



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

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

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ROBERTO DASSAEVT CARVENTE GARCÍA

Tutora:
DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA

Comité Tutorial:

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
FACULTAD DE QUÍMICA

DR. SALVADOR URIBE CARVAJAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Octubre, 2014



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.

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*

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por la DGAPA a través de los proyectos PAPIIT IN220511 e IN217214. También se recibió apoyo de la Facultad de Química de la UNAM a través del PAIP 5000-9125. Durante los estudios de Maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis. Así mismo, se recibió apoyo del Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir a la XVIII Reunión de la rama de Bioenergética y Biomembranas.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Antonio Peña Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
VOCAL	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
VOCAL	Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
SECRETARIO	Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

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

Recibió financiamiento a través de:

- DGAPA-PAPIIT proyectos PAPIIT IN220511 e IN217214.
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.
- Beca para la realización de tesis de maestría otorgada por CONACYT
- Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP)

Así mismo, se agradece al Dr. Javier Plasencia de la Parra por proporcionarnos la cepa de *Fusarium verticillioides* y al Dr. José Luis Hernández Mendoza por facilitarnos la cepa de *Trichoderma asperellum*, ambas cepas se emplearon en este proyecto.

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

Se agradece a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro y a la Dra. Tamara Luti Rosenbaum por la asesoría y transfección del transportador SWEET en células HEK293.

De manera especial agradezco a los miembros de mi comité tutorial por sus valiosas aportaciones y críticas al presente proyecto: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Salvador Uribe Carvajal y Dr. Mario Rocha Sosa[†]. Así como al jurado de examen por sus comentarios: Dr. Antonio Peña Díaz, Dr. Diego González Halphen, Dr. Eleazar Martínez Barajas, Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y Dra. Irma Bernal Lugo.

Así mismo, agradezco también a la Q. Laurel Fabila Ibarra por su ayuda técnica en el invernadero, así como al M. en C. Fernando Guzmán Chávez y a la M. en C. Paulina Aguilera Alvarado por su asesoría y apoyo en el presente proyecto.

Finalmente GRACIAS, a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que he recibido a lo largo de estos años.



ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS	VII
II. RESUMEN	VIII
III. INTRODUCCIÓN	1
III.1 Hongos que colonizan al maíz: <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i> ..	2
III.1.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	2
III.1.2 <i>Trichoderma asperellum</i>	4
III.2 Transporte de carbohidratos en plantas	9
III.2.1 Transportadores de sacarosa	11
III.2.2 Transportadores de monosacáridos.....	12
III.2.3 Transportadores SWEET	13
III.3 SWEET en la interacción con patógenos.....	17
III.4 Expresión de los transportadores de carbohidratos en el microorganismo durante su interacción con las plantas	19
IV. ANTECEDENTES	22
V. HIPÓTESIS	25
VI. OBJETIVO GENERAL	26
VII. OBJETIVOS PARTICULARES	26
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VIII.1 Búsqueda de la proteína tipo SWEET en maíz	28
VIII.2 Amplificación de las secuencias dirigidas a SWEET por RT-PCR.....	28
VIII.2.1 Extracción RNA por el método del trizol.....	29
VIII.2.2 Reacción RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa).....	30
VIII.3 Clonación parcial de <i>ZmSWEETα</i> y <i>ZmSWEETγ</i>	32
VIII.3.1 Ligación en pGEM®-T Easy y transformación	32
VIII.3.2 Secuenciación	33
VIII.4 Análisis in silico para establecer la estructura más probable de <i>ZmSWEETα</i>	33
VIII.5 Clonación región ORF gen <i>ZmSWEETα</i>	35
VIII.6 Expresión heteróloga de <i>ZmSWEETα</i> en células HEK293.....	37
VIII.6.1 Tecnología Gateway®	37
VIII.6.2 Generación de sitios <i>att</i> en el producto de PCR	38



VIII.6.3 Introducción de la secuencia <i>attB-ZmSweetα-attB</i> en el vector donador pDONR™221	40
VIII.6.4 Introducción de la secuencia <i>attL-ZmSweetα-attL</i> en el vector de expresión pcDNA™3.2/V5-DEST.....	42
VIII.6.5 Transfección a células HEK293.....	43
VIII.6.6 Estandarización de la transfección.....	44
VIII.6.7 Expresión de ZmSWEETα en la fracción microsomal.....	44
VIII.6.8 Determinación de la expresión del SWEET mediante Western Blot.....	44
VIII.7 Determinación de la expresión de ZmSWEETα en el sistema <i>T. asperellum</i> -maíz- <i>F. verticillioides</i>	45
VIII.7.1 Material biológico.....	45
VIII.7.1.1 Inóculos de <i>F. verticillioides</i> y <i>T. asperellum</i>	45
VIII.7.1.2 Plántulas de maíz.....	46
VIII.7.2 Extracción, cuantificación y calibración de RNA.....	47
VIII.7.3 Reacción de qPCR.....	48
VIII.7.3.1 Estandarización de las condiciones para qPCR.....	48
VIII.7.3.2 Cuantificación de la expresión de <i>ZmSWEETα</i> por qPCR.....	51
VIII.8 Búsqueda de <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i> en las hojas de las plántulas tratadas.....	52
VIII.8.1 Tinción con azul algodón lactofenol.....	53
VIII.8.2 Extracción de DNA de hongo y PCR punto final con oligos específicos para <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i>	53
IX. RESULTADOS	55
IX.1 Búsqueda de la proteína tipo SWEET en maíz.....	55
IX.2 Obtención de clonas parciales: <i>ZmSWEETα</i> y <i>ZmSWEETγ</i>	56
IX.3 Clonación de la región ORF de <i>ZmSWEETα</i>	57
IX.4. Análisis in silico de <i>ZmSWEETα</i>	59
IX.5 Expresión de <i>ZmSWEETα</i> en células HEK293.....	64
IX.6 Efecto de <i>F. verticillioides</i> y <i>T. asperellum</i> en la expresión de <i>ZmSWEETα</i>	67
IX.6.1 Crecimiento de <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i> en hojas.....	69
IX.6.2 Identificación de <i>T. asperellum</i> y <i>F. verticillioides</i> en hojas mediante PCR.....	71
X. DISCUSIÓN	72
X.1 Genes ortólogos y parálogos de <i>ZmSWEETα</i>	72
X.2 Función transportadora de los SWEET.....	75



X.3 La expresión de <i>ZmSWEETα</i> cambia cuando el maíz ha sido infectado con <i>T. asperellum</i> y cuando éste y <i>F. verticillioides</i> coexisten en la planta.	77
XI. CONCLUSIONES	86
XII. PERSPECTIVAS	87
XIII. ANEXOS	88
ANEXO I. Purificación de producto de PCR de gel de agarosa	88
ANEXO II: Transformación por choque térmico.....	88
ANEXO III: Purificación del plásmido con Kit Zyppy Plasmid Miniprep	89
ANEXO IV: Propagación del vector pcDNA™3.2/V5-DEST.....	90
ANEXO V: Análisis de hidrofobicidad en A) DAS y B) TopPred.....	90
ANEXO VI: Secuencia de la construcción pDONR™221- <i>ZmSWEETα</i>	93
ANEXO VII: Comparación entre las secuencias <i>ZMSWEETα</i> y <i>ZmSWEETγ</i>	94
ANEXO VIII: Expresión de los <i>AtSWEET</i> bajo diferentes tratamientos con hormonas. 95	
XIV. REFERENCIAS	96



I. ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario	RT	Transcriptasa reversa
DEPC	Dietil pirocarbonato		
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato	SDS	Duodecil sulfato de sodio
Dpi	Días post-infección	STP	Proteína transportadora de azúcares
DTT	Ditiotreitol		
EDTA	Ácido etilendiamina tetra acético	Sac	Sacarosa
EGTA	Etilenglicol ácido tetraácetico	SUT	Transportador de sacarosa
FB1	Fumonisina B1	TAE	Tris-acetato-EDTA
INT	Transportador de inositol	TAL	Activador transcripcional
MST	Transportador de monosacáridos	TM	Cruces transmembranales
ORF	Marco abierto de lectura	TMT	Transportador membranal del tonoplasto
PAL	Fenilalanina amonio liasa	UBQ	Ubiquitina
pGlcT	Transportador plastídico de glucosa	UTR	Región no traducida
		VGT	Transportador vacuolar de glucosa
PTM	Transportador poliol/monosacárido		
PVDF	Polividildifenidol		
qPCR	Reacción en cadena de la polimersa cuantitativa		



II. RESUMEN

En las plantas, la sacarosa es sintetizada en las células fotosintéticas; sin embargo, no toda es empleada o acumulada en las células del mesófilo, el exceso es distribuido a los tejidos no fotosintéticos a través del sistema vascular de la planta. El eflujo de azúcar por los transportadores SWEET es esencial para remover la sacarosa de las células del mesófilo y cargar con azúcar el apoplasto de las células del parénquima del floema. También resultan importantes en el desarrollo del polen y en la producción de néctar. Algunos fitopatógenos manipulan la expresión de ciertos genes *AtSWEETs* por la introducción de factores de transcripción funcionales a la célula de la planta.^{1,2} Existen muchas preguntas por resolver acerca de ésta notable estrategia que los microorganismos ejercen para obtener nutrientes de las plantas. A pesar de su importancia, los transportadores SWEET, han sido caracterizados sólo en tres especies, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Medicago truncatula*²,

El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar los transportadores SWEET en maíz (*Zea mays*), específicamente aquellos relacionados con la interacción planta-microorganismo. Para cumplir esta meta, se realizó la búsqueda y análisis de homólogos de una secuencia SWEET de *A. thaliana* (*AtSWEET12*) en el genoma del maíz. Una de las secuencias obtenidas de este análisis fue seleccionada y nombrada *ZmSWEET α* . El análisis *in silico* de *ZmSWEET α* predijo una proteína con siete cruces transmembranales, característicos de los miembros de la familia de transportadores SWEET.¹ *ZmSWEET α* fue clonada empleando la tecnología Gateway[®] y posteriormente se llevó a cabo la expresión heteróloga de la proteína en una línea celular derivada de riñón humano (HEK293). La proteína se encontró en la membrana plasmática con un peso molecular aproximado de 33 KDa. Adicionalmente, se efectuaron análisis de expresión de *ZmSWEET α* por qPCR de hojas de plantas infectadas. Se encontró una inducción de *ZmSWEET α*

¹ Chen *et al.*, 2010

² Chen *et al.*, 2012



a los 9 días con *Trichoderma asperellum*, solo o después de la infección con *Fusarium verticillioides*. Ambos hongos son comunes en suelo y en maíz, pero presentan diferentes interacciones con las plantas, *T. asperellum* es benéfico mientras que *F. verticillioides* es un patógeno.

En conclusión, se clonó un *SWEET* de maíz, que se traduce a una proteína ubicada en la membrana y que es inducido durante la infección de la planta con *T. asperellum* y *F. verticillioides*.



III. INTRODUCCIÓN

La sobrevivencia de las plantas y la productividad de los cultivos dependen estrictamente de su capacidad para adaptarse a diferentes ambientes. Una de estas adaptaciones resulta de la interacción de las raíces con los componentes bióticos y abióticos del suelo (Pinton y Varanini, 2001). En las interacciones con elementos bióticos, como la interacción planta-microorganismo, existe un diálogo molecular que conduce a modificaciones metabólicas en ambos organismos (Vargas *et al.*, 2009).

Las plantas producen una amplia variedad de compuestos, como azúcares, ácidos orgánicos y vitaminas, los cuales pueden ser usados como nutrientes o moléculas señal para las poblaciones microbianas. Por su parte, los microorganismos son capaces de detectar a la planta hospedera e iniciar sus estrategias de colonización al liberar moléculas similares o idénticas a las fitohormonas, compuestos volátiles y proteínas que pueden actuar directa o indirectamente activando o reduciendo la inmunidad de la planta. La activación de la inmunidad puede ayudar a la planta no sólo a combatir al microorganismo que recién colonizó; también reduce la susceptibilidad a la posterior infección de muchos otros microorganismos (Ortíz-Castro *et al.*, 2009).

Las relaciones que se establecen entre la planta y los microorganismos pueden ser positivas para la planta; por ejemplo, la formación de micorrizas mejora la absorción de nutrientes y agua, además de proporcionar protección a la planta ante enfermedades (Pinton y Varanini, 2001). Mientras que las interacciones negativas pueden llevar a la enfermedad en los tejidos o en toda la planta, la planta debe controlar dos procesos: la invasión y disminuir la interacción (Gregory, 2006).



III.1 Hongos que colonizan al maíz: *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*

Los hongos son organismos osmotróficos, proliferan en la planta mediante la secreción de una amplia diversidad de enzimas despolimerizantes de celulosa y lignina, así como de proteínas y lípidos; para producir los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos simples para su nutrición (Talbot, 2010).

III.1.1 *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides es el principal hongo patógeno asociado al cultivo de maíz, aunque también afecta a otros cultivos como trigo, avena, cebada y arroz. Este patógeno puede crecer como endófito, tanto en tejidos vegetativos como reproductivos, usualmente sin causar síntomas evidentes de enfermedad en la planta, lo cual hace difícil su detección, prevención y control. Sin embargo, puede cambiar a un estilo de vida necrótrofo; en el maíz por ejemplo, provoca diferentes tipos de enfermedades incluyendo la pudrición del tallo, raíces y espiga. Debido a que es capaz de moverse sistémicamente desde cualquier tejido infectado, puede ocasionar infección en varios tejidos de la planta (Munkvold y Desjardins, 1997). Las pérdidas por *Fusarium* en el mundo van del 10 al 30% de la cosecha, dependiendo de factores ambientales (Ferrigo *et al.*, 2014); las pérdidas económicas se calculan entre 1998 y 2002 en Norte y Centroamérica de \$2,700 millones de dólares (Leplant *et al.*, 2013).

Fusarium produce diversas micotoxinas, incluyendo a las fumonisinas, ácido fusárico y fusarina C. Las fumonisinas son el mayor contaminante en las semillas del maíz y existen cerca de 28 análogos de ellas. Aunque la mayoría son raras y se encuentran en bajas concentraciones, la fumonisina B₁ (FB1) es la más importante de este grupo debido a que es la más abundante y activa toxicológicamente (Baldwin *et al.*, 2014).



El consumo de alimentos contaminados con FB₁ produce edema pulmonar en los cerdos y leucoencefalomalacia en caballos. En ratas y ratones es nefrotóxica y hepatotóxica. El efecto en humanos es dudoso; sin embargo, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) la ha clasificado en el grupo 2B como posible carcinógeno en humanos (Domijan, 2012).

El papel de las fumonisinas en el proceso de infección no está del todo claro. En plántulas de maíz se ha observado una clara relación entre la inoculación de las semillas con cepas productoras de fumonisinas y el desarrollo de los síntomas de enfermedad (Baldwin *et al.*, 2014).

Se han planteado varios mecanismos para que la FB₁ produzca enfermedad en las plantas, como el aumento en la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo, al promover la producción de radicales libres, además del incremento en la permeabilidad de la membrana (Calzada-Alejo, 2011; Domijan, 2012).

A pesar del poco conocimiento sobre todos los eventos que llevan a la enfermedad, se ha demostrado que parte de la toxicidad de las fumonisinas involucra la inhibición competitiva de una enzima clave en el metabolismo de esfingolípidos, la ceramida sintasa, debido a la similitud estructural de la FB₁ con la esfingosina y la esfinganina (Figura 1). La inhibición de la ceramida sintasa reduce los niveles de ceramida y otros esfingolípidos e incrementa las bases esfingoideas, cambios que puede contribuir a la severidad de los síntomas de la enfermedad (Domijan, 2012).

Además, la FB₁ inhibe acompetitivamente a la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005) y altera la actividad de las β-1,3-glucanasas de maíz, enzimas importantes en la defensa de la planta, la FB₁ inhibe a una isoforma ácida e induce dos isoformas básicas (Sánchez-Rangel *et al.*, 2012).

