  
TCAGCCCAGCCCTCCCGGAGAGGAGCTCCGGGGTGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGGCGTTCCTGTGAGGAG  
CTGCGCTGCTGAAGCAACCGCGCCGGCGATGCTGCCAACAGGGACGTGGTGCAGCTTTCGTGACGCCGACAC  
AGCCCCGCCGTCCACGTGGCATAGATTCTCGATCGATCGCGTGCATGGCCCATGCATGCGCCCGCCACACGTA  
CGTAGCTTTTTATATATTCGAAGGACGACTTGGCTGCTGGTTCGTGAGCATATATATGATGGAGAAAATGATTAA  
GTAGTATATATATAAGTAATTAAGTCCATGCATGGAAGCTAGCTAATGGATGGAGGCAGAGGCCAGAACGAT  
GAAGGGGAAGCTATACATATATGTGTGTAATTAATATAGATATATGGGCTTTGTGTTTCTTTGAGCTAT  
GTATTAATTTGCATGGATATCTGTTATTTCTTTTATGTGTAACGCTTCTAATAAAAATGTAATTGAACCCAC  
ACTACTGTTGTTAGCTACCACAAGTTTCCC
```

Zm_SWEET13b

NM_001148182.1 GRMZM2G021706

Secuencia amplificada 361 pb

```
>lcl|GRMZM2G021706_T01 GRMZM2G021706_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:10:14648064:14650932:1 gene:GRMZM2G021706
transcript:GRMZM2G021706_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"
CAGAAACAACGCAGAGAACTCAGAGCTCTTCGTGCCCTCCTGCAAGCGCCAAGGAGGAAGAGAAGTGTGCGTA
CTGCGTAGTTCCATAGACCCGGACAAACCAGCGCCATCATACAACACCAGCAACTGTTGGTTTAGTTGTATAT
CTGCCTTGACGCCGATTATCTGTATCACCCCTTTTTGTGTGCGGATGGCTGGCCTATCTTTGGAACATCCTTG
GGCGTTTCGCCCTTCGGCCTCCTAGGCAACGTATCTCCTTTCATGACCTTCTTAGCCCCGATACCGACGTTCTAC
CGCATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGGTTTCCAGTCGGTTCCTACGTGGTAGCGCTGTTTCAGCGCCATGC
TGTGGATCTTCTACGCATGATCAAGTCCAACGAGACCTTCTCATCACCATCAACGCCGCCGGCTGCGTTAT
CGAGACCATCTACATCGTCATGTACTTCGTCTACGCGCCCAAGAAAGCCAAGCTGTTTCACGGCCAAGATCATG
GCCCTCCTCAATGGCGGCGTCTTTGGGGTCATCCTCCTGCTCACCCCTTCTCCTCTTCAAGGGTAGTAAGCGCG
TTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTCGGCTTCTCCGTCAGTGTCTTCGTGCGGCCACTAAGCATCATGAGGCG
CGTGATCCAGACGAAGAGCGTAGAGTACATGCCCTTCTCCCTCTCCCTCTCGCTCACCCCTCAGCGCCGTCGTC
TGGTTCTCTACGGCCTCCTCATCAAGGACAAATACGTCGCGCTACCAACGTCCTTGGGTTTCATCTTCGGCG
TGGTCCAGATGGTGTCTACGTGTTCTACATGAACAAGACGCCGGTGGCGGCTGCCGTGGGCAAGGATGCCGG
CAAGCTTCCCTCAGCTGCAGACGAGCACGTCTTCGTCAACATTGCCAAGCTCAACCCCCGCCCTCCCGGAGAGG
ACCTCCGGGATGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGCCGTTTCTGCCAGGAGCTGCGCTGCTGAAGCAATCGCGC
CGGCGATGCTGCCCAACAGGGACGTGGTTCGACGTCTTCGTGACCCGACACAGCCCCGCTGTCCACGTGGTCTA
GCTTCTCCATCATCGCAAGCAAGCATGAATCGAGTCGAGTCCGAACGCATAATTAAGCACCCAATCTATTGGA
TATATAAATACGCGCGCCCCAACATGTGCGCCATATAGCCGTTTATTCCAACCCCTTAGCTTTGTTTAAATTCTC
AAATATGCATTTGAAGTAATGTACTTTCATGCAACCAGGAATTTTCATTTTCCCCTCCAAAATAACCATAAGAA
TTTTCTATAGCACGTT
```

Zm_SWEET15a

NM_001155556.1; GRMZM2G168365

Secuencia amplificada 107 pb

```
>lcl|GRMZM2G168365_T01 GRMZM2G168365_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:4:96336663:96338564:1 gene:GRMZM2G168365
transcript:GRMZM2G168365_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"
AAGAGCCCCAAGAAGGCAGCTAGCTGAGAGCCTCCAGCTCAGGTAGTGAGCGAGCTCCTCTCTGC CCTTGGCCT
CTTCTTCGTTCAATTCTTGTCCACTCGAGGACTGCCCGTTTTCGACTGCTCGATCAGTGTGCTAGCTAGCTAG
AGCAAGAGAAGGGCTGTAAGCGAGGAGATCGATCGAGATGGCTTTTCTCAACATGGAGCAGCAGACCTGGGCC
TTCACCTTTGGTATCCTAGGTAACATAGTCTCACTGATGGTGTTCCTTTCACCGCTGCCGACGTTCTACCGCG
TGTACCGCAACAAGTCGACGGAGGGGTTCCAGTCGACGCCGTACGTGGTGACGCTCTTCAGCTGCATGCTGTG