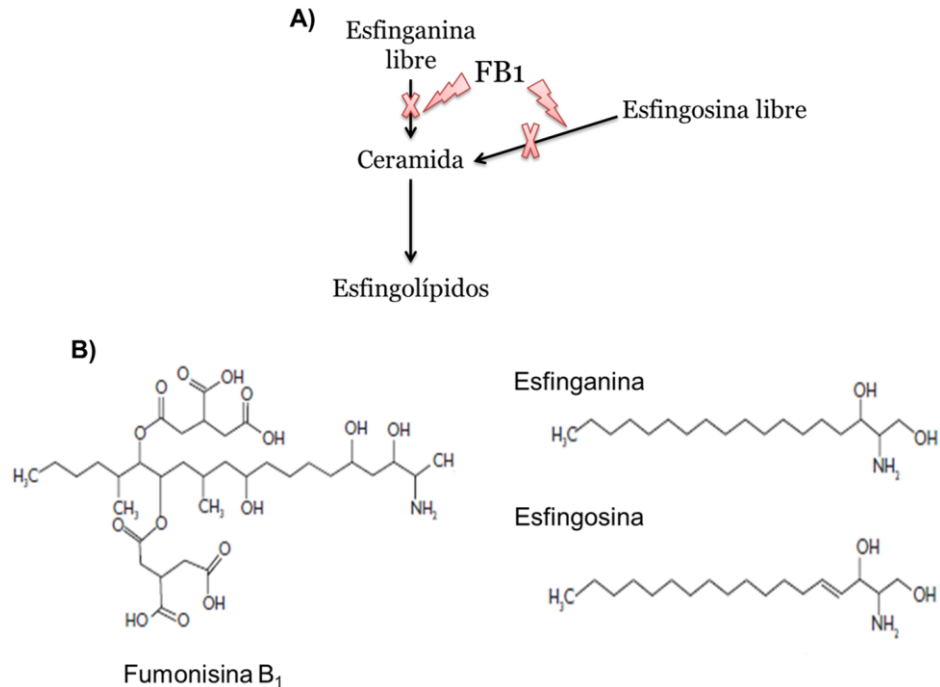


Figura 1. Mecanismo de acción y estructura de FB1. **A) Mecanismo de acción de la fumonisina B₁** **B) Estructuras de la FB₁, esfingosina y esfinganina.** Tomado y modificado de Domijan, 2012.

III.1.2 *Trichoderma asperellum*

Trichoderma spp. es un hongo benéfico para las plantas. Se encuentra con frecuencia en vida libre en los suelos, mientras que en asociación con las plantas es denominado “rizósfera competente”, por su capacidad de colonizar y crecer asociado a las raíces de la planta. *Trichoderma* se instala a nivel de la epidermis de la raíz limitándose a la primera o segunda capa de células de la planta hospedera (Ferrigo *et al.*, 2014). El mecanismo propuesto que facilita la penetración de *Trichoderma* en la raíz es la secreción de proteínas similares a las expansinas, lo que le permite aflojar la pared celular y colonizar el apoplasto sin romper las células vegetales (Mukherjee *et al.*, 2012). Este patrón de invasión sugiere un proceso de colonización estrictamente controlado por ambas partes, aunque las vías bioquímicas involucradas en el control de tal asociación no han sido completamente dilucidadas (Vargas *et al.*, 2009).



A pesar de que naturalmente es más frecuente encontrar a *Trichoderma* en el suelo o las raíces, es capaz de sobrevivir y colonizar frutos, flores y hojas que han sido infectados con el hongo. Así se han descrito cepas endofíticas: *T. stromaticum* en cocoa (Harman *et al.*, 2004) y las cepas *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* en tallos de maíz (Sobowale *et al.*, 2011).

Los hongos del género *Trichoderma* en simbiosis con la planta presentan dos actividades que benefician a la planta, son promotores del crecimiento y hongos biocontrol (Vargas *et al.*, 2011):

Efecto promotor del crecimiento. La infección de las raíces con *Trichoderma* estimula el crecimiento radicular y la toma y concentración de cobre, fósforo, manganeso y sodio (Harman *et al.*, 2004), además de producir quelantes de hierro (sideróforos) (Verma *et al.*, 2007), actividades que se propone estimulan el incremento en la biomasa de la planta (Druzhinina *et al.*, 2011). Otro de los mecanismos que se sugiere ocasionan tanto el aumento en biomasa como el cambio en la arquitectura radical, es la producción de varias moléculas que pertenecen al grupo de las auxinas, fitohormonas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011).

Biocontrol de plantas. Actividad que se produce al menos por dos vías distintas, una por la interacción directa de *Trichoderma* o de los compuestos secretados por éste con los patógenos del suelo y otra por aumentar las defensas de la planta.

A) Efecto protector contra patógenos de plantas. El efecto antagonista de *Trichoderma* contra muchos patógenos del suelo, incluyendo hongos, invertebrados y bacterias; se atribuye a varios mecanismos, uno de ellos es la producción de antimicrobianos o compuestos antagónicos, tales como peroxidasa, lacasa y peptaboles (péptidos de 11-25 aminoácidos, anfipáticos que forman canales iónicos en las membranas). También secreta enzimas hidrolíticas como las β -1,3-glucanasas (Marcello *et al.*, 2010), la subtilisina y las quitinasas, que son clave en la lisis de la pared



celular de su hospedero (Verma *et al*, 2007). *Trichoderma*, al ser un hongo, podría hidrolizar su propia pared celular con estos compuestos; sin embargo, su alta tasa de crecimiento le permite rehacer rápidamente su pared, además de contar con proteínas que reducen el acceso de las quitinasas a sus componentes estructurales (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). Por otra parte, al estar en contacto con las raíces de la planta, la estimula a producir sus propias enzimas con actividad antimicrobiana, entre las que destacan peroxidasas, quitinasas y la β -1,3-glucanasa (Harman *et al.*, 2004).

Otro mecanismo utilizado por *Trichoderma* spp. para eliminar a los patógenos es el contacto directo, llamado hiperparasitismo necrotrófico o micoparasitismo. Los eventos que conducen al micoparasitismo son complejos, e inician con la detección del otro hongo mediante la producción de una exoquitinasa extracelular. La difusión de esta enzima cataliza la liberación de oligómeros de pared celular del hongo blanco, los cuales a su vez inducen la expresión de endoquitinasas (Harman *et al.*, 2004) y al menos dos β -1,3-glucanasas extracelulares en *T. asperellum*, que hidrolizan la quitina y el β -1,3 glucano de la pared celular del hongo blanco (Marcello *et al.*, 2010).

Trichoderma se ancla a su hospedero por la unión de los carbohidratos de su pared celular a lectinas del hongo blanco, enrollándose y formando apresorios en su superficie (Figura 2) (Harman *et al.*, 2004). La muerte final de la presa, como se mencionó, resulta de las acciones sinérgicas de metabolitos secundarios entre los que se encuentran antifúngicos, enzimas hidrolíticas de pared celular y peptaboles (Druzhinina *et al.*, 2011). Además de micoparasitar, *Trichoderma* también puede alimentarse de hongos

muerdos, por lo cual también se le conoce como micotrófico, lo cual incluye tanto el estilo biotrófico como saprótrofo³ (Druzhinina *et al.*, 2011).



Figura 2. Fotografía microscópica de micoparasitismo entre *T. asperellum* y *F. verticillioides*. Tomado de Arciniega-Ruiz, 2012.

B) Inducción de las defensas de la planta. Trichoderma induce las respuestas de defensa de la planta; una de ellas es la resistencia sistémica inducida (ISR), que prepara a la planta para defenderse contra una diversidad de patógenos. La ISR es mediada por la señalización dependiente de jasmonato y etileno (Druzhinina *et al.*, 2011, Guzmán-Chávez, 2013), e inducida de manera dependiente de la concentración del hongo desde estadios tempranos de la interacción planta-hongo (Yedidia *et al.*, 2003).

El reconocimiento de patógenos por parte del hospedero puede lograrse por la percepción de moléculas comunes a muchas clases de microorganismos conocidos como patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). En Trichoderma, las xilanasas, peptaboiles, swolenina, entre otras, pueden actuar como MAMPs, induciendo cambios en los flujos iónicos y un aumento en el estrés oxidativo en las plantas, seguido de la deposición de calosa y síntesis de polifenoles,

³**Biótrofo** Invaden la planta, pero no la matan inmediatamente, porque dependen de su metabolismo para su desarrollo.
Saprotrofo Forma de nutrición de los organismos que se alimentan de materia orgánica muerta de origen vegetal.



lo cual evita futuras colonizaciones (Druzhinina *et al.*, 2011). En los últimos años se ha descrito un probable evocador de *T. virens*, la proteína Sm1, que al sintetizarse se deposita en las hojas de arroz y cotiledones de algodón protegiéndolos contra el patógeno *Colletotricum*. El mecanismo de defensa se debe a la acumulación de peróxido de hidrógeno, así como a la inducción local y sistémica de las β -1,3-glucanasas y quitinasas (Djonović *et al.*, 2006).

Debido a que *Trichoderma* beneficia a la planta en varios aspectos, hay preparados comerciales para mejorar el desempeño de las plantas en el campo, la mayoría incluyen a *Trichoderma atroviride* o *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* es una de las especies menos estudiadas, aunque es también un efectivo control biológico contra enfermedades del arroz (Marcello *et al.*, 2008).

Al tratamiento de semillas con un agente de biocontrol se le denomina **biopriming** y es una práctica muy utilizada a nivel mundial. Diversos reportes han demostrado la utilidad del biopriming; por ejemplo, plantas de maíz con biopriming e inoculadas con *F. verticillioides* reducen hasta el 65% del área necrótica que normalmente produce el hongo patógeno en el maíz (Guzmán-Chávez, 2013; Ferrigo *et al.*, 2014). En el tomate, la enfermedad provocada por *Alternaria solani* se redujo en las hojas mediante la aplicación de *Trichoderma*, manteniendo el efecto por 100 días. *Trichoderma* es eficaz contra los fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Botrytis cinérea* (Djonović *et al.*, 2006). A pesar de observar resistencia localizada o sistémica cuando se coloca *Trichoderma* en los suelos de cultivos, diferentes mecanismos pueden ser los responsables del biocontrol causado por diferentes cepas, en diferentes plantas y con diferentes patógenos (Harman *et al.*, 2004). Tanto los hongos benéficos como los patógenos, al interactuar con las plantas buscan fuentes de carbono, nitrógeno e iones para sobrevivir. La demanda de sacarosa por parte de los microorganismos puede ser perjudicial para el rendimiento de los cultivos (Lemoine *et al.*, 2013).



III.2 Transporte de carbohidratos en plantas

Las proteínas transportadoras son un blanco central en los mecanismos que permiten a las plantas tolerar ambientes adversos, por lo cual el entendimiento de la biología de los transportadores de membrana podría ser clave para el mejoramiento del contenido de micronutrientes en el grano y la tolerancia a suelos salinos y ácidos (Schroeder *et al.*, 2013). La toma y transporte de azúcares en las plantas es uno de los procesos más importantes para su crecimiento y desarrollo, y crítico para la productividad de las cosechas (Xuan *et al.*, 2013). Es además interesante su estudio, ya que se ha demostrado recientemente que su expresión es manipulada por algunos patógenos de plantas (Talbot, 2010; Sonnewald, 2011; Chen *et al.*, 2012)

La sacarosa es el principal producto de la fotosíntesis en las hojas (tejido fuente), azúcar que no sólo es usado en las células fotosintéticas, ya que el exceso se distribuye a lo largo de la planta vía floema (Figura 3) para sostener el metabolismo y crecimiento de los tejidos no fotosintéticos o la demanda como la de las raíces, meristemos y semillas (Büttner, 2007; Schroeder *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la reducción en el transporte de azúcares afecta el crecimiento y desarrollo de la planta (Braun *et al.*, 2014).

Las dos familias de proteínas transportadoras de carbohidratos mejor descritas en plantas son: 1) los transportadores de sacarosa (SUTs) también llamados SUC y 2) los transportadores de monosacáridos (MSTs). Ambos pertenecen a una superfamilia de facilitadores y funcionan como simportadores H⁺/azúcar; además comparten una estructura común caracterizada por 12 dominios transmembranales con la región amino y carboxilo orientada hacia el citoplasma y una asa citoplasmática larga que conecta a los cruces transmembranales 6 y 7 (Doidy *et al.*, 2012). Recientemente, se describió un tercer tipo de transportadores conocidos como SWEETs (“Sugars Will Eventually be Exported Transporters”). Los SWEETs son proteínas con 7 cruces transmembranales con actividad de

transporte difusional de carbohidratos (sacarosa o glucosa) y están principalmente localizados en el parénquima del floema para exportar sacarosa (Figura 3; Chen *et al*, 2010 y 2012).

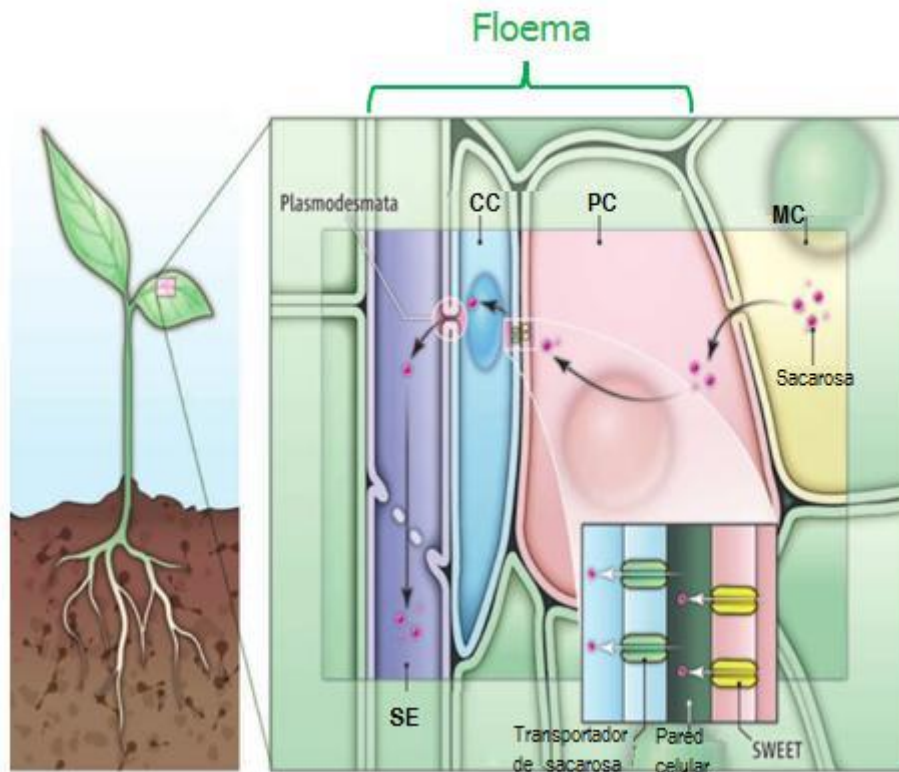


Figura 3. Transporte de carbohidratos y llenado del floema. La sacarosa que se sintetiza en la célula del mesófilo (MC) es exportada hacia la primera de las tres células que componen el floema, las del parénquima (PC), posteriormente mediante el transportador difusional SWEET, se exporta al apoplasto de la célula acompañante (CC) y ésta a su vez importa la sacarosa del apoplasto mediante un simportador sacarosa/H⁺. La sacarosa llega a los elementos cribosos de la savia (SE) mediante un poro que conecta a las CC y a los SE, denominado plasmodesmata, lo que permite que la concentración de sacarosa de las CC y SE sea la misma. La concentración de sacarosa en el floema puede llegar a ser de 1.0 M y difunde longitudinalmente a través de plasmodesmata que conectan a los SE, llevando a la sacarosa hacia las raíces, frutos y tejidos en crecimiento. Modificado de Braun, 2012.



III.2.1 Transportadores de sacarosa

Mientras una porción del carbono fijado fotosintéticamente es transitoriamente almacenado en cloroplastos y vacuola, aproximadamente el 80% es exportado por las hojas maduras a través del floema. El balance entre el almacenamiento en las vacuolas y el secuestro como almidón en los cloroplastos, además de la actividad fotosintética, regula la cantidad de sacarosa disponible para exportar, y en consecuencia altera la relación fuente/demanda (Lemoine *et al.*, 2013).

Para transportar la sacarosa desde las células del mesófilo hasta el tejido demanda, el disacárido debe llevarse al floema, proceso denominado cargado (“loading”) del floema. Posteriormente, el transporte a distancia ocurre por el movimiento de la sacarosa entre las células de los elementos de la savia en un movimiento longitudinal y finalmente la sacarosa es descargada del floema hacia los apoplastos, o bien al interior de la célula demanda (Doidy *et al.*, 2012). Los transportadores de sacarosa (SUT) han sido localizados y caracterizados en todas las fases del transporte a través del floema (Lemoine *et al.*, 2013).

La clasificación más reciente de SUTs describe 5 grupos o clados distintos: SUT1-SUT5. El clado SUT1 es específico para dicotiledóneas, es el más grande y comprende a las proteínas responsables del cargado de sacarosa en el floema. SUT3 es específico para monocotiledóneas y funcionalmente ortólogo a SUT1. El clado SUT5 es hasta ahora el menos estudiado, con una única proteína caracterizada en arroz, mientras que el clado SUT2 fue inicialmente descrito como la subfamilia de sensores de azúcar, aunque algunos miembros han sido reportados como transportadores funcionales. Los SUTs exhiben afinidades por la sacarosa en el margen milimolar, y pueden también unir a un amplio número de azúcares (Tabla 1; Doidy *et al.*, 2012).



Tabla 1. Clasificación y distribución de los 5 grupos de transportadores de sacarosa. Modificado de Ayre, 2011

Grupo/clado	Distribución	Miembros representativos	K _{0.5} (mM)
Grupo 1/SUT3	Monocotiledóneas, alta afinidad	ZmSUT1	3.7
		OsSUT1	7.5
Grupo 2/SUT1	Dicotiledóneas, alta afinidad	AtSUC1	0.5
		AtSUC2	0.77
Grupo 3/SUT2	Monocotiledóneas y dicotiledóneas/ baja afinidad	AtSUT2	1.9
Grupo 4/SUT4	Monocotiledóneas y dicotiledóneas/ baja afinidad	StSUT4	6.0
Grupo 5/SUT5	Monocotiledóneas/alta afinidad	OsSUT5	2.3

III.2.2 Transportadores de monosacáridos

Una vez que la sacarosa llega a las cercanías de las células del tejido demanda, puede ser transportada a éstas como sacarosa, o hidrolizarse en los apoplastos por una invertasa de la pared celular. Así, el transporte de monosacáridos juega un papel significativo en los intercambios intracelulares tanto en tejidos fuente como en tejidos demanda (Büttner, 2007).

La familia de transportadores de monosacáridos o MSTs comprende 53 miembros en *Arabidopsis*, 58 en *Medicago truncatula*, 59 en *Vitis vinifera* y 65 en *Oryza sativa* (Doidy *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* los genes que conforman los MST están distribuidos en siete subfamilias. Dentro de las subfamilias, el porcentaje de identidad se encuentra entre el 42 y 96% (Büttner, 2007).

Las siete subfamilias, se han nombrado de acuerdo con la especificidad por su sustrato (Figura 4): proteína transportadora de azúcares (STP), transportador de poliol/monosacárido (PTM), transportador de inositol (INT). De acuerdo con su localización subcelular: transportador vacuolar de glucosa (VGT), transportador

membranal del tonoplasto (TMT), transportador plastídico de glucosa (pGlcT). Hay incluso una condición de estrés que induce la expresión génica como la respuesta temprana a la deshidratación (ESL) (Doidy *et al.*, 2012).

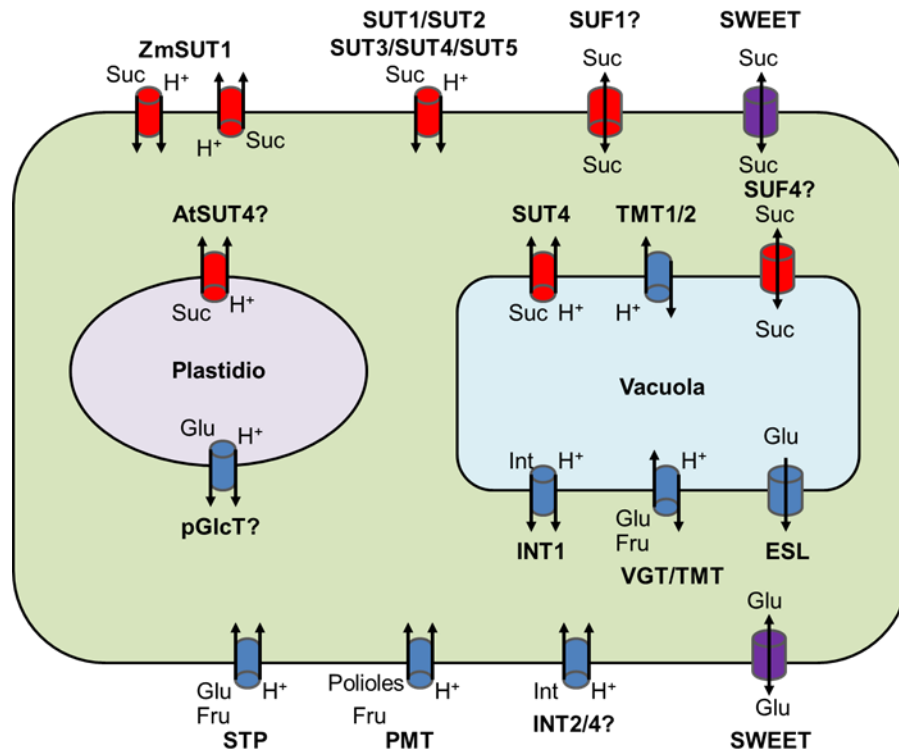


Figura 4. Distribución de los transportadores de carbohidratos en la célula vegetal. Modificado de Doidy *et al.*, 2012.

III.2.3 Transportadores SWEET

A últimas fechas ha aumentado el número de estudios enfocados al transporte de azúcares y su papel en la interacción planta-patógeno. En este contexto, recientemente se caracterizaron los transportadores SWEET, proteínas con la capacidad de transportar glucosa o sacarosa de manera difusional a través de la membrana plasmática, además de participar en la interacción planta-patógeno.

El primer gen del transportador SWEET, nombrado *MtN3*, se identificó en 1996 en *Medicago truncatula* al observarse su alta expresión después de que la planta fue inoculada con el microorganismo *Rhizobium meliloti* y durante el desarrollo de los



nódulos en la raíz, lo cual sugirió que este gen podría estar jugando un papel importante durante el desarrollo de la simbiosis (Gamas *et al.*, 1996). Dos años más tarde se halló un gen homólogo en *Drosophila*, al cual se le nombró *saliva* por expresarse exclusivamente en las glándulas salivales durante el desarrollo embrionario (Artero *et al.*, 1998). Aunque se encontraron niveles de expresión altos de estos genes, el papel fisiológico de *MtN3* y *saliva* en estos organismos no se ha esclarecido (Yuan y Wang, 2013).

A la fecha se han encontrado diferentes genes putativos *MtN3/saliva/SWEET* en varias especies, siendo las plantas las que poseen el mayor número de ellos. La familia SWEET en plantas comprende 17 miembros en *A. thaliana*, 15 en *M. truncatula* y 21 en *O. sativa*. En los mamíferos sólo se ha encontrado un gen para humano, babuino, rata y ratón; lo mismo sucede para los cordados y bacterias. En los artrópodos como *Drosophila* se ha descubierto que poseen dos genes similares a SWEET (Chen *et al.*, 2010). La presencia de esta proteína en diversos organismos, desde protozoarios unicelulares hasta eucariontes, hace evidente su importancia.

Se ha predicho que los SWEETs en humano y *C. elegans* así como los de plantas están compuestos de 7 cruces transmembranales (TM), formados por dos motivos conservados *MtN3/saliva* de 3-TM cada uno y conectados por una hélice central de baja similitud entre las diferentes especies y que se sugiere sirve de enlace (“linker”) para generar una estructura 3-1-3 (Figura 5A). Además de los SWEETs con 7-TM en eucariontes, se han identificado homólogos de los transportadores tipo SWEET en procariontes, a los cuales se les ha nombrado semiSWEET, por contener sólo una unidad de 3-TM (Figura 5B). Esta evidencia sugiere que los SWEETs de eucariontes evolucionaron de una unidad de 3-TM por duplicación y fusión con una inserción del cruce 4, el cual podría ayudar a reorientar la segunda repetición. Así mismo se sugiere que tanto los SWEETs como los semiSWEETs necesariamente deben oligomerizarse para dar lugar a un arreglo en la membrana que permita el transporte del azúcar (Xuan *et al.*, 2013).

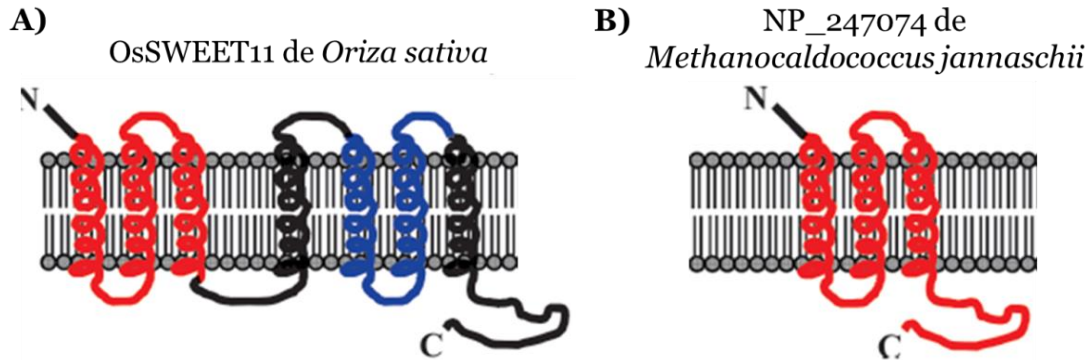


Figura 5. Dominios MtN3/saliva. A) SWEET de arroz compuesto por dos dominios MtN3/saliva. B) SWEET putativo de *M. jannaschii*, compuesto por un solo dominio MtN3/saliva. Modificado de Yuan y Wang, 2013.

Recientemente se realizó un análisis filogenético que revela que esta familia de proteínas puede clasificarse en tres clados: Las proteínas de monocotiledóneas y dicotiledóneas se distribuyen en el clado I, y contienen dos dominios MtN3/saliva. El clado II incluye proteínas pertenecientes a metazoos y mamíferos, y también presentan dos dominios MtN3/saliva, y por último las proteínas de las bacterias y las arqueas que caen dentro del clado III con un solo dominio MtN3/saliva (Yuan y Wang, 2013).

Hasta ahora, los genes tipo *MtN3/saliva/SWEET* se han encontrado más relacionados con el desarrollo reproductivo que con otros procesos fisiológicos. En las plantas, la supresión de *OsSWEET11* produce fertilidad reducida o infertilidad. En la mutante de *OsSWEET14*, el tamaño de la semilla se reduce y se retarda el crecimiento de la planta. Además, *OsSWEET1-5* y *OsSWEET15* muestran un nivel relativamente alto de expresión en flores a diferentes etapas de desarrollo (Yuan y Wang, 2013).

En *Arabidopsis* *AtSWEET8* se expresa fuertemente en microesporas, mientras que *AtSWEET5* lo hace en los gametofitos masculinos, sugiriendo su participación en el desarrollo del polen. *AtSWEET7* se expresa de preferencia en el desarrollo del polen y *AtSWEET1* se detectó en etapas tempranas del ápice floral. *AtSWEET1*, *AtSWEET4*, *AtSWEET5*, *AtSWEET7*, *AtSWEET8*, *AtSWEET13*,



AtSWEET14 y *AtSWEET15* muestran una expresión relativamente alta en flores. Sin embargo, también se expresan en otro tipo de situaciones fisiológicas, por ejemplo *AtSWEET15* incrementa su expresión gradualmente durante la senescencia de la hoja y también es inducible por frío y alta salinidad (Yuan y Wang, 2013).

En otras especies no se ha encontrado su papel en la reproducción, como el homólogo *Swt-1* de *C. elegans*, que interviene en el transporte de glucosa y trehalosa y, la supresión de su expresión (inducida por RNAi) reduce el tamaño y viabilidad del gusano además de alterar su contenido de lípidos (Chen *et al.*, 2012). En el humano hay un solo gen SWEET, *HsSWEET1*, y se ha postulado como un candidato para el eflujo vesicular de la glucosa de las células del intestino e hígado (Chen *et al.*, 2012).

La caracterización de la actividad de los transportadores SWEET en plantas, demostró que los SWEETs transportan glucosa y/o sacarosa con baja afinidad ($K_{0.5}$ Glucosa= 9 mM para *AtSWEET1*; $K_{0.5}$ Sacarosa= 70 mM para *AtSWEET12*) y su actividad de transporte es independiente del pH, lo cual sugiere una función como uniportador (Chen *et al.*, 2010 y 2012).

En *Arabidopsis* *AtSWEET11* y *12* se expresan abundantemente en las células del floema de las hojas, funcionando como transportadores de baja afinidad para el eflujo de la sacarosa de las células del parénquima hacia el apoplasto y han mostrado co-expresión con genes involucrados en la biosíntesis de sacarosa y cargado del floema (como la *sacarosa fosfato sintasa* y *SUC2*). Las mutantes de *AtSWEET11* y *12* redujeron la exudación de fotoasimilados en hoja conduciendo a su acumulación, además las dobles mutantes en estos genes son pequeñas en comparación con las silvestres y muestran una elevación en los niveles de almidón, sacarosa y hexosas (Chen *et al.*, 2012).



La localización de un SWEET en el floema asociado a su función de uniportador llevó a plantear un modelo de dos pasos para la llegada o cargado del floema, en el que el transportador SWEET localizado en el parénquima del floema transporta la sacarosa hacia el apoplasto de la célula acompañante; esta última, al contener al transportador de sacarosa tipo SUT1 en su membrana plasmática, importa la sacarosa que después se distribuye a través de los elementos de la savia hacia los sitios en donde lo requiera la planta (Figura 3; Braun, 2012; Chen *et al.*, 2012).

Además de su participación en el cargado del floema, los genes tipo *MtN3/saliva/SWEET* también participan en la nutrición del polen, la senescencia y adaptación ambiental, así como en la susceptibilidad a patógenos (Yuan y Wang, 2013). El *SWEET17* de *A. thaliana* es un transportador de azúcar localizado en la vacuola que controla el contenido de fructosa en las hojas, mientras que *OsSWEET11* y *OsSWEET14* son blancos de las bacterias causantes de enfermedades en el arroz (Chen *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2006).

III.3 SWEET en la interacción con patógenos

Durante la interacción de algunos microorganismos con las plantas, los primeros son capaces de introducir en el citoplasma de la célula vegetal proteínas con función de factor de transcripción, este es el caso de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) y pv. *oryzicola* (*Xoc*), que insertan los evocadores TAL (Transcription activator-like) en la planta vía un sistema de secreción especializado tipo III (Verdier *et al.*, 2012). Estas proteínas constituyen la mayor familia de efectores con hasta 19 por cepa; algunos contribuyen a la virulencia por activación de los genes del hospedero que incrementan la susceptibilidad y otros funcionan como factores de avirulencia por activación de genes de resistencia (Verdier *et al.*, 2012).