GATCTTGTACGCCCTGCTCAAGCCCGGCGCCGAGCTGCTGGTCAACATCAACGGCGTGGGCTGCGTCGTCGAG
ACCGTGTACCTGGCCATGTACCTGGTGTACGCGCCCAAGGCCCGCCGGGTGCTGGCGGCCAAGATGCTGCTGG
GGCTCAACGTCGCCGCTTTCGGCCTCGTTCGCGCTCGTCAACATGCTTCTCTCCGACGCCGGCCTCCCGCTGCA
CGTGCTCGGCTGGATCTGCGTCAGCGTCTCGCTCAGCGTCTTCGCCGCGCCGCTCAGCATAATGCGGCAGGTG
ATCCGGACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCTATCTCGCTCTCCTTCTTCTCGGTGCTCAGCGCGGTGGTCTGGT
TCGCGTACGGCGCGCTGAAGAAGGACGTGTTTCGTGGCGTTCGCCAACGTGCTGGGCTTCGTCTTCGGCCTCGC
GCAGATGGCGCTGTACATGGCGTACAGGAAGCCCGCGGGCGGCGCTGGTGATAATACCGGAGCAGTCCAAGGAG
GAGGTGGCCGAGGGCAAGGCAAGCTGCGGCGGCCGCGGAGGTCACCCCATCGACATCGCGGAGGTCCACGACC
TGCAGACCGTGGTTCGTCGACGTAGACGTGGAGCTGTCACTACCTACCGCTGCGTCCGGTATGGTTCGACGGCAG
TGTCCGAAGGCCATAGGGCGCCGAGGAGCTGGTGTATCAAGCCCGACATGGTCAACCGTCACTTTCGCGGAGGCG
TAGGTTGGTTAAGTAGTAGCAGAGTGAAGTCGATATCGATCTGCCTACCTACAGTACAGCCGCGGCGCCAGAT
GTACTGGCAGCGTTCATGCAGGCTCGTTGACTTGACCGGTCGAGATGGTTGGAGTAGCCGGGCGGAGTAGCC
AGACGTAAGTGGCCTGTGTCATGAACCGGCAAGCTGATAACCGGAGCGAGAGGGACGTTGGTTCATCACATTCA
GAAGACGGCAAGCTGATAGTTTCTGTCTCTAGGTCTCTCTGTGTGTGTGTGTGTAATCGACTCCATCAGCT
```

TGCCGCCTTTCTGTCTATTCTGATTGTTTTTCATCCATTGATGCCGTCGTCGCAGTAATAAACTTGAACGA
ACGATTCCACACTA

Zm_SWEET17

DAA54392.1; GRMZM2G106462

Secuencia amplificada 202 pb

```
>lcl|GRMZM2G106462_T01 GRMZM2G106462_T01 cdna:known  
chromosome:AGPv3:3:56813678:56821576:1 gene:GRMZM2G106462  
transcript:GRMZM2G106462_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"  
GTCGGCCTCAGGCTGCTTGAATATGCATTTTCAGCGGTCCCTGGTGTCTCTCTCCCGCTCAAGGGCAGTAGA  
GACAGCAGCTGAGCTGACTGGATCTCGATCTACCGCTTTGCTTCCGTTTTGAGCCGCCAGCTGTGTGGCCTCC  
TGTCTGTCTGCCTATCTTGAACCTCCATGGATTCCACACTCTTCATCATCGGCGTCATAGGCAACATCATCTC  
AGTTCTGGTCTTCATTTCTCCCATCAAGACGTTCTGGAGGATCGTGCGGAGCGGGTTCGACGGAGGAGTTCGAG  
CCGGCGCCGTACGTGTTACGCTGCTCAACGCGCTGCTGTGGCTCTACTACGGCGCCACCAAGCCTGACGGGC  
TCCTCGTTGCCACCGTCAATGGCTTTGGGGCTGCCATGGAGGCCATCTACGTCGTCCTCTTCATCGTCTACGC  
CGCCAATCATGCCACAAGGGTTAAGACGGCGAAGCTGGCAGCAGCGTTGGACATCGGTGGCTTTGGAGTAGTG  
TTTGTGGCCACCACGTTCCGCATTAACGAATTAACATGAGAATCATGGTGATAGGGATGATATGTGCCTGCC  
TCAACGTACTCATGTACGGGTCACCCCTTGCTGCCATGAAAACGGTGATCACCACCAAGAGCGTGGAGTTCAT  
GCCGTTCTTCCTATCCCTTCTTCCCTTCTTCCCTCAACGGAGGCATCTGGGCAACGTACGCGGTGCTTGACCGAGAC  
ATCTTCCCTTGGGATCCCCAATGGGATAGGCTTCATCCTCGGCACCATCCAGCTGATCATCTACGCGATCTACA  
TGAACAGCAAGGTCTCCCAAAGCAGCAAAGAAATAGCGTCGCCTCTTCTAGCCTCTAGCCAGGAAGAAGCAGC  
TAGCCATGTCTGATGATGTTTCGTCAGTGTGCTGGAGTTTTGTAGCAGTCCAAGCCAACGGTGAACACCTACCA  
ATGCAAGAGATTATCGATTTTCATTTTTAAGGAATGTAAAGTCTATATTTTTTATGAATATATATTTTTATAT  
ATACCTTGAAATGCTCACGTCGATTTTGTACGTTTTAGTGCCTCTTTTGGTACAACCTTCATTAATAAAGCA  
AATCTGGGCAAATCTGGATTGAAATTTA
```

Anexo 2. Fragmento de las secuencias de los posibles transportadores SWEET de la parte aérea de plantas de maíz amplificada por qPCR.

Secuencias tomadas de MaizeGDB maize genetics and genomic database. Se muestra en el par de oligonucleótidos usados en la reacción de RT-PCR tiempo real y sombreada la secuencia que se amplificó.