Los efectores TAL presentan un dominio de 33-34 aminoácidos que se une a la región promotora de los genes blanco, también llamados de susceptibilidad. Este dominio de unión junto con el dominio de activación localizado en el C-terminal, les permite funcionar como factores de transcripción específicos de genes en la planta (Streubel *et al.*, 2013). Entre los evocadores de *X. oryzae* se pueden citar a: PthXo1 de la cepa PXO99 que induce hasta 103 veces a *OsSWEET11* (Figura 6); también los efectores PthXo3, AvrXa7 y TalC de las cepas PX086, JXO1 y BA13, respectivamente, inducen la expresión de *OsSWEET14* (Chen *et al.*, 2010; Verdier *et al.*, 2012). Recientemente se identificó un nuevo evocador en *Xoo* que presumiblemente sería capaz de inducir la expresión de hasta 5 *SWEETs* en el arroz (*OsSWEET11*, *OsSWEET12*, *OsSWEET14*, *OsSWEET13* y *OsSWEET15*) (Streubel *et al.*, 2013).

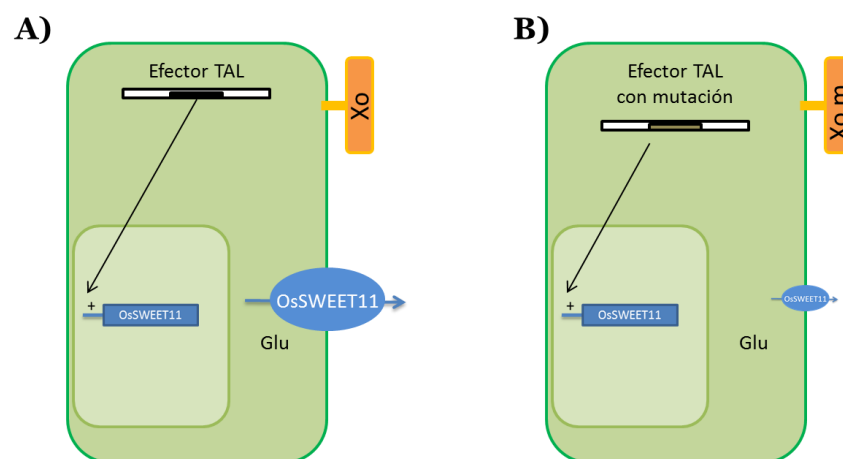


Figura 6. Modelo de la inducción de SWEET durante la patogénesis en arroz. A) El patógeno *Xoo* inyecta al efector TAL dentro de las células del arroz. Este evocador induce a *OsSWEET11*, conduciendo al eflujo de glucosa. **B)** Una mutante del efector TAL no induce a *OsSWEET11*, reduciendo el crecimiento microbiano. Modificado de Chen *et al.*, 2010.

Por otra parte, en *Arabidopsis* se ha observado un efecto similar, en donde al menos siete miembros (*AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET7*, *AtSWEET8*, *AtSWEET10*, *AtSWEET12* y *AtSWEET15*) son transcripcionalmente inducidos por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* cepa DC3000 en hojas, mientras que *B. cinerea* sobrerregula la expresión de *AtSWEET4*, *AtSWEET15* y *AtSWEET17*, en



tanto que *Golovinomyces cichoracearum* sobreexpresa a *AtSWEET11* y *AtSWEET12* (Chen *et al.*, 2010).

En respuesta a los efectores de los microorganismos, las plantas han evolucionado mecanismos altamente específicos para defenderse; por ejemplo, los genes de resistencia *Xa27* en arroz y *Bs3* en pimiento también son transcripcionalmente activados por efectores TAL de patógenos, sin embargo, éstos bloquean la progresión de la enfermedad al provocar una muerte celular localizada (Verdier *et al.*, 2012).

III.4 Expresión de los transportadores de carbohidratos en el microorganismo durante su interacción con las plantas

La co-evolución de plantas y hongos en diversos ambientes a través de cientos de millones de años hizo posible la emergencia de interacciones cerradas de las especies pertenecientes a ambos reinos; estas interacciones se pueden dividir en mutualistas y patogénicas. En ambas, los microorganismos intentan evadir o suprimir las defensas de la planta y desviar los nutrientes, especialmente los azúcares del hospedero, para su crecimiento (Lemoine *et al.*, 2013). Aún falta mucho por entender sobre los mecanismos de transporte y distribución de los azúcares a través de las membranas localizadas en las interfaces planta-hongo (Doidy *et al.*, 2012).

En el caso de los patógenos, su meta es anular o evitar las señales potencialmente reconocidas por el hospedero, como evitar los cambios en el contenido de glucosa en los apoplastos, ya que la glucosa es una señal que modifica la expresión de genes de defensa en la planta (Doidy *et al.*, 2012; Pieterse *et al.*, 2009).



La primera evidencia de la participación e importancia de un transportador de carbohidratos durante la interacción planta-patógeno fue durante la interacción de *Uromyces fabae* con haba, (Voegele *et al.*, 2009), el transportador MST se encontró en la interfase planta-hongo, específicamente en los haustorios. Posteriormente, en *B. cinerea* se caracterizó un MST durante la interacción con tomate, que mostró alta afinidad por la fructosa.

Hasta hace algunos años, todas las proteínas transportadoras identificadas en interacciones simbióticas o planta/hongo patógeno se habían descrito como específicas para monosacáridos; sin embargo, en 2001 el primer SUT se caracterizó en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, y nueve años después, se aisló el primer SUT involucrado en las interacciones planta-microorganismo del patógeno *Ustilago maydis* (UmSRT1) durante su infección en maíz (Wahl *et al.*, 2010). También se encontró un transportador de este tipo en un hongo biocontrol, *Trichoderma virens* (TvSUT), involucrado en la toma de sacarosa de los exudados de la raíz (Vargas *et al.*, 2011). Tanto TvSUT como UmSRT1 muestran una muy alta especificidad por la sacarosa, mientras que los SUTs de plantas generalmente transportan una amplia variedad de sustratos.

El transportador de sacarosa *UmSrt1* de *U. maydis* sólo se expresa durante su interacción con la planta, por lo que se le ha propuesto como un factor de virulencia. Se sugiere que *UmSrt1* es una proteína con 12 dominios transmembranales, simportador con protones con una alta afinidad por la sacarosa ($K_m = 26 \pm 4.3 \mu\text{M}$), aún mayor a la que presenta el transportador de sacarosa en plantas, en las que su K_m se encuentra en el orden milimolar (0.5-7.5 mM), representando así, una competencia por el sustrato favorable para el hongo (Wahl *et al.*, 2010).

Por su parte, el transportador en *T. virens* (TvSUT) posee propiedades moleculares y bioquímicas similares a los simportadores Sacarosa/H⁺ de plantas. A diferencia de *UmStr1*, *TvSUT* no sólo se expresa en presencia de la planta, sino



también en medios con sacarosa (Vargas *et al.*, 2011) y co-expresa con una invertasa intracelular, por lo que se presume que ambas proteínas son necesarias en los mecanismos que controlan la asociación simbiótica y el crecimiento fúngico en presencia de sacarosa, pues la ausencia de sacarosa reduce significativamente la transcripción de la invertasa y cesa la del transportador de sacarosa (Vargas *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011).

Los trabajos del grupo del Dr. Kenerley (Vargas *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011) y del grupo del Dr. Sauer (Wahl *et al.*, 2010) han aportado evidencias directas de la utilización de sacarosa durante la interacción planta-microorganismo, cuestionando la conocida visión que se tenía de que la utilización de sacarosa por el hongo resulta de la actividad de una invertasa extracelular del hongo, seguida por un transporte específico de glucosa, y sugiere que el hongo evita la señalización mediada por glucosa que podría alertar a la planta a defenderse.

Además de UmSrt1 y TvSUT, se ha encontrado otra proteína con características similares en el hongo *F. verticillioides*. El gen *fst1*, localizado en el cromosoma 10, codifica para una proteína de 547 aminoácidos, con una estructura predicha de 12 dominios transmembranales; sin embargo, no se tiene evidencia de que actúe como transportador. La reducida capacidad para colonizar maíz por parte de las cepas de *Fusarium* mutantes para *fst1*, ha llevado a sugerir que este gen es requerido para la patogenicidad (Kim y Woloshuk, 2010).



IV. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, en plantas la sacarosa es el principal carbohidrato transportado desde tejido fuente hasta tejido demanda (Figura 7). Sin embargo, el mecanismo por el cual la sacarosa pasa de las células del parénquima a las células acompañantes era incierto hasta hace poco. Los datos encontrados recientemente sugieren un mecanismo en el que la sacarosa es primero exportada al apoplasto a través de los transportadores SWEET y posteriormente es importada por los SUTs localizados en las células acompañantes (Braun, 2012; Chen *et al.*, 2012), para posteriormente ser dirigida a tejido demanda, en donde puede ser tomada directamente por los SUTs o ser hidrolizada por invertasas de pared celular y recuperada por MSTs (Ayre, 2011).

En maíz (*Zea mays*) ha sido descrito el flujo de carbono a través de la actividad de sus transportadores de sacarosa/H⁺, así mismo se han producido mutantes para el transportador de sacarosa ZmSUT1, el más abundante en esta especie. No obstante que el fenotipo muestra un crecimiento reducido y con una acumulación mayor de sacarosa y hexosas en las hojas, la planta sobrevive hasta estadios en los que alcanza a producir los órganos reproductores (Slewinski *et al.*, 2008), de donde se deduce que la participación de los SWEETs debe ser relevante para mantener el reparto de carbono aún en ausencia de ZmSUT1.

Además, siendo una especie que es atacada por diferentes microorganismos, sobre todo hongos, se hace importante determinar si éstos manipulan a los SWEETs y si la estrategia es distinta a la de *Arabidopsis* (dicotiledónea) o de arroz, y de este último en particular, ya que aunque al igual que el maíz es una monocotiledónea, el arroz no tiene el mismo sistema del cargado del floema que el maíz, a juzgar por la disposición celular del floema (Braun *et al.*, 2014).

Respecto a la interacción de maíz con los hongos, nuestro grupo de trabajo ha encontrado que el bioprimering de semillas con *T. asperelum*, incrementa la talla de



la planta y el grosor del tallo y que el posterior reto de las plantas con el hongo patógeno *F. verticillioides* retarda los síntomas de la enfermedad en las hojas, y mantiene los niveles de clorofila altos. Ello sugiere que probablemente el metabolismo de carbono se haya modificado para beneficio de la planta (Guzmán-Chávez, 2013). Es posible entonces suponer que la manipulación del eflujo de carbohidratos a través de los SWEETs podría estar ocurriendo en la interacción de la planta de maíz con *Trichoderma* y *Fusarium*.

La comprensión de las alteraciones en la distribución del carbono ocasionadas por la presencia del patógeno puede ayudar a resolver algunas preguntas sobre cómo se modula la distribución del carbono en la planta, y principalmente cómo manipularla para mejorar el desempeño de los cultivos. El estudio de los SWEETs permitirá entender la forma en que ocurre la nutrición del polen, la producción de néctar y el secuestro de carbono por parte de los microorganismos patógenos, todos ellos fenómenos en los que hay un eflujo activo de sacarosa.

A la fecha, sólo se han caracterizado funcionalmente los transportadores SWEET en *A. thaliana*, *O. sativa* y *M. truncatula* en plantas. Lo que es una razón más para realizar el estudio de los SWEETs en la planta del maíz. Por lo anterior, en el sistema que se tiene en el laboratorio en donde interactúan los hongos solos o uno después del otro, se investigará si la expresión de los SWEETs es manipulada y si existe una diferencia entre un hongo patógeno como *Fusarium verticillioides* o un hongo benéfico como *Trichoderma asperellum*.

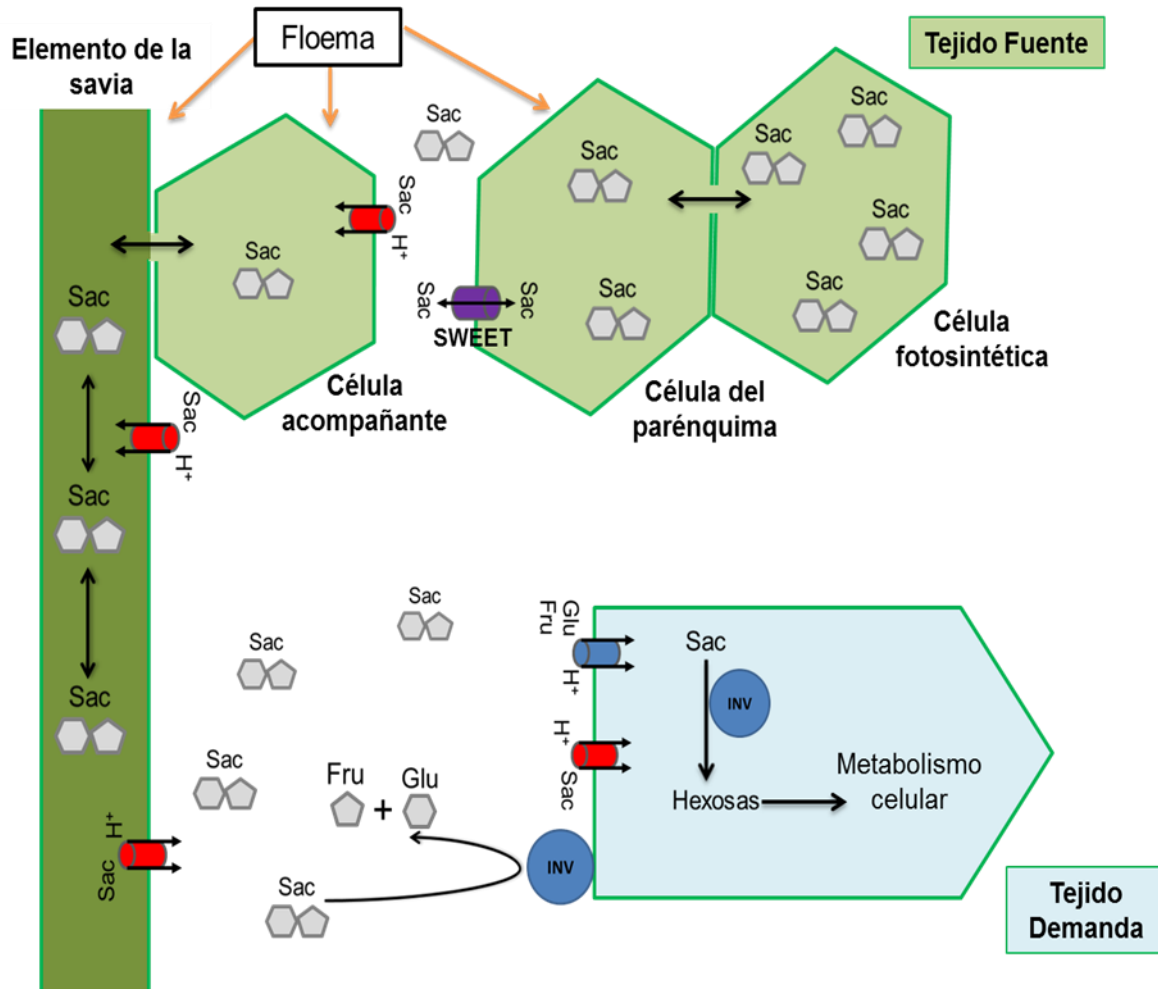


Figura 7. Transporte de carbohidratos de tejido fuente a tejido demanda. La interacción de la planta con microorganismos como *T. asperellum* y *F. verticillioides* podría estar modificando el transporte de carbohidratos al alterar la expresión de los transportadores tipo SWEET en la planta.



V. HIPÓTESIS

Al ser *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum* organismos que demandan a la planta de carbohidratos para su crecimiento, a pesar de tener interacciones con las plantas distintas, patogénica y benéfica, respectivamente, ambos inducirán un aumento en la expresión génica del transportador tipo SWEET en las hojas.



VI. OBJETIVO GENERAL

Identificar a un transportador SWEET de maíz y determinar el efecto en su expresión en plántulas de maíz infectadas con *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*, solos o en combinación.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar al menos un transportador de carbohidratos tipo SWEET en maíz, a partir del BLAST de su genoma con una secuencia codificante para un SWEET inducido por patógeno en Arabidopsis.
2. Clonar el gen del transportador de azúcares tipo SWEET.
3. Expresar heterológamente al transportador tipo SWEET identificado en el maíz.
4. Cuantificar el nivel de expresión del transportador de carbohidratos tipo SWEET en hojas de plantas sin infectar y en hojas de plantas infectadas con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*, por separado y con ambos hongos.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para responder a los objetivos planteados, se siguió la estrategia experimental resumida en la Figura 8, la cual comprendió I) La búsqueda mediante el análisis bioinformático de una secuencia tipo SWEET en maíz similar a la regulada por microorganismos en Arabidopsis, II) La clonación del posible gen SWEET, III) La expresión heteróloga del gen de maíz para el transportador de azúcares tipo SWEET en células HEK293 para corroborar que la proteína se expresa en la membrana y IV) La medida de los niveles de expresión del transportador putativo SWEET en hojas de plántulas de maíz sometidas a biopriming con *T. asperellum* y retadas o no con el patógeno de maíz, *F. verticillioides*.

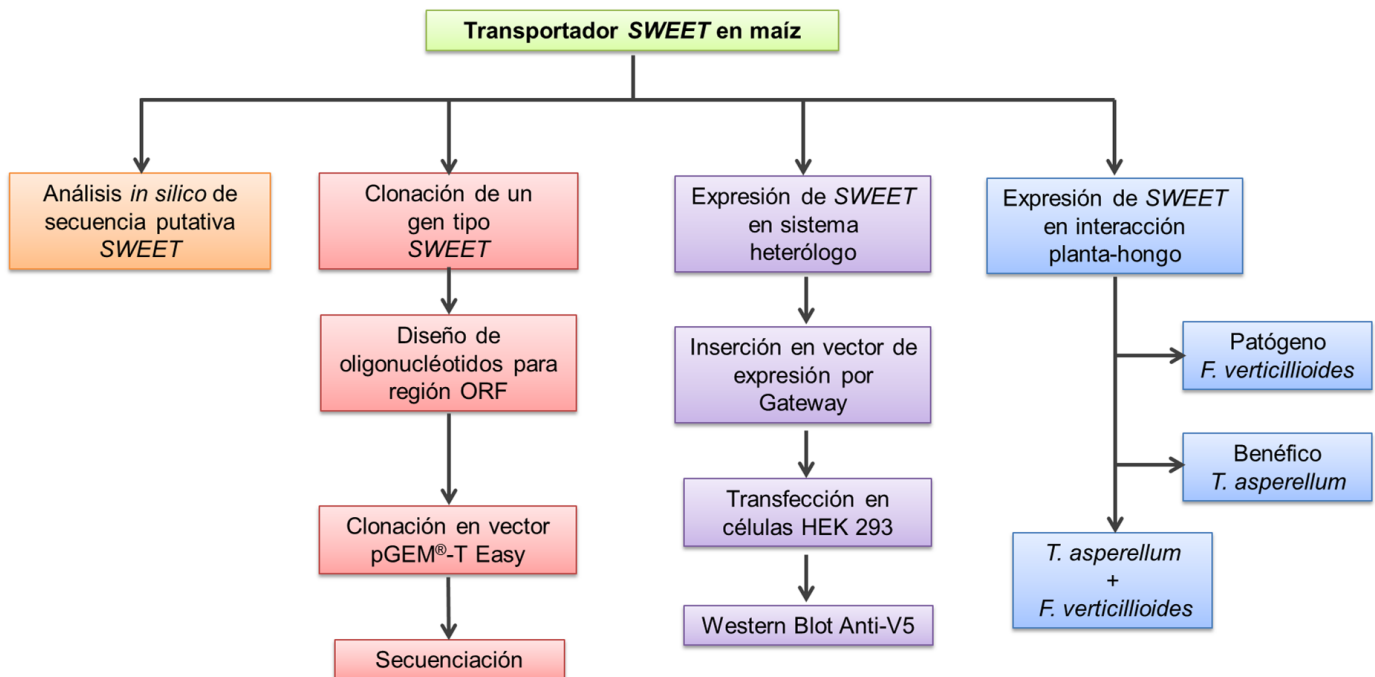


Figura 8.- Diseño general de la estrategia experimental. La estrategia general del trabajo se conformó de cuatro partes, los detalles se describen en el texto.



VIII.1 Búsqueda de la proteína tipo SWEET en maíz

Para identificar a un transportador SWEET regulado por patógenos en maíz, se realizó una búsqueda de homólogos de la secuencia de cDNA *AtSWEET12*, de *A. thaliana* (con número de acceso NM_122271.2) que codifica para un SWEET ya caracterizado de *Arabidopsis* y que se sobreexpresa ante el ataque por los patógenos *P. syringae* y *G. cichoracearum* (Chen *et al.*, 2010), en el genoma de maíz obtenido de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Al realizar el BLAST se obtuvieron 10 secuencias con un porcentaje de identidad igual o mayor al 60%, de estas secuencias se eligieron seis por tener una cobertura mayor al 40% y se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de ellas, a los cuales se les denominó *ZmSWEET α* , *ZmSWEET β* , *ZmSWEET γ* , *ZmSWEET δ* , *ZmSWEET ϵ* y *ZmSWEET κ* (Tabla 2). Con estos oligonucleótidos se realizó RT-PCR punto final a partir de RNA total de hojas de plántulas de maíz de nueve días de crecimiento para verificar su amplificación.

VIII.2 Amplificación de las secuencias dirigidas a SWEET por RT-PCR

Para evaluar la amplificación de los oligonucleótidos diseñados, se extrajo RNA de hojas de maíz con 9 días de crecimiento y se le retrotranscribió a cDNA para posteriormente llevar a cabo la PCR punto final. A continuación se detallan las técnicas empleadas.



Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados y empleados para la amplificación de los transcritos del transportador putativo SWEET

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud esperada del fragmento amplificado (pb)
SWEETα Número de acceso NM_001155615.1	Sentido	5'-CGAGACCATCTACGTCGTCA-3'	232
	Antisentido	5'-CGTCTGGATCACTCGTCTCA-3'	
SWEETβ Número de acceso NM_001147634.1	Sentido	5'-CCTCTTCAAGGGTGACAAGC-3'	223
	Antisentido	5'-GAAGCCAAGGATGTTTGGAA-3'	
SWEETγ Número de acceso NM_001148182.1	Sentido	5'-CTACGTGGTAGCGCTGTTCA-3'	250
	Antisentido	5'-AACGCGCTTACTACCCTTGA-3'	
SWEETδ Número de acceso NM_001137817.1	Sentido	5'-ACATCGCCATGTACCTCCTC-3'	184
	Antisentido	5'-ACGAAGACGCTAACGGAGAA-3'	
SWEETϵ Número de acceso NM_001139364.1	Sentido	5'-AAATGGCTGGCCTGTCTCTA-3'	225
	Antisentido	5'-TGATGAGCAGGAACCTCGTTG-3'	
SWEETκ Número de acceso NM_001143456.1	Sentido	5'-ATTCTTGGTCACCCTTGCAC-3'	166
	Antisentido	5'-GGTGTGATGGAGAGGAGGA-3'	

VIII.2.1 Extracción de RNA por el método del trizol

Para la extracción de RNA por el método del Trizol (Barrón, 1997), se colocaron 0.5-0.6 g de tejido en un mortero libre de RNAsas, pulverizándolo con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino; posteriormente se agregaron 2 mL de Trizol y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Al concluir este tiempo, las muestras se transfirieron a un tubo de microfuga y fueron centrifugadas a 13,000 rpm (16,000 x g) por 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 200 μ L de FCI (Fenol: cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1). Después de agitar se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 10 min a 4°C y se separó la fase acuosa; a esta fase se le agregaron 400 μ L de CHCl₃ y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm (16,000 x g) por 5 min a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de



isopropanol, se mezcló en el vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) durante 10 min a 4°C y se decantó para lavar el botón con 1 mL de etanol al 70%. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 5 min a 4°C, se decantó y secó a temperatura ambiente. El botón se disolvió en 500 µL de H₂O DEPC y se le agregaron 167 µL de LiCl 8 M frío. La muestra se incubó por una noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 15 min a 4 °C y el botón se disolvió en 250 µL de H₂O DEPC, 500 µL de etanol absoluto frío y 25 µL de acetato de sodio 3 M. La muestra se incubó por una noche a -70°C.

Transcurrida la incubación, se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 20 min a 4°C y se realizaron dos lavados al botón con 1 mL de etanol al 70%; de nuevo se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 1 minuto a 4°C; el etanol residual fue eliminado y el botón se secó a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente el botón se resuspendió en 40 µL de H₂O DEPC y se diluyó (1:50) para cuantificar el RNA total.

VIII.2.2 Reacción RT-PCR (Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa).

Se llevó a cabo la reacción de transcriptasa reversa con el RNA extraído, y posteriormente la PCR punto final con cada uno de los oligonucleótidos mostrados en la tabla 2 para corroborar su amplificación. A continuación se detalla la reacción:

Reacción RT (Transcriptasa reversa). En un tubo de microfuga se agregó 1 µL de OligodT (20 µM), el volumen de RNA ajustado a la misma concentración para todas las muestras, y se completó con H₂O DEPC a 10 µL. Este tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA. Al finalizar el tiempo, se colocó en hielo por 5 min y se le agregaron 10 µL de la mezcla de reacción mostrada en la tabla 3; entonces se calentó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento, a 42°C por 1 h y por último a 70°C por 15 min para



inactivar a la enzima. Esto se realizó en el Termociclador 2720 ThermalCycler Applied Biosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla 3.- Mezcla de reacción empleada en la reacción de Transcriptasa Reversa

Reactivo	Volumen (μL)
Buffer ImProm-II 5X (Promega)	4.0
MgCl_2 25 Mm	2.4
dNTP's 10mM	1.0
RT (Transcriptasa reversa)	1.0
$\text{H}_2\text{O-DEPC}$	1.6

Reacción de PCR punto final. Para la PCR se mezclaron $12.5 \mu\text{L}$ de PCR Buffer Master Mix 2X, $0.25 \mu\text{L}$ de cada oligonucleótido ($20\mu\text{M}$), $1 \mu\text{L}$ de cDNA como templado y H_2O libre de DNAsas (c.b.p. $25 \mu\text{L}$). En la tabla 4 se muestran las condiciones con las que se llevó a cabo la PCR para cada uno de los oligonucleótidos.

Tabla 4. Condiciones empleadas para PCR de las secuencias elegidas como SWEET

Número de ciclos	Pre-desnaturalización	Amplificación PCR	Extensión final
38 ciclos	$94^{\circ}\text{C}/5 \text{ min}$	Desnaturalización, $94^{\circ}\text{C}/40 \text{ seg}$ Alineamiento $57^{\circ}\text{C}/60 \text{ seg}$ Extensión, $72^{\circ}\text{C}/40 \text{ seg}$	$72^{\circ}\text{C}/7 \text{ min}$

Cada reacción de PCR finalizó con $25 \mu\text{L}$, a los cuales se les agregó $4.0 \mu\text{L}$ de amortiguador de carga Blue/Orange 6X y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio (0.5 mg/mL).



VIII.3 Clonación parcial de *ZmSWEET* α y *ZmSWEET* γ

Se decidió clonar parcialmente dos de las secuencias putativas SWEET. Los productos amplificados fueron contra una región de *ZmSWEET* α y *ZmSWEET* γ , para verificar que estas secuencias correspondieran a un SWEET. Para esto, se purificó el producto amplificado por PCR del gel de agarosa (Véase Anexo I) y se ligó en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega).

VIII.3.1 Ligación en pGEM[®]-T Easy y transformación

Las clonas parciales *ZmSWEET* α y *ZmSWEET* γ se ligaron en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega), el cual presenta una adición de timidina en ambos extremos del sitio de inserción, compatible con los productos de PCR generados por las polimerasas termoestables que agregan desoxiadenosina al extremo 3' del fragmento amplificado.

Para la reacción de ligación se agregaron 25 ng del producto purificado de PCR y la mezcla de reacción que se muestra en la tabla 5; se agitó y se incubó por 14 h a 4°C.

Tabla 5. Mezcla por reacción para ligación

Reactivo	Volumen (μ L)
Rapid ligation Buffer 2X	5.0
Plásmido pGEM [®] -T	1.0
T4 DNA ligasa (3U/ μ L)	1.0
H ₂ O libre de DNAsas	c.b.p. 10 μ L

Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5 α (véase Anexo II). Para la selección de las colonias transformantes, se sembraron 50 μ L de bacterias transformadas en cajas con medio LB ampicilina/IPTG/X-GAL. Las cajas se incubaron por 24 h y se seleccionaron las colonias de color blanco, que contienen al plásmido con el inserto. Posteriormente se purificó el plásmido con el Kit



Zyppy™ Plasmid Miniprep (veáse Anexo III) para su secuenciación. Además, previo a la secuenciación se verificó que las células transformantes contuvieran al inserto mediante un ensayo de restricción con EcoR1.

VIII.3.2 Secuenciación

La secuenciación del DNA plasmídico la realizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por el método de terminación de cadena con didesoxinucleótidos empleando el cebador universal T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'). El producto se resolvió en un secuenciador automático AB1PRISM 310 (Perkin Elmer).

VIII.4 Análisis *in silico* para establecer la estructura más probable de ZmSWEET α

Se llevó a cabo un análisis *in silico* para predecir la posible estructura y topología en la membrana de ZmSWEET α . Este análisis se realizó con los programas disponibles en línea que se enlistan en la tabla 6. Además también se analizó la presencia de motivos de glicina (GXXXG), cinturón aromático y la existencia de prolina conservadas:



Tabla 6. Programas bioinformáticos empleados para el análisis *in silico*

Herramienta(s) Bioinformática	Predicción
TBBpred	Regiones de Barril Beta transmembranales
GOR Porter SOPMA Scratch PP PSIpred	Estructura secundaria
DAS TopPred HMMPRED SOSUI TMHMM TMpred TOPCONS	Hélices transmembranales
OCTOPUS TMHMM PHOBIUS	Topología
EMBOSS:PEPWHEEL	Interacción proteína-proteína, proteína-lípido

Motivos de glicina.- La presencia de dominios de glicina pudiera evidenciar interacciones de los cruces transmembranales que presentan este dominio. Los dominios clásicos de glicina cumplen con la secuencia GXXXGXXXG en la cual las glicinas se encuentran separadas por tres aminoácidos diferentes a la glicina. Además, el primer y tercer aminoácido pueden ser diferentes a glicina siempre y cuando la estructura contenga al menos dos glicinas contando a la glicina central, que siempre debe estar presente (Kim *et al.*, 2005).

Cinturón aromático.- La presencia de residuos de aminoácidos aromáticos en los extremos de los cruces transmembranales indican una posible interacción de estos residuos con las cabezas de los fosfolípidos.