Zm_SWEET1b

NM_001154214.1; GRMZM2G153358

Secuencia amplificada 144 pb

```
>lcl|GRMZM2G153358_T01 GRMZM2G153358_T01 cdna:known  
chromosome:AGPv3:6:148107348:148110301:-1 gene:GRMZM2G153358  
transcript:GRMZM2G153358_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"  
CATCCATGTATCCATCCATCCACACACACAAACAGACAAGCATAACAACACCGTTGCCATTTAGCTGTTCTTGC  
TAGGCAGTTGCGCGCTTACATTGAGCCGCAGCTAGCTGTCTACTACGGCACAACCTATCTCCTGCGCGCGTGTCT  
CGATCGATCTGAAGGCCAGACCTGTGCCTGTCCAATTTGCCTTGTCTACCCACCACACCAGTAGTTCGAGAA  
CGTTCCATATAAGCGCAAGCAGACAGCAGCAAAAGAGCTAAGGAGAGTCTGAGACAAGGTTGCAACAGATGGA
```

CGATGTGGTGAAGTTTCGTCTTTGGAGTTTCCGGAAATGTCAATCGCTCTCTTCCTCTTCCTTTCCCCAGTGCCT
ACGTTCTGGAGGATCATCAGGAGGAAGTCGACGGAGGATTTCTCGGGGGTGCCTGACAGCATGACACTCCTCA
ACTGCCTCTTGTTCAGCTTGGTACGGGCTGCCGTTTCGTGTCCCCGAACAACATGCTGGTGTGACGATCAACGG
CGCGGGCGCGGGATCGAGGCCGTGTACGTGGTGTATCTTCCCTGGCGTTTCGCGTCCAGCCAGCGGACGCGGCTG
CGGATGCTGGGCCTGGCGTTCGGCGGCTTCGCGCGGCTTCGCGCCCGTGGCGCTGGCGTTCGATGCTGGCGCTGC
ACGGACAGGGCCGGAAGCTCATGTGCGGCCTCGCCGCCACCGTCTGCTCCATCTGCATGTACGCCTCGCCGCT
CTCCATCATGAGGCTGGTGGTGAAGACCAAGAGCGTGGAGTACATGCCGTTTCCTGCTGTGCTGGCCGTGTTT
CTGTGCGGCACGTCTTGGTTCGTCTACGGCCTGCTCGGCCGGGACCCCTTCGTTCGCGATTCCCAACGGGTGCG
GGAGCTTTCTGGGCGCAGTGCAGCTGGTCTTGTACGCCATCTACCCGACAGCAACAGCGGCGGCAAGCAGCA
GGCCGGGACGACGTGGAGATGGCCTCCGACGCCAAGAGCAGCAAGAAGGTTCGCCGACGACGTTCGGCGGCAAG
GAGGACCGCCTGGTCTAGCATGGAGCTAGCCACTTCTCTTTTCGGTTCGCGGAGCGTATGTTTCTCCCCCGT
GATTGTGTGTGTGTGCATGTATACGAGAGTGCCTGCTGTACTGTACTACCTCTGCGTGTGTGCAATAATGTAA
CTGGGTGTTTTCATCTCGCAATGGGGTGTCTCTCTCCAAGCGCGATTTGCTGGCCGTCGGAGGCCAAGGTGGAC
GATAGGGATGCCGTAGTTTTTCCGGCGCCGCTATGCTAGCTGTTTACATGGTGCCGATCGGCGATCGTGAGCCA
CGGACGGAGTGCCTTCCAGGCCGCATGGCTGCTTCGCGGGCCAGCCATA

Zm_SWEET4a

NM_001175008.1, GRMZM2G000812

Secuencia amplificada 177pb

>lcl|GRMZM2G000812_T01 GRMZM2G000812_T01 cdna:known

chromosome:AGPv3:5:126853038:126855915:-1 gene:GRMZM2G000812

transcript:GRMZM2G000812_T01 description:"cdna|est|protein"

ATCACTACCAAGAACCAGAGAGGAGCTTCATCAGCTCATTCAATTCTCGTTCCATCCCTCGTCTCTTGTGTC