Prolinas conservadas.- La presencia de este aminoácido dentro de los cruces transmembranales sugiere una interrupción de la hélice y, de encontrarse en los extremos, es probable que determine el fin de la hélice transmembranal. Para saber si existían prolinas conservadas, se realizó un alineamiento entre secuencias de diferentes especies en CLUSTALW. Debido a que la proteína SWEET sólo se ha estudiado en Arabidopsis, arroz (*O. sativa*) y *M. truncatula*, se decidió incluir en el alineamiento las secuencias de uva (*V. vinífera*) y soya (*G. max*), definidas en la base de datos del NCBI como “parecidas o tipo” MTN3. El número de acceso de las secuencias elegidas se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Número de acceso y residuos de aminoácidos de las secuencias alineadas para buscar prolinas conservadas

Especie	Número de acceso	Número de residuos de aminoácidos
<i>Zea mays</i>	ACG34136.1	302
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190443.1	289
<i>Medicago truncatula</i>	CAA69976.1	268
<i>Oryza sativa</i>	NP_001062354.1	307
<i>Vitis vinífera</i>	XP_002265836.1	248
<i>Glycine max</i>	XP_003526670.1	247

VIII.5 Clonación región ORF gen *ZmSWEET α*

Se realizó la clonación y secuenciación de *ZmSWEET α* . Para esto, se diseñaron oligonucleóticos específicos sobre las regiones UTR del gen (Tabla 8) y se realizó PCR empleando la Polimerasa Advantage HD, la cual ofrece una alta fidelidad (12 errores por cada 250,000 pb), además de alta sensibilidad y especificidad.



Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para amplificar la región ORF de *ZmSWEETα*.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud del fragmento amplificado (pb)
UTRSWEETα No acceso NM_001155615.1	Sentido	5'-AGAGTTTGAGCCAACACACACA -3'	1324
	Antisentido	5'-CTTCATCGTTCTGGCCTCTG-3'	

Se empleó la mezcla de reacción contenida en la tabla 9 bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial por 2 min a 98°C, 30 ciclos a 98°C por 10 s, 55°C por 5 s y 72°C por 2 min y, por último una extensión final a 72°C por 10 min.

Tabla 9. Mezcla por reacción para PCR con Polimerasa Advantage HD

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer Advantage HD 5X	5
Mezcla de dNTP (2.5mM)	2
Oligonucleótido sentido 20 µM	0.3
Oligonucleótido antisentido 20 µM	0.3
cDNA	1.0
Advantage HD Polymerase	0.25
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 25 µL)	16.15

El producto de PCR se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Posteriormente se purificó del gel (véase Anexo I) y previo a la ligación en el vector pGEM®-T Easy (Promega) se le adicionó una adenina, ya que la Polimerasa Advantage HD no genera adenilaciones en los extremos, necesarias para la ligación en este vector.

La extensión de adenina se generó mezclando 7 µL del fragmento de PCR purificado, 1 µL de amortiguador de reacción Taq DNA Polimerasa con MgCl₂,



dATP 0.2 mM [final], 5 unidades de Taq DNA Polimerasa y H₂O desionizada estéril c.b.p. 10 µL. La mezcla se incubó a 70°C por 30 min.

Este producto se ligó en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega). Posteriormente el plásmido se transformó en células de *E. coli* DH5α y se purificó con el Kit Zyppy Plasmid Miniprep (véase Anexo II y III), para posteriormente secuenciar. La secuenciación de la región ORF de *ZmSWEETα* se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Por tratarse de una secuencia con más de 700 pb (1324 pb) la secuenciación se realizó en ambos sentidos empleando los cebadores universales T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y m13/pUC Reverse (5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3').

VIII.6 Expresión heteróloga de *ZmSWEETα* en células HEK293

VIII.6.1 Tecnología Gateway[®]

La Tecnología Gateway[®] es un método de clonación universal basada en el sistema de recombinación sitio específica del bacteriófago lambda que facilita la integración de su genoma en el cromosoma de *E. coli* y el cambio entre las vías lisogénica y lítica. En la tecnología Gateway[®] los componentes del sistema de recombinación se modifican para mejorar la especificidad y eficiencia del sistema (Gateway[®], 2003).

La recombinación involucra dos componentes principales: Las secuencias de DNA de recombinación (sitios *att*) y las proteínas que median la reacción de recombinación. La recombinación ocurre entre regiones específicas y homólogas de acoplamiento de 15 pb (*att*); sin embargo, las secuencias vecinas son requeridas ya que ellas contienen sitios de unión para las proteínas de recombinación. Se le conoce como sitio *attB* a la secuencia en el cromosoma de *E. coli* y *attP* a la del cromosoma de lambda. Una vez que la integración y

recombinación ocurre entre *attB* y *attP* se da origen a sitios *attL* y *attR* (Gateway®, 2003). Dos reacciones de recombinación constituyen las bases de la tecnología Gateway® (Figura 9):

Reacción BP: Facilita la recombinación de un sustrato *attB* (por ejemplo un producto de PCR) con un sustrato *attP* (vector donador) para crear una clona de entrada *attL*. Esta reacción es catalizada por la mezcla de enzimas BP Clonasa™.

Reacción LR: Facilita la recombinación de un sustrato *attL* (clona de entrada) con un sustrato *attR* (vector destino) para crear una clona de expresión *attB*. Esta reacción es catalizada por la mezcla de enzimas LR Clonasa™ (Gateway®, 2003).

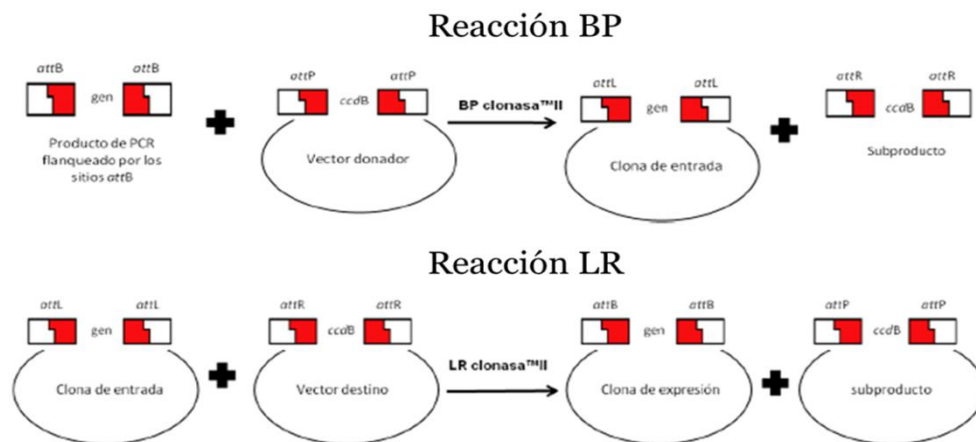


Figura 9.- Reacciones efectuadas en la Tecnología Gateway®. En la reacción BP se introduce el producto de PCR en un vector donador por recombinación de los sitios *att*. En la reacción LR, la clona de entrada de la reacción anterior es introducida en un vector destino el cual puede ser de expresión (Tomado y modificado de Gateway®, 2003).

VIII.6.2 Generación de sitios *att* en el producto de PCR

Se obtuvo la secuencia de la región codificante de *ZmSWEETα* unida a sitios *att* para su introducción en el vector donador, para esto, y debido al tamaño de los sitios *att*, el acoplamiento se realizó en dos rondas de PCR, por lo cual se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos.



En la primera ronda se incluyó el primer juego de oligonucleótidos, los cuales contaron con una región específica y homóloga a los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen de interés, y además contenían una parte de la secuencia *attB* (Tabla 10). Cabe mencionar que en la secuencia antisentido se eliminó el codón de paro, pues como se describe más adelante, el vector de expresión en el que se introdujo la región codificante de *ZmSWEETα* incluye el epítipo V5 para ser detectada por anticuerpo. Para esta ronda se empleó como templado el DNA recombinante obtenido al clonar la región ORF de *ZmSWEETα* en pGEM®-T Easy. El producto de esta reacción se observó en gel de agarosa al 0.7%.

Tabla 10. Oligonucleótidos empleados para agregar sitios *att* a la región ORF de *ZmSWEETα*. En negritas se muestra la secuencia de los sitios *att*, en rojo y subrayado el codón de inicio y en verde la sustitución de una C por una A para eliminar el codón de paro.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud del fragmento amplificado (pb)
Primera ronda	Sentido	5' - AA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC <u>ATG</u> GCT GGC ATG TCT CTG C -3'	951
	Antisentido	5' - A GAA AGC TGG GTG <u>ATA</u> TGC CAC GTG GAC GGC -3'	
Segunda ronda	Sentido	5' - G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC-3'	985
	Antisentido	5' - GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3'	
Longitud de la región codificante: 909 pb			

Para la segunda ronda de PCR se empleó el segundo juego de oligonucleótidos (Tabla 10), los cuales se componían del resto de la secuencia *att* más una región complementaria a los oligonucleótidos de la primera ronda, generando de esta manera la región completa de los sitios *att* unidos a la secuencia codificante de *ZmSWEETα* (*attB-ZmSweetα-attB*). Como templado se empleó el producto de



PCR de la primera ronda purificado del gel mediante el Kit MinElute Gel Extraction (véase Anexo I). Para ambas rondas de PCR se empleó la enzima Advantage HD Polimerasa con la mezcla de reacción mostrada en la Tabla 11 bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: 2 min a 98°C, 30 ciclos: 98°C por 10 s, 55°C por 5 s y 72°C por 2 min, extensión final a 72°C por 10 min.

Tabla 11. Mezcla por reacción para PCR con Advantage HD Polimerasa

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer Advantage HD 5X	5
Mezcla de dNTP (2.5mM)	2
Oligonucleótido sentido (10 µM)	0.3
Oligonucleótido antisentido (10 µM)	0.3
Templado	200 ng
Advantage HD Polymerase	0.25
H ₂ O libre de DNAsas	(c.b.p. 25 µL)

El producto de PCR de la segunda ronda se visualizó en gel de agarosa al 0.7% y posteriormente se purificó del gel mediante el Kit MinElute Gel Extraction (véase Anexo I).

VIII.6.3 Introducción de la secuencia *attB-ZmSweetα-attB* en el vector donador pDONR™221

Una vez purificado el producto de PCR *attB-ZmSweetα-attB* se procedió a insertarlo en el vector donador pDONR™221, para lo cual se colocaron 100 femtomoles (fmol) del producto de PCR, 300 ng del vector pDONR™221, 4 µL de amortiguador 5X BP Clonasa, y amortiguador TE (pH 8.0) c.b.p. 16 µL. Estos componentes se mezclaron y posteriormente se agregaron 4 µL de la mezcla de enzimas BP Clonasa™ II. La reacción se incubó por 14 h a 25°C y pasado este tiempo se inactivó la enzima con 1 µL de proteinasa K, incubando por 10 min/37°C. Para saber la cantidad de producto de PCR empleada en la reacción se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Producto de PCR (ng)} = (\text{fmol})(N) \left(\frac{660 \text{fg}}{\text{fmol}} \right) \left(\frac{1 \text{ng}}{10^6 \text{fg}} \right)$$

Donde N , es el tamaño en pares de bases del producto de PCR.

De la reacción anterior se tomaron 5 μL para transformar células de *E. coli* DH5 α (véase anexo II), empleando como medio de selección Agar LB/kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$). De las bacterias aisladas en este medio, se tomaron 15 y con una punta estéril se sembró la misma colonia tanto en Agar LB/kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) como en Agar LB/cloranfenicol (30 $\mu\text{g/mL}$). El vector pDONRTM221 presenta resistencia a kanamicina y cloranfenicol; sin embargo, al efectuarse la Reacción BP, la resistencia a cloranfenicol se pierde (Figura 10). Por tanto, las bacterias que crecieron en Kanamicina pero no en cloranfenicol, son las que transfirieron la secuencia *ZmSWEET α* al vector de entrada, formando la clona de entrada *attL-ZmSweeta-attL*. Se tomaron dos de estas colonias para aislar su plásmido y secuenciar para comprobar la recombinación y verificar que el marco de lectura no hubiera sufrido alteraciones.

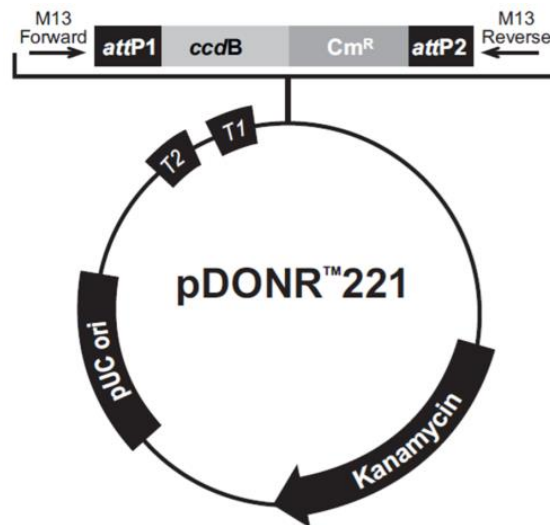


Figura 10.- Vector pDONRTM221. El vector presenta dos marcadores de resistencia, uno a kanamicina y otro para cloranfenicol (Cm^{R}), al realizarse la Reacción BP, se sustituye tanto el gen *ccdB* como la resistencia a cloranfenicol por el gen de interés (*ZmSweeta*) flanqueada por los sitios *att*. (Tomado y modificado de Gateway®, 2012).



VIII.6.4 Introducción de la secuencia *attL-ZmSweet α -attL* en el vector de expresión pcDNA™3.2/V5-DEST

La clona de entrada purificada obtenida por la reacción de recombinación BP se empleó para transferir a *ZmSWEET α* del vector pDONR™221 al vector de expresión pcDNA™3.2/V5-DEST. Para lo cual se colocó en un tubo de 1.5 mL, 150 ng de la clona de entrada, 1 μ L del vector de expresión (150 ng/ μ L) y amortiguador TE (pH 8.0) c.b.p. 8 μ L. Estos componentes se mezclaron y posteriormente se agregó 1.5 μ L de la enzima LR Clonasa™ II. La reacción se incubó por 14 h a 25°C y transcurrido este tiempo se inactivó la enzima con 1 μ L de proteinasa K incubando por 10 min a 37°C.

De la reacción anterior se tomó 1 μ L (300ng) y se transformó en células de *E. coli* DH5 α , empleando como medio de selección agar LB/ampicilina (100 μ g/mL). De las bacterias aisladas en este medio, se tomaron 16 y con una punta estéril se sembró la misma colonia tanto en agar LB/ampicilina (100 μ g/mL) como en agar LB/cloranfenicol (30 μ g/mL). Debido a que este vector de expresión presenta resistencia a ampicilina y cloranfenicol y que al efectuarse la reacción de recombinación la resistencia a cloranfenicol se pierde (Figura 11), se tomaron dos de las bacterias que crecieron en ampicilina pero no en cloranfenicol. El plásmido fue purificado para llevar a cabo su transfección en células HEK293.

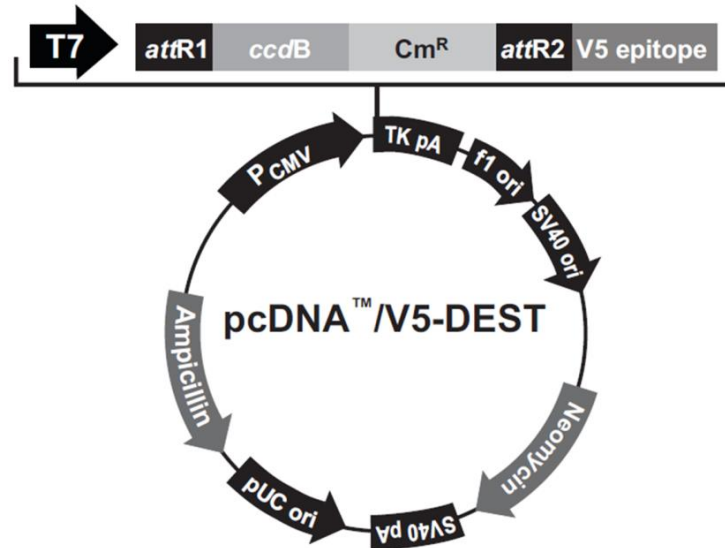


Figura 11.- Vector pcDNA™/V5-DEST. Este vector presenta dos resistencias, una a ampicilina y una a cloranfenicol (Cm^R), al realizarse la reacción BP, se sustituye tanto el gen *ccdB* como la resistencia a cloranfenicol por el gen de interés (*ZmSweetα*) flanqueada por los sitios *att*. Así mismo, al eliminar el condón de paro del inserto, se obtiene una fusión con el epítipo V5. (Tomado y modificado de Gateway®, 2010).