CCGCCTCCGTTCCATAATTACAGCGTTCGTCTACCCATATCTCCCATCGTCTTCTCCCTCGCGCCATCAGC
TTCCTCCAGCCAGCGGGCAGCCATGATCTCCCGGACACCATCCGACGGCCATCGGGGTTCATCGGCAATGGAA
CTGCACTCGTGTCTTCTCTCTCGCCAGTGCCTACGTTTCATCCGCATCTGGAAAGAAAGGGTTCGGTGGAGCAGTA
CTCCCGGATCCCGTACCTGGCGACGCTGCTGAATGCATGATGTGGGTGCTGTACGGGCTGCCGGCGGTGCAC
CCGCACAGCATGCTGGTGTATCACCATCAACGGCACCGGCATGGCGATCCAGCTGACCTACGTGGCGCTCTTCC
TCCTCTACTCGGTGGGGGCTGCGCGGCGCAAGGTGGTTCCTGCTGCTGGCCGCCGAGGTGGGCTTCGTTCGGCGC
CGTTCGCCGCGCTGGTGTCTCAGCCTGGCGCACACGCACGAGCGCAGGTCCATGGTGGTTCGGCATCCTCTGCGTC
CTCTTCGGCACCGGCATGTACGCCGCCCGCTCTCCGTCATGAAAATGGTGTATCCAGACAAAAGAGCGTGGAGT
ACATGCCCTGTTTCCTGTGCTGGCTTCCCTCGTGAATGGCATCTGCTGGACTGCTTACGCGCTCATCCGCTT
CGACCTCTACATTACTATCCCCAACGGGCTGGGCGTGTGTTTCGCGGTGGCGCAGCTGGTGTGTACGCCATC
TACTACAAGTCCACCCAGGAGATCATCGAGGCGCGCAAGCGCAAGGCCGACCAGATCGCCATGACCGGGGTGG
TCGTTCGACGGCGCAAGACCAACAACCAAGCCGGCGCGGGCCAATACTGACCGACGATCAAGTGACGATCGAC
ACCAATATGCTCAAGCAAGAAGCCAGCGGCAAATCAATTATGTGCGCGCTGGGTTTTATGTATTTTGTGATTC
TATATGCACGCTGCTTGTCCGTCCCGGCAATGGAAAAAAGGGGGAAAGAAAAAATGTCTGTGCGGTATATGT
GTTCTCGCCGAATAACTCTCGCGCATAGCTAGCTGGTGGGGCTGAGTCACTGCCTTCGCTATATGTATACGTG
CAAAAATTAGAGGTGGAGGGTGTGTTTTAGCTAATCCACCTTAATTCCAAGGCAGAGTGACCTTTTTTTTTTCT
CCTTCTGTTTTCGGCTAGGATTTTGTATAATTGAGCAATTTAGCGCGACTTGTATTGGTGTGGTGTGTCTC
AATCAAATAGTAAAATGTTTCAATTTACTCTTTCAATCGCATC

Zm_SWEET13a

NM_001155615.1; GRMZM2G173669

Secuencia amplificada 151 pb

>lcl|GRMZM2G173669_T01 GRMZM2G173669_T01 cdna:known

chromosome:AGPv3:10:14767640:14770295:1 gene:GRMZM2G173669

transcript:GRMZM2G173669_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"

GCCTATATAAAGCCACCCACAGCCCTGCCTATCATTGCAAGAGTTTGGCCAAACACACACAGAGAGAGGACAA
CTCCTCACAACTCTCCCTTCCCTCCTGTAGGGGCCAAAAGGGTTAGAGAGTAGGAGAAGTAGTTCCCTAGCCC
AACACAAGAAAAACAAGCTCGATCTCCTCATCACCTAATCCAAGCAACTGCTTTGTGTGTTGGGAAATTTCTT
GTGACCCCTGTTATATTATTATCCGTGTAGCTACTAGCTTCATTTCCCCCTTTGTACCCATCAAATGGCTGGC

ATGTCTCTGCAACACCCCTGGGCGTTTGCTTTTCGGTCTACTAGGTAACGTCATCTCCTTCATGACCTTCCTGG
CCCCGATACCGACGTTCTACCGCATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGGCTTCCAGTCGGTTCCTACGTGGT
TGCCCTGTTTCAGCGCCATGCTGTGGATCTTCTACGCACTGATCAAGTCCAACGAGACCTTCTCATCACCATC
AACGCCGCCGGCTGCGTCATCGAGACCATCTACGTGCTCATGTACTTCGTCTACGCGCCCAAGAAAGCCAAGC
TGTTACAGGCCAAGATCATGGTCTCTCAATGGCGGGCTTTTGGGGTCATCCTCCTGCTCACCTTCTCTCT
CTTCAAGGGCAGTAAGCGGTTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTCGGCTTCTCCGTCAAGTGTCTTCGTGCGG
CCACTCAGCATCATGAGACGAGTGATCCAGACGAAGAGCGTGGAGTACATGCCCTTCTCTCTCCCTCTCGC
TCAACCTCAGCGCCGCTGCTGCTGGTTCCTCTACGGCTCCTCATCAAGGACAAATAGGTGCGGCTTCCAAACAT
CTGGGGTTACCTTCGGCGTGGTCCAGATGGTGTCTACGTGTTGTACATGAACAAGACGCCGGTGGCGGG
ACTGCCGAGGGCAAGGATGCCGGCAAGCTTTCCTCAGCTGCAGACGAGCAGCTCCTCGTCAACATCGCCAAGC
TCAGCCCAGCCCTCCCGGAGAGGAGCTCCGGGGTGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGGCGTTCTGTGAGGAG
CTGCGCTGCTGAAGCAACCGCGCCGGCGATGCTGCCAACAGGGACGTGGTCGACGTCTTCGTGAGCCGACAC
AGCCCCGCCGTCCACGTGGCATAGATTCTCGATCGATCGCGTGCATGGCCCATGCATGCGCCCGCCACACGTA
CGTAGCTTTTATATATTCGAAGGACGACTTGCTGCTGGTTCGTGAGCATATATATGATGGAGAAAATGATTAA
GTAGTATATATATAAGTAATTAAGTCCATGCATGGAAGCTAGCTAATGGATGGAGGCAGAGGCCAGAACGAT
GAAGGGGAAGCTATACATATATGTGTGTAATTAATATAGATATATGGGCTTTGTGTTTCATCTTTGAGCTAT
GTATTAATTTGCATGGATATCTGTTATTCCTTTTTATGTGTAACGTCTTCTAATAAAAATGTAATTGAACCCAC
ACTACTGTTGTTAGCTACCACAAGTTTCCC

Zm_SWEET13b

NM_001148182.1 GRMZM2G021706

Secuencia amplificada 235pb

>lcl|GRMZM2G021706_T01 GRMZM2G021706_T01 cdna:known

chromosome:AGPv3:10:14648064:14650932:1 gene:GRMZM2G021706

transcript:GRMZM2G021706_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"

CAGAAACAACGCAGAGAAGTCTCGTGCCTCCTGCAAGCGCCAAGGAGGAAGAGAAGTGTGCGTA
CTGCGTAGTTCCATAGACCCGGACAAACCAGCGCCATCATAACAACAGCAACTGTTGGTTTGGTATATAT
CTGCCTTGAGCCGATTATCTGTATCACCTTTTTGTGTCGCGATGGCTGGCCTATCTTTGGAACATCCTTG
GGCGTTGCGCTTCGGCCTCCTAGGCAACGTATCTCCTTCATGACCTTCCTAGCCCCGATACGACGTTCTAC
GCATCTACAAGAGCAAGTCGACGGAAGGTTTCCAGTCGGTTCCTACGTGGTAGCGCTGTTTCAGCGCCATGC
TGTGGATCTTCTACGCACTGATCAAGTCCAACGAGACCTTCTCATCACCATCAACGCCGCGGGCTGCGTTAT
CGAGACCATCTACATCGTTCATGTACTTCGTCTACGGCGCCAAGAAAGCCAAGCTGTTTCACGCCAAGATCATG
GCCCTCCTCAATGGCGGGCTCTTTGGGGTCATCCTCCTGCTCACCTTCTCCTCTTCAAGGGTAGTAAGCGCG