VIII.6.5 Transfección a células HEK293.

Se realizó una transfección transitoria vía jetPEI[®] (polietilenimina) en la línea celular de riñón HEK293. jetPEI[®] compacta el DNA en partículas cargadas positivamente capaces de interactuar con proteoglicanos de la superficie celular. Para la transfección se emplearon cajas con células al 70% de confluencia. Para cada cultivo se prepararon dos mezclas de reacción por separado, la **mezcla 1** contuvo 100 µL de NaCl 150 mM y el plásmido recombinante; la **mezcla 2** contuvo 100 µL de NaCl 150 mM y 3µL de jetPEI[™]. La mezcla 2 (Solución con jetPEI[™]) se agregó a la mezcla 1 (Solución con DNA) y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó la mezcla anterior (jetPEI[™]/DNA) por goteo a las cajas con células HEK298, a las cuales previamente se les añadió 1.8 mL de medio nutritivo. Las cajas se incubaron a 37°C/48 h con CO₂ al 5%, cambiando el medio de cultivo a las 24 h.



VIII.6.6 Estandarización de la transfección.

Para evaluar si la transfección ocurría de manera satisfactoria, se transfectaron 3 cantidades de DNA diferentes (250, 500 y 1000 ng) como se describió previamente. Transcurridas las 48 h, se les eliminó el medio de cultivo a las células y se lavaron 2 veces con amortiguador TBS 1X. Luego se les agregó solución de lisis (Tris-HCl pH=8 50mM, NaCl 150 mM, Tritón-100x 1%, NaF 2.5 mM e inhibidor de proteasas Complete™ 1X) y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford, usando IgG como estándar para posteriormente detectar a la proteína mediante Western Blot.

VIII.6.7 Expresión de ZmSWEET α en la fracción microsomal.

Para determinar si la proteína ZmSWEET α se encontraba en la membrana, se realizó una nueva transfección con la concentración estandarizada a 500 ng de plásmido. Posteriormente se realizó un fraccionamiento subcelular, para lo cual se agregaron a las células 500 μ L de amortiguador (Sacarosa 250 mM, HEPES (7.4) 20 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y, se agregó al momento de usar, DTT 1 mM e inhibidor de proteasas Complete™) y se transfirieron a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente las células se tomaron con una jeringa, se pasaron por lo menos 10 veces a través de una aguja 25 G para lisarlas y se dejaron en hielo por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 40,000 rpm durante una hora. El botón obtenido se empleó para realizar la detección de la proteína mediante Western Blot.

VIII.6.8 Determinación de la expresión del SWEET mediante Western Blot.

Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS al 12% (Laemmli, 1970). Posteriormente a la separación de las proteínas en el gel, se transfirieron las proteínas a una membrana de polividildifenidol (PVDF) mediante una sistema de transferencia húmeda en amortiguador de transferencia (15 mL NaPO₄ 1 M pH 6.8, 2.5 mL SDS 20%, 200 mL MeOH, 787.5 mL de H₂O).



Una vez completada la transferencia, la membrana de PVDF se lavó 2 veces durante 5 min con TTB₂S (TB₂S + Tween-20 0.1%) y una vez más por 5 min con TB₂S (Tris pH 9.5 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM), posteriormente se bloqueó 1 h con 2% de leche en TB₂S con agitación rotatoria y constante a temperatura ambiente, nuevamente se realizaron tres lavados como se describió anteriormente y se incubó por 1 h en agitación rotatoria y constante con el anticuerpo primario que se encuentra conjugado a la enzima peroxidasa de rábano, anti-V5-HRP (Invitrogen™) diluido 1:5000 con TTB₂S (TB₂S + Tween-20 0.05%) y adicionado con leche 1%. Concluido el tiempo de incubación se lavó tres veces más. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia con H₂O₂ y Luminol (Millipore).

VIII.7 Determinación de la expresión de *ZmSWEETα* en el sistema *T. asperellum*-maíz-*F. verticillioides*

VIII.7.1 Material biológico

VIII.7.1.1 Inóculos de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Se siguió el protocolo de Guzmán-Chávez (2013). Brevemente, en condiciones de esterilidad, se agregaron 5 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *T. asperellum* o *F. verticillioides* de 2 y 4 semanas de crecimiento, respectivamente, sembrados en una caja Petri con medio PDA 1X. Dicha caja se colocó en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente y se recolectó la suspensión formada, la cual se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) durante 15 min a 4°C en una centrífuga Universal 320 Hettich Zentrifugen.

Se eliminaron tres cuartas partes del sobrenadante, se resuspendieron los botones obtenidos y se juntaron las suspensiones de los botones en un solo microtubo, obteniéndose así una suspensión más concentrada. Nuevamente se



centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de agua estéril desionizada.

De la solución anterior se realizó una dilución 1µL/1000 µL para los conidios de *T. asperellum* y de 1µL/10 µL para los de *F. verticillioides*. De esta solución se tomaron 10 µL para cargar la Cámara de Neubauer y realizar el conteo en cada uno de los cuadrantes con el microscopio óptico Olympus CH30. Con los datos obtenidos se calculó el volumen necesario de la suspensión concentrada de conidios para preparar un inóculo de 6×10^3 conidios/µL en el caso de *F. verticillioides* y 1×10^3 conidios/mL en el caso de *T. asperellum*.

Finalmente, para mantener a los hongos, se sembraron 10 µL de la suspensión concentrada de conidios en cajas Petri con PDA 1X. Todo el material en contacto con los hongos se colocó en hipoclorito de sodio comercial por una noche.

VIII.7.1.2 Plántulas de maíz

Se utilizaron hojas de plántulas de maíz (*Zea mays*) crecidas bajo las siguientes condiciones:

- **Control.-** Se lavaron 200 semillas de maíz con 200 mL de hipoclorito de sodio comercial al 2% y se enjuagaron con agua estéril desionizada hasta desaparecer el olor a cloro. Una vez desinfectadas las semillas, se germinaron por 2 días a 29°C en agar 1%.
- **Tratamiento con *Trichoderma asperellum*.-** Al igual que en el tratamiento control, las semillas se lavaron con 200 mL de hipoclorito de sodio comercial al 2%, y se enjuagaron con agua estéril desionizada. Se colocaron las semillas en agitación durante 1.5 h con una solución de 1×10^3 conidios de *Trichoderma asperellum*/mL. Las semillas inoculadas se germinaron durante 2 días a 29°C en agar 1%.



Una vez cumplidos los 2 días de germinación para ambos tratamientos, las semillas se transfirieron a Peat moss (PREMIER®) y se dejaron en crecimiento durante 7 días. Transcurridos los 7 días, las plántulas de cada tratamiento se separaron en tres lotes de 5 plántulas cada uno:

- A) LOTE CONTROL. Plántulas sin manipular.
- B) LOTE INFILTRADO CON AGUA. Las plántulas se infiltraron con 10 μ L de agua estéril desionizada.
- C) LOTE INFECTADO CON *Fusarium verticillioides*. Las plántulas se infiltraron con 6.5×10^4 conidios de *F. verticillioides*.

En total se generaron 6 lotes de plantas para cada tiempo a evaluar, de los cuales se obtuvieron las hojas a los días 1, 2, 4 y 5 post-infección con *F. verticillioides* para realizar la extracción de RNA y posteriormente evaluar la expresión del SWEET (Figura 12).

VIII.7.2 Extracción, cuantificación y calibración de RNA.

Se extrajo RNA de las hojas de cada tratamiento por el método del Trizol (Barrón, 1997), según se mencionó anteriormente. Una vez obtenido, el RNA se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 ThermoScientific. Para verificar la integridad del RNA, se corrió 1 μ g en geles de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) y bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Al volumen de RNA se le añadieron 2 μ L de amortiguador de carga (0.5% azul de bromofenol y 0.5% xilencianol) y H₂O-DEPC c.b.p. 8 μ L. El gel se corrió en una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT con TAE 1X a 85 mV por 35 min y se visualizó en un transiluminador de UV. Los volúmenes de RNA utilizados se ajustaron hasta obtener una cantidad de RNA similar en todas las muestras, para ayudar en la calibración de las bandas se realizó la densitometría mediante el software del equipo KODAK Image Station, modelo 400R-PRO. La cantidad de RNA calibrado se convirtió a cDNA por reacción de transcriptasa reversa siguiendo la metodología previamente mostrada en la sección VIII.2.2.

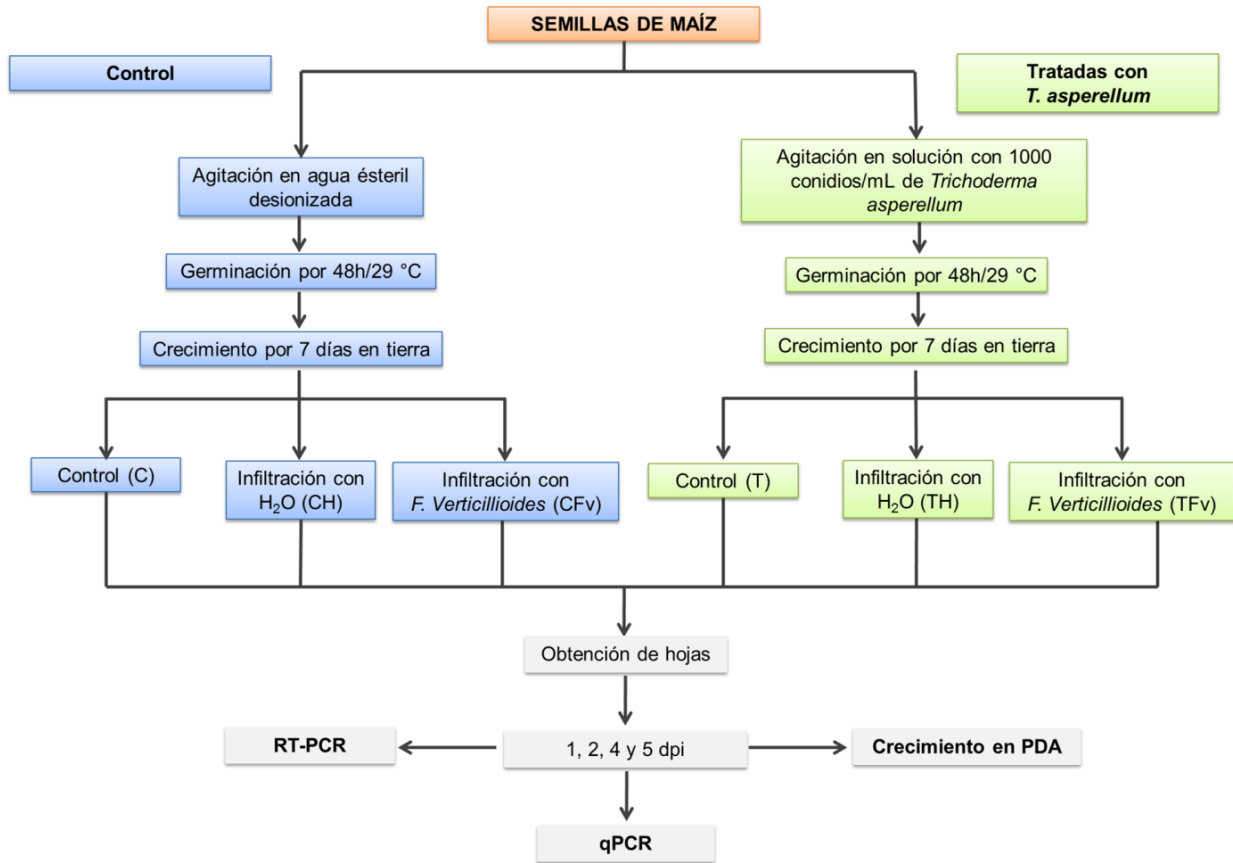


Figura 12. Tratamientos para evaluar la expresión de un SWEET de maíz durante la interacción Trichoderma-maíz-Fusarium. Se realizaron 3 siembras independientes con un número aproximado de 150 plantas por cada siembra. C= Control, CH=Infiltrado con agua, CFv= Infiltrado con *F. verticillioides*, T= Infectado con *T. asperellum*, TH= Infectado con *T. asperellum* e infiltrado con agua, TFv= Infectado con *T. asperellum* e infiltrado con *F. verticillioides*.

VIII.7.3 Reacción de qPCR

VIII.7.3.1 Estandarización de las condiciones para qPCR

Para cuantificar la expresión, se emplearon los oligonucleótidos de la tabla 12, empleando como gen endógeno *Ubiquitina* y *ZmSWEETα* como gen a evaluar. La cuantificación de los niveles de mensajeros de cada muestra de RNA se realizó por triplicado en un termociclador AppliedBiosystems 7500 Real-Time PCR System.



Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para la reacción de qPCR. Se evaluó la expresión de *ZmSWEETα*, ocupando como gen endógeno ubiquitina.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido
<i>ZmSWEETα</i> Número de acceso NM_001155615.1	Sentido	5'-TTCCAAACATCCTTGGCTTC-3'
	Antisentido	5'-GCTTCTGTAGCGCAGCTCTT-3'
Ubiquitina (Endógeno) (Zhang <i>et al.</i> , 2012)	Sentido	5'-ATCTTTGTGAAGACCCTCAC-3'
	Antisentido	5'-CCTAAGGCGCAGCACCAAGT-3'

Previo a la cuantificación se llevó a cabo la estandarización de la técnica, la cual consistió en: a) evaluar la especificidad y b) establecer la eficiencia del método.

a) Evaluación de la especificidad de la reacción. Análisis de los cebadores empleados para cada gen a amplificar con el fin de verificar que no formen dímeros ni productos inespecíficos. Se encontró un solo pico en la curva de disociación tanto para la secuencia de interés (*ZmSWEETα*) como para la secuencia empleada como gen endógeno (*Ubiquitina*), se observa que el pico máximo se ubica a la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción, por lo que ambos productos resultan específicos (Figura 13).