TTGTGCTGCTTGGCTGGATCTGCGTCGGCTTCTCCGTCAAGTGTCTTCGTGCGGCCACTAAGCATCATGAGGCG

CGTGATCCAGACGAAGAGCGTAGAGTACATGCCCTTCTCCCTCTCCCTCTCGCTCACCTCAGCGCCGTGCTC
TGGTTCCTCTACGGCTCCTCATCAAGGACAAATACGTGCGCTACCAAACGTCCTTGGGTTTCATCTTCGGCG
TGGTCCAGATGGTGTCTACGTGTTCTACATGAACAAGACGCCGGTGGCGGCTGCCGTGGGCAAGGATGCCGG
CAAGCTTCCCTCAGCTGCAGACGAGCAGCTCCTCGTCAACATTGCCAAGCTCAACCCCGCCCTCCCGGAGAGG
ACCTCCGGGATGCACCCAGTCACCCAGATGGCGGGCGTTCCTGCCAGGAGCTGCGCTGCTGAAGCAATCGCGC
CGGCGATGCTGCCAACAGGGACGTGGTTCGACGTCTTCGTGAGCCGACACAGCCCCGCTGTCCACGTGGTCTA
GCTTCTCCATCATCGCAAGCAAGCATGAATCGAGTCGAGTCCGAACGCATAATTAAGCACCCAATCTATTGGA
TATATAAATACGCGGCCCAACATGTGCGCCATATAGCCGTTTATTCCAACCCCTTAGCTTTGTTAATTCTC
AAATATGCATTTGAAGTAATGTACTTTCATGCAACCAGGAATTTTCATTTTCCCCTCCAAAATAACCATAAGAA
TTTTCTATAGCACGTT

Zm_SWEET15a

NM_001155556.1; GRMZM2G168365

Secuencia amplificada 107 pb

```
>lcl|GRMZM2G168365_T01 GRMZM2G168365_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:4:96336663:96338564:1 gene:GRMZM2G168365
transcript:GRMZM2G168365_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"
AAGAGCCCAAGAAGGCAGCTAGCTGAGAGCCTCCAGCTCAGGTAGTGAGCGAGCTCCTCTCTGCCCCTGGCCT
CTTCTTCGTTTTTCTTTGTCCACTCGAGGACTGCCCGTTTGACGACTGCTCGATCAGTGTGCTAGCTAGCTAG
AGCAAGAGAAGGGCTGTAAGCGAGGAGATCGATCGAGATGGCTTTTCTCAACATGGAGCAGCAGACCTGGGCC
TTCACCTTTGGTATCCTAGGTAACATAGTCTCACTGATGGTGTTCCTTTACCCGCTGCCGACGTTCTACCGCG
TGTACCGCAACAAGTCGACGGAGGGGTTCCAGTCGACGCCGTACGTGGTGACGCTCTTCAGCTGCATGCTGTG
GATCTTTGTACGCCCTGCTCAAGCCCAGCCGAGCTGCTGGTACCATCAACGGCGTGGGCTGCGTTCGTCGAG
ACCGTGTACCTGGCCATGTACCTGGTGTACGCGCCCAAGGCCCGCCGGTGTGGCGGCCAAGATGCTGCTGG
GGCTCAACGTCGCCGCTCTTCGGCCTCGTTCGCGCTCGTACCATGCTTCTCTCCGACGCCGGCCTCCGCGTGCA
CGTGCTCGGCTGGATCTGCGTCAGCGTCTCGCTCAGCGTCTTCGCCGCGCCGCTCAGCATAATGCGGCAGGTG
ATCCGGACCAAGAGCGTGGAGTTCATGCCTATCTCGCTCTCCTTCTTCTTCTGGTGCTCAGCGCGGTGGTCTGGT
TCGCGTACGGCGCGCTGAAGAAGGACGTGTTTCGTGGCGTTCACCAACGTGCTGGGCTTCGTCTTCGGCCTCGC
GCAGATGGCGCTGTACATGGCGTACAGGAAGCCCAGCCGCGCGCTGGTGATAATACCGGAGCAGTCCAAGGAG
GAGGTGGCCGAGGGCAAGGCAAGCTGCGGCGCGCCGAGGTGCACCCCATCGACATCGCGGAGGTCCACGACC
TGCAGACCGTGGTTCGTCGACGTAGACGTGGAGCCTGTCACCTACGCCGCTGCGTCCGGTATGGTTCGACGGCAG
TGTCGGAAGGCCTAGGGCGCCGGAGGAGCTGGTGTCAAGCCCAGCATGGTACCAGTTCATTGCGGCGGAGGGCG
TAGGTTGGTTAAGTAGTAGCAGAGTGAGTCGATATCGATCTGCCTACCTACAGTACAGCCGCGGCGCCAGAT
GTACTGGCAGCGTTCATGCAGGCTCGTTGACTTGACCGGTTCGAGATGGTTGGAGTAGCCGGGCGGAGTAGCCC
AGACGTACTGGCCTGTGTGCATGAACCGGCAAGCTGATAACCGGAGCGAGAGGGACGTTGGTTCATCACATTCA
GAAGACGGCAAGCTGATAGTTTCTGTCTCTAGGTCTCTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAATCGACTCCATCAGCT
TGCCGCCTTTCTGTCTATTCTGATTGTTTTTCATCCATTGATGCCGTCGTTCGAGTAATAAACTTGAACGA
ACGATTCCACACTA
```

Zm_SWEET17

DAA54392.1; GRMZM2G106462

Secuencia amplificada 227 pb

```
>lcl|GRMZM2G106462_T01 GRMZM2G106462_T01 cdna:known
chromosome:AGPv3:3:56813678:56821576:1 gene:GRMZM2G106462
transcript:GRMZM2G106462_T01 description:"cdna|est|omrna|protein"
GTCGGCCTCAGGCTGCTTGAAATATGCATTTTACGCGGTCCCTGGTGTCTCTCTCCCGCTCAAGGGCAGTAGA
GACAGCAGCTGAGCTGACTGGATCTCGATCTACCGCTTTGCTTCCGTTTTGAGCCGCCAGCTGTGTGGCCTCC
TGTCTGTCTGCCTATCTTGAACCTCCATGGATTCCACACTCTTCATCATCGGCGTCATAGGCAACATCATCTC
AGTTCTGGTCTTCATTTCTCCCATCAAGACGTTCTGGAGGATCGTTCGCGGAGCGGGTTCGACGGAGGAGTTCGAG
CCGGCGCCGTACGTGTTACGCTGCTCAACGCGCTGCTGTGGCTCTACTACGGCGCCACCAAGCCTGACGGGC
TCCTCGTTGCCACCGTCAATGGCTTTGGGGCTGCCATGGAGGCCATCTACGTCGTCCTCTTCATCGTCTACGC
CGCCAATCATGCCACAAGGGTTAAGACGTCGAAGCTGGCAGCAGCGTTGGACATCGGTGGCTTTGGAGTAGTG
TTTGTGGCCACCACGTTCCGCCATTAACGAATTAACATGAGAATCATGGTGTATAGGGATGATATGTGCCTGCC
TCAACGTAATCATGTACGGGTCAACCCCTTGCTGCCATGAAAACGGTGTACACCACCAAGAGCGTGGAGTTCAT
GCCGTTCTTCCTATCCTTCTTCTCTTTCCTCAACGGAGGCATCTGGGCAACGTACGCGGTGCTTGACCGAGAC
ATCTTCTTGGGATCCCCAATGGGATAGGCTTCATCCTCGGCACCATCCAGCTGATCATCTACGCGATCTACA
TGAACAGCAAGGTCTCCCAAAGCAGCAAAGAAATAGCGTCGCCTCTTCTAGCCTCTAGCCAGGAAGAAGCAGC
TAGCCATGTCTGATGATGTTTCGTACGTGTGCTGGAGTTTTGTAGCAGTCCAAGCCAACGGTGAACACCTACCA
ATGCAAGAGATTATCGATTTTCATTTTAAAGGAATGTAAAGTCTATATTTTTTATGAATATATATTTTTATAT
ATACCTTGAAATGCTCACGTCGATTTTGTACGTTTTAGTGCCTCTTTTGGTACAACCTTCATTAATAAAGCA
AATCTGGGCAAATCTGGATTGAAATTTA
```

Anexo 3. Estandarización de la técnica de PRC en tiempo real utilizando SyBr Green para la detección de los niveles de transcrito relacionados con la defensa del maíz

Se demostró la ESPECIFICIDAD del método al detectar que los oligonucleótidos empleados para cada gen no formaran dímeros a temperaturas de fusión menores a 80 °C, ni tampoco productos inespecíficos a diferentes temperaturas. El observar un único pico a la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción, demostraba que era específico para dicho gen.

De igual forma se muestra la EFICIENCIA, REPRODUCIBILIDAD Y SENSIBILIDAD del método, para ello se ajustó la línea base, el Threshold (umbral de detección de fluorescencia) para cada gen. Debido a que la presencia de contaminantes o un error experimental como mal pipeteo pueden producir resultados que desvíen la curva de amplificación típica y por consiguiente generar un Threshold incorrecto. Asimismo, se validó el ensayo mediante una curva estándar a partir de muestras de cDNA diluidas serialmente en órdenes de 2, la cual se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada apareciera la curva típica de amplificación.

Para determinar la eficiencia de amplificación se construyó una curva patrón de Ct, número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el threshold fijado, vs. Log concentración (cDNA diluidas serialmente), donde la pendiente debe ser igual o mayor a -3.32 lo cual correspondería al 100 %. Por lo que se utilizó la siguiente fórmula para calcular el % de eficiencia de amplificación a partir de la pendiente dada:

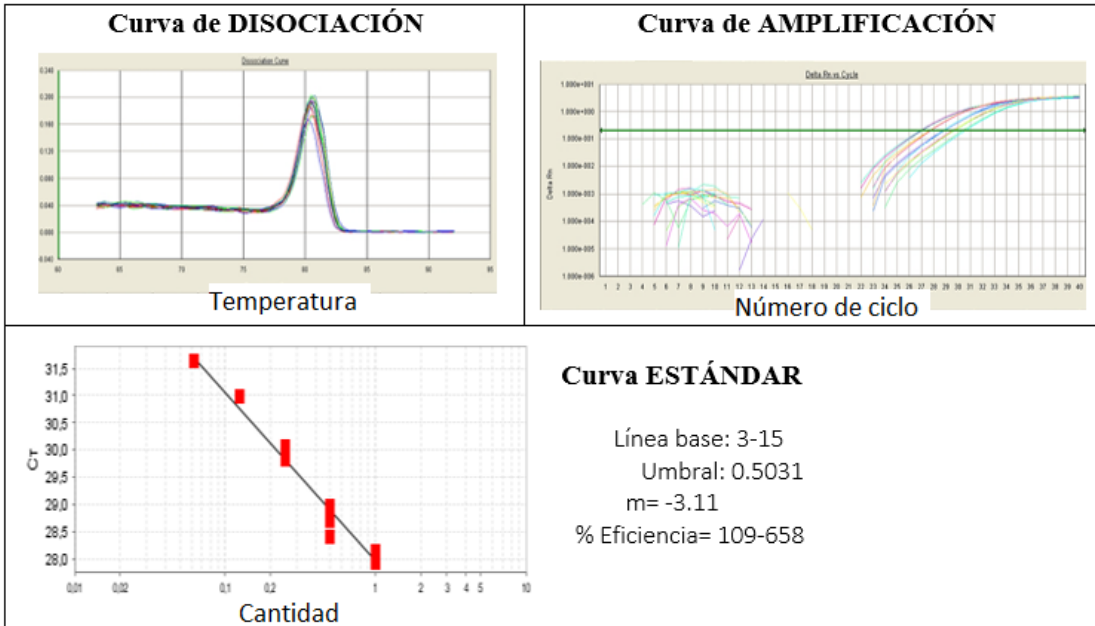
$$\%E = [(10^{-1/m}) - 1] \times 100$$

donde:

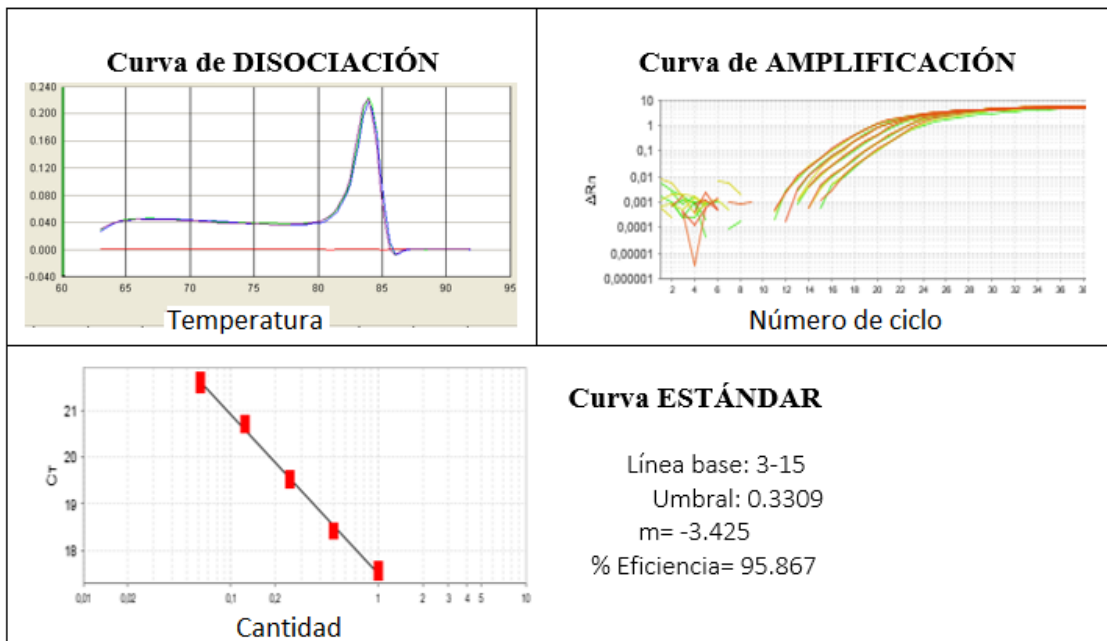
m= a la pendiente de la curva Ct vs Log Concentración

Considerándose como aceptable una eficiencia mayor del 92 % - 120 %

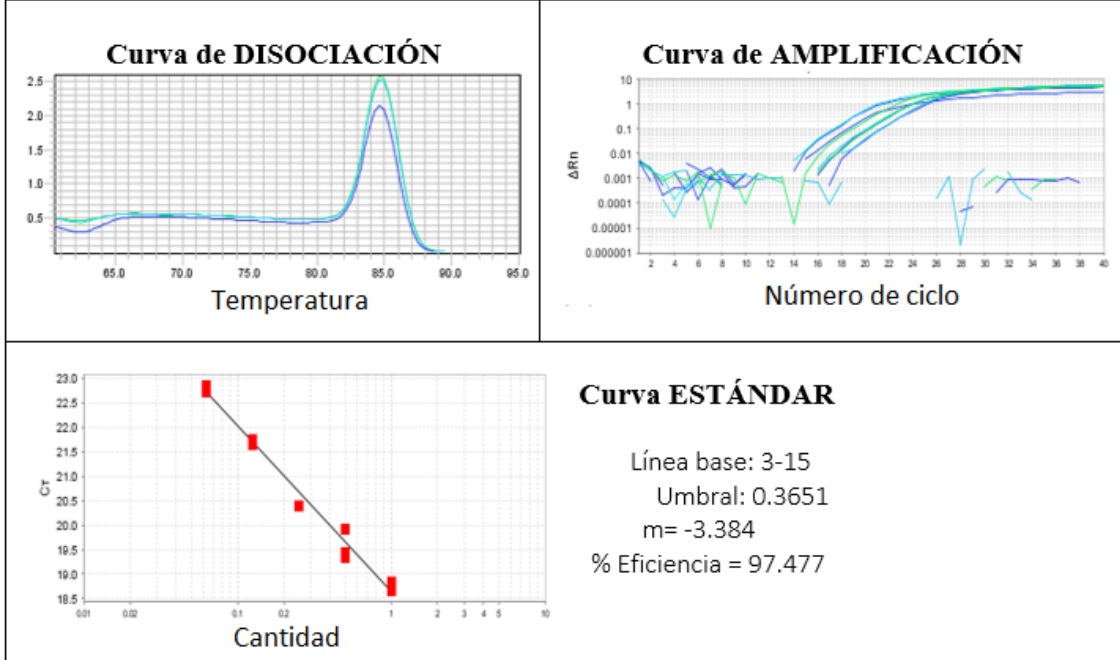
SWEET 4a



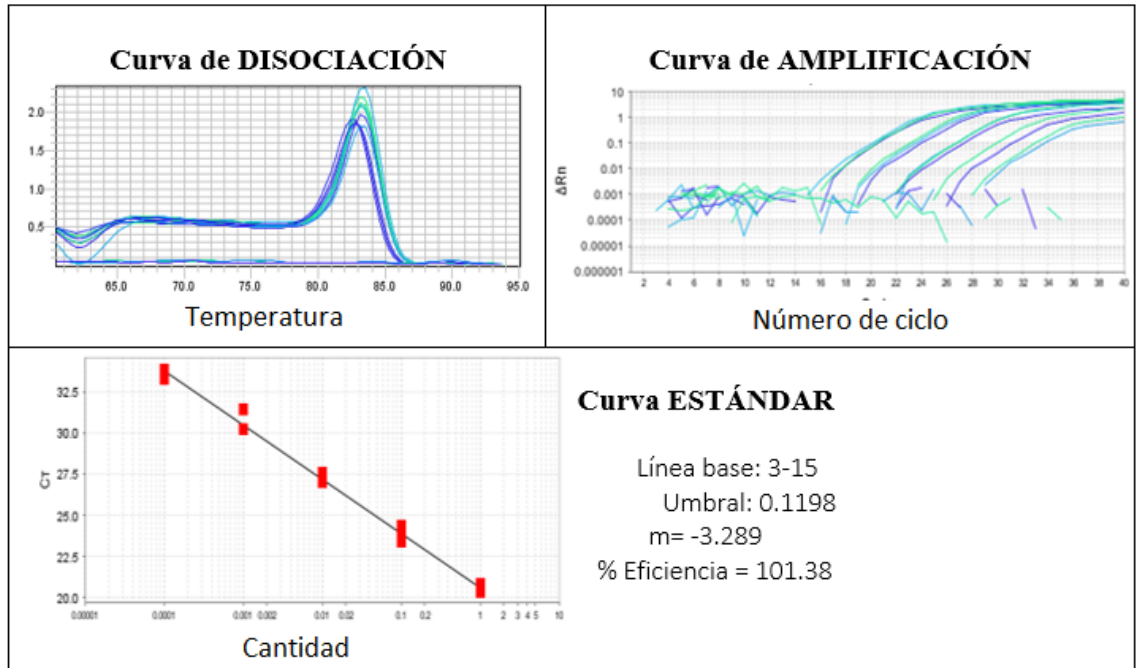
SWEET 13a



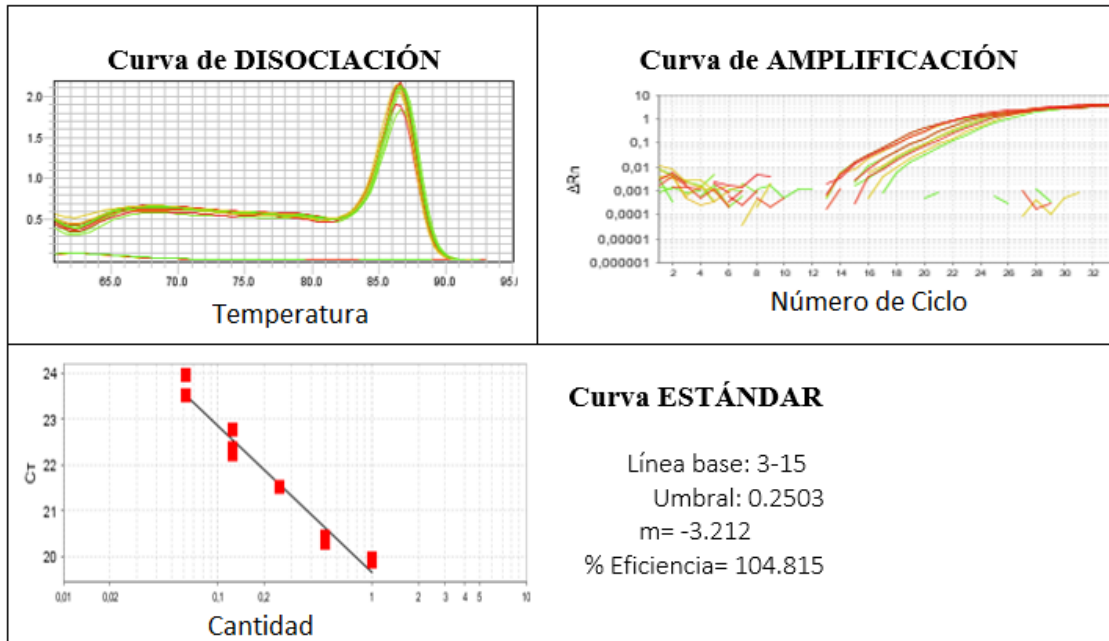
SWEET 13b



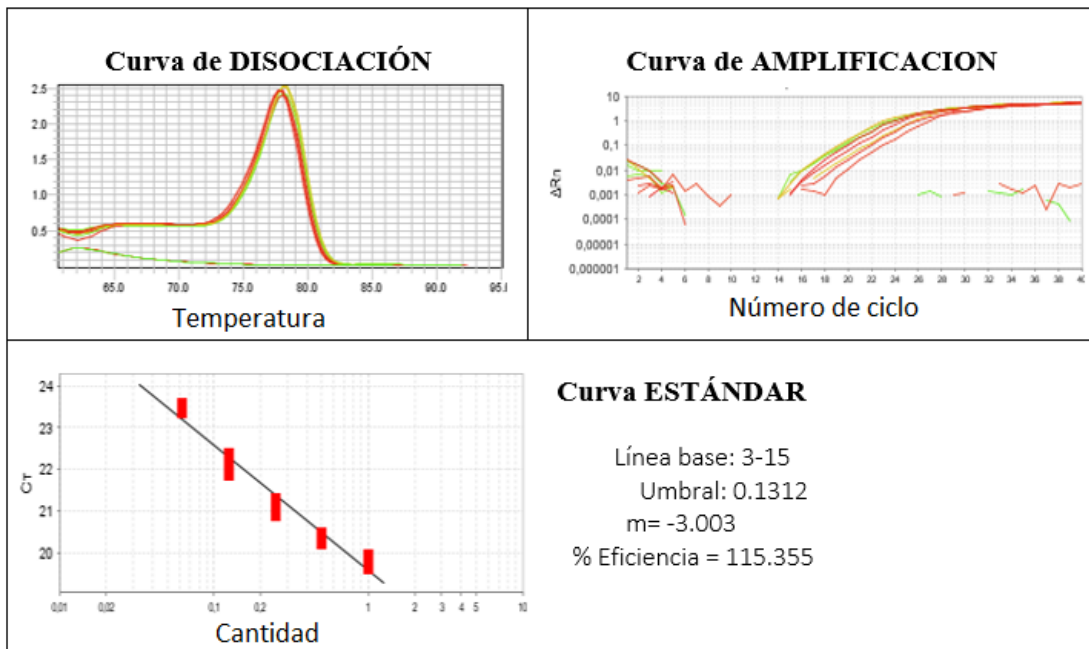
SWEET 17



PAL



AOS



18s Gen de referencia