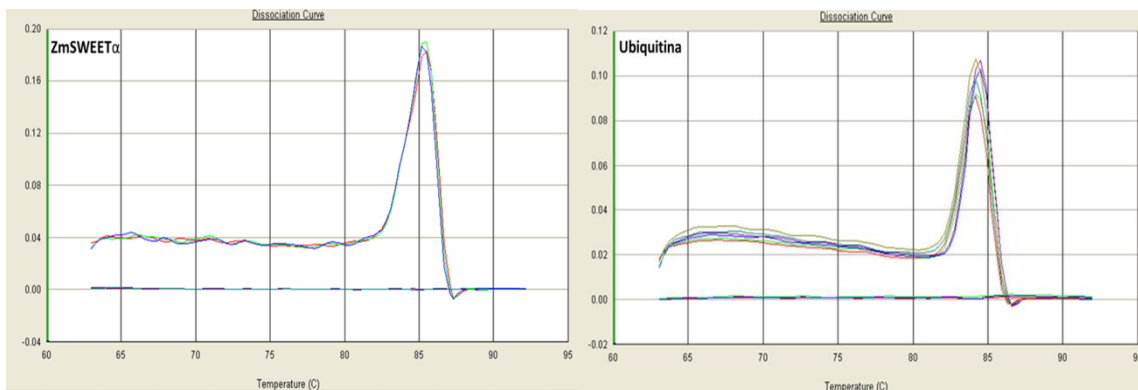


Figura 13. Curvas de disociación de los oligonucleótidos empleados para la detección de los genes *ZmSWEETα* y *Ubiquitina*.



b) Establecimiento de la eficiencia del método. El ensayo de PCR se validó mediante una curva estándar a partir de muestras de cDNA diluidas en serie, la cual se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada apareciera la curva típica de amplificación. La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido en serie), donde la pendiente debe ser cercana a -3.32, lo cual corresponde a una eficiencia de amplificación del 100%. La fórmula para calcular el % de eficiencia de amplificación (%E) es:

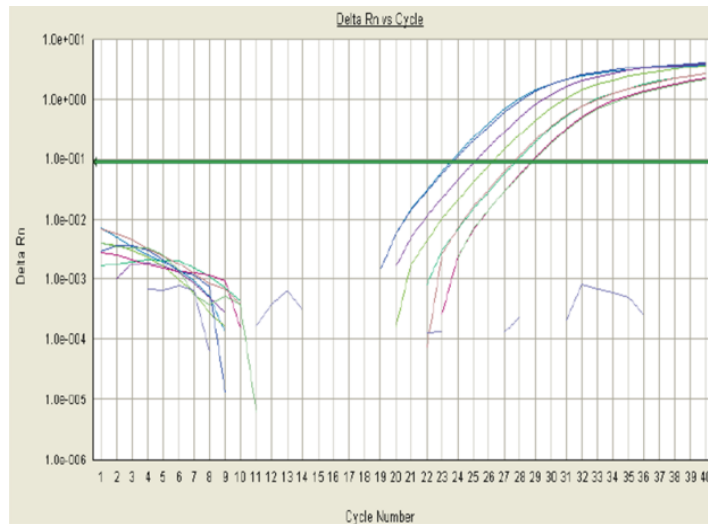
$$\%E = \left(\left[10^{-1/m} \right] - 1 \right) \times 100$$

Dónde:

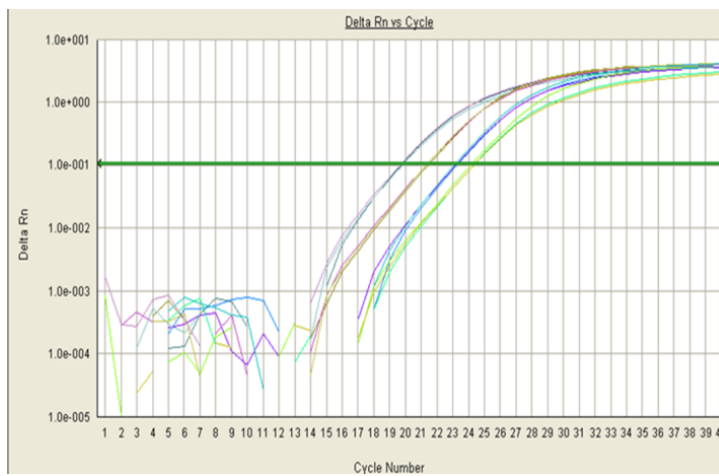
m= Pendiente de la curva Ct vs Log Concentración. Considerándose como aceptable una eficiencia mayor del 90.0%.

En la Figura 14 se muestra el %E obtenido para la amplificación de ZmSWEET α y ubiquitina. Cabe mencionar que en el laboratorio ya se había empleado a la ubiquitina como gen endógeno⁴ bajo las mismas condiciones y tratamientos de interacción planta-patógeno que se trabajaron en el presente proyecto (Guzmán-Chávez, 2013). En ese trabajo se realizaron diluciones seriadas de DNA provenientes de dos tejidos diferentes de maíz (embriones y hojas) verificando un valor similar de Ct, lo cual indica una expresión similar y a este gen como buen candidato para emplearse como gen “normalizador”.

⁴Gen cuya expresión se mantiene relativamente constante bajo las condiciones del ensayo.



UBQ
Threshold=0.0904
m= -3.4864
%E= 93.57



ZmSWEETα
Threshold=0.1079
m= -3.4824
%E= 93.71

Figura 14.- Curvas estándar de amplificación de los genes ZmSWEETα y Ubiquitina. Las concentraciones de cDNA empleadas fueron las generadas a partir de 1.0 µg de RNA. Cada curva corresponde a 5 concentraciones de cDNA obtenidas de las diluciones: 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. La dilución más pequeña se encuentra a la derecha de las curvas. Cada concentración se ensayó por duplicado.

VIII.7.3.2 Cuantificación de la expresión de ZmSWEETα por qPCR

La reacción de qPCR se realizó en un volumen final de 20 µL, la mezcla de reacción contuvo los reactivos mostrados en la Tabla 13.



Tabla 13. Mezcla para una reacción en la técnica de qPCR.

Reactivo	Volumen (μL)
SYBR Green PCR Master Mix	10.0
Oligonucleótido Sentido ($20\mu\text{M}$)	0.15
Oligonucleótido Antisentido ($20\mu\text{M}$)	0.15
cDNA	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. $20\mu\text{L}$)	7.7

Para realizar la cuantificación relativa se empleó el Método Comparativo Ct, el cual emplea la siguiente fórmula:

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

Donde:

$\Delta\text{Ct} = \text{Ct gen de interés}^5 - \text{Ct gen endógeno}$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra interés} - \Delta\text{Ct calibrador}^6$

VIII.8 Búsqueda de *T. asperellum* y *F. verticillioides* en las hojas de las plántulas tratadas

Para comprobar la posible movilización de los hongos desde el sitio de infección hasta partes superiores de la planta, se realizaron dos metodologías para corroborar la presencia de los hongos en las hojas. En la primera se tomaron hojas de cada uno de los tratamientos a los 5 días post-infiltración. Estas hojas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 2% y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Posteriormente se tomaron dos fragmentos de hoja y se colocaron en medio agar papa dextrosa (PDA). Las cajas con PDA se incubaron a temperatura ambiente por 7 días. La segunda metodología

⁵ El gen de interés es el templado proveniente del organismo bajo las condiciones de estudio establecidas.

⁶ Calibrador se refiere a la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las cuales se desea comparar las diferencias de expresión. En el ensayo se emplearon como calibrador las plántulas control (C) para cada tiempo.



corresponde a ensayos de PCR punto final a partir de DNA extraído de las cajas con PDA que mostraron crecimiento para verificar la especie de estos hongos.

VIII.8.1 Tinción con azul algodón lactofenol

En las cajas en las que se observó crecimiento de algún hongo, se realizó una tinción con azul algodón lactofenol, que permite teñir y conservar las estructuras propias del hongo (Bonifaz, 2010). La tinción se hizo mediante una impronta con cinta adhesiva transparente, la cual se colocó sobre un portaobjetos al que se le había depositado previamente una gota del colorante azul algodón lactofenol. La tinción se tapó con un cubreobjetos y se observó con el microscopio óptico Olympus CH30 con un objetivo de 40x.

VIII.8.2 Extracción de DNA de hongo y PCR punto final con oligos específicos para *T. asperellum* y *F. verticillioides*

Se extrajo el DNA de los hongos *T. asperellum* y *F. verticillioides*, así como de los hongos crecidos a partir de las hojas colocadas en PDA, para la amplificación por PCR de genes propios de su especie. Para esto, se extrajeron los conidios de cada hongo como se describió anteriormente (Sección VIII.7.1.1). De la solución concentrada resultante se tomaron 10 μ L, los cuales se inocularon en 25 mL de medio YGG y se incubaron por 24 h a temperatura ambiente. A las 24 h se cambió a un tubo nuevo estéril y se incubó por 24 h más. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron 10 mL del medio YGG con hongo a 3,500 rpm durante 5 min y se lavó el micelio con 15 mL de agua estéril; se centrifugó nuevamente a 3,500 rpm por 5 min. El micelio del botón resultante se resuspendió en 3 volúmenes de Buffer Test de lisis. Este volumen se colocó en un microtubo de 1.5 mL, al cual se le agregaron 4 perlas de vidrio y se agitó en vórtex durante 3 min. Posteriormente se congeló el tubo a -80°C por 10 min y se descongeló a 65°C durante 3 min, nuevamente se agitó en el vórtex durante 3 min y se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 5 min. Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de FCI y se mezcló. Se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g)/5 min y se colectó el sobrenadante. Se agregó un volumen de cloroformo y se mezcló,



posteriormente se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm (16,000 x g)/5 min y se colectó el sobrenadante, entonces se agregaron 2.5 volúmenes de EtOH 100% y se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g)/10 min. El botón se lavó con 500 µL de EtOH al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g)/2 min. Se descartó el EtOH y se dejó secar el botón, por último el botón se resuspendió en 100 µL de agua estéril desionizada. El DNA extraído se cuantificó y se realizó PCR punto final con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 14 y que tienen como blanco para amplificar a una secuencia específica de la especie *F. verticillioides* (Mulè *et al.*, 2004) y a una exo-β-1,3-glucanasa de *T. asperellum* (Marcello *et al.*, 2010).

Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para la identificación de los hongos *F. verticillioides* y *T. asperellum*.

Transcrito	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	Longitud del fragmento (pb)
VER (Mulè <i>et al.</i> , 2004)	Sentido	5'-CTTCCTGCGATGTTTCTCC-3'	578
	Antisentido	5'-AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA-3'	
tag83 (Marcello <i>et al.</i> , 2010)	Sentido	5'-CACGGCAGCAATTAACAATG-3'	264
	Antisentido	5'-GGGGTCGTTTCGGGTTATTAT-3'	

IX. RESULTADOS

IX.1 Búsqueda de la proteína tipo SWEET en maíz

Para identificar al menos un gen que codificara para una proteína tipo SWEET en maíz y que su expresión fuera regulada por microorganismos, se realizó un BLAST entre la secuencia del gen *AtSWEET12* de *A. thaliana* y el genoma de maíz. Se eligió a *AtSWEET12* porque estudios anteriores mostraron un incremento en su expresión cuando la planta es atacada por la bacteria y hongo patógenos *P. syringae* y *G. cichoracearum*, respectivamente (Chen *et al.*, 2010).

Se eligieron 6 secuencias de la base de datos de maíz que presentaban un porcentaje de identidad >60% con la secuencia de *AtSWEET12* y con una cobertura de la secuencia al menos del 40%. Se diseñaron oligonucleótidos para cada una de ellas nombrándose como sigue: *ZmSWEET* α , *ZmSWEET* β , *ZmSWEET* γ , *ZmSWEET* δ , *ZmSWEET* ϵ y *ZmSWEET* κ . De la reacción de RT-PCR a partir de RNA de hojas de plantas de 9 días con cada uno de los pares de oligonucleótidos, sólo se obtuvo el producto del tamaño esperado de 232 y 250 pb al emplear los oligonucleótidos para *ZmSWEET* α y *ZmSWEET* γ , respectivamente (Figura 15). A pesar de que se probaron diferentes temperaturas de alineamiento (54, 46, 58, 60, 62 y 64 °C) y números de ciclos (28, 30, 32, 34 y 36) para realizar la reacción de PCR.

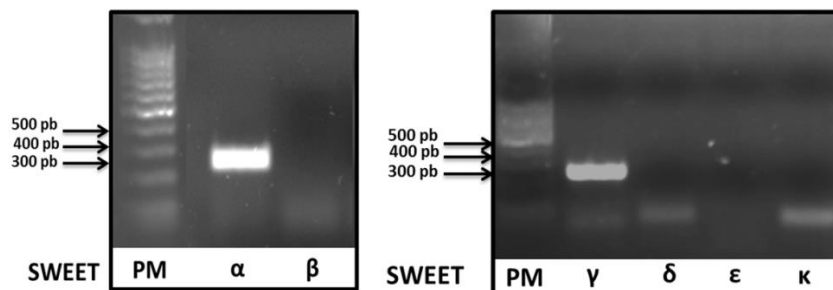


Figura 15. Visualización en gel de agarosa de los productos de PCR de secuencias putativas de SWEETs en maíz. Se utilizó RNA de hojas de plántulas con 9 días de crecimiento para la reacción de RT-PCR, utilizando 6 pares de oligonucleótidos diferentes para amplificar las secuencias putativas de SWEETs de maíz y que fueron nombrados *ZmSWEET* α , β , γ , δ , ϵ y κ .



IX.2 Obtención de clonas parciales: *ZmSWEET α* y *ZmSWEET γ*

Debido a que los oligonucleótidos dirigidos contra *ZmSWEET α* y *ZmSWEET γ* fueron los únicos que amplificaron en las condiciones de PCR que se utilizaron, sólo se siguió trabajando con estos genes. Con la finalidad de demostrar que amplificaban para una secuencia tipo SWEET se cortaron los productos de PCR del gel de agarosa, se purificaron y posteriormente se transformaron y clonaron en *E. coli* DH5 α , finalmente se purificaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar.

Al comparar las secuencias clonadas de *ZmSWEET α* , *ZmSWEET γ* con la putativa MtN3 reportada en EnsemblPlants (número de acceso GRMZM2G173669_T01), se encontró que efectivamente corresponden a la secuencia esperada, aunque existen 3 nucleótidos distintos para *ZmSWEET γ* y 2 para *ZmSWEET α* con respecto a la reportada (Figura 16, señaladas con flechas). Además, es importante señalar que *ZmSWEET α* y *ZmSWEET γ* comparten una región de 140 nucleótidos casi idéntica entre ellas; es decir, es posible que los dos pares de oligonucleótidos utilizados amplificaran segmentos distintos del mismo gen, por lo que es difícil asegurar que los productos amplificados correspondan a dos secuencias de SWEET distintas. Por lo anterior en adelante solo se trabajó con la secuencia *ZmSWEET α* .

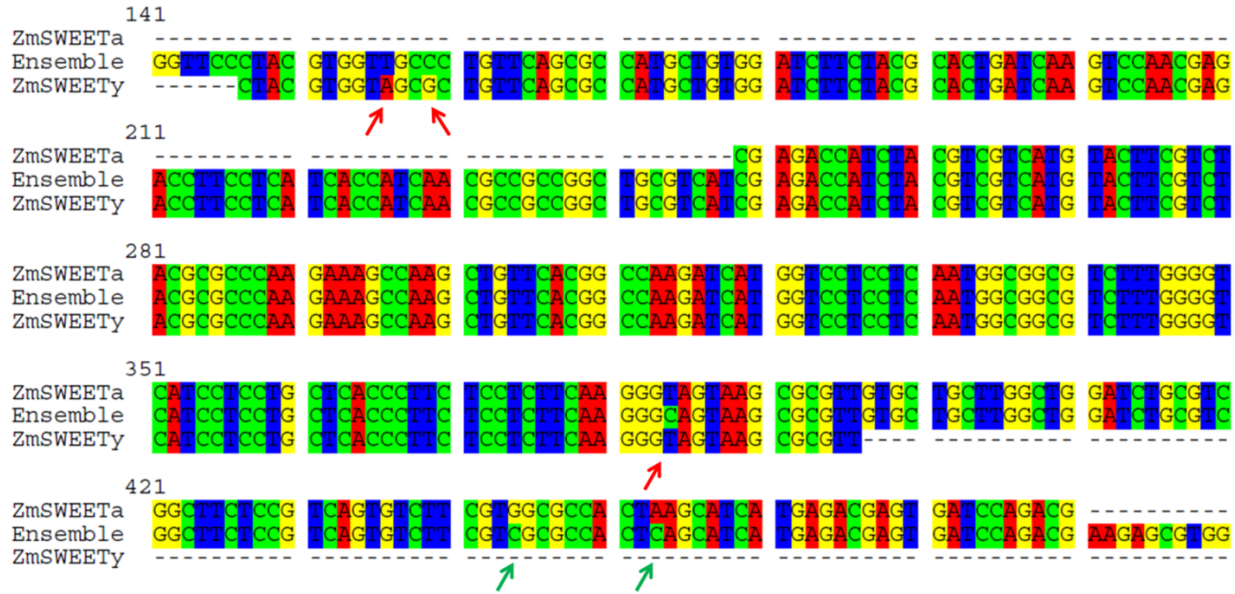


Figura 16. Comparación entre las secuencias de las clonas parciales obtenidas para ZmSWEET α , ZmSWEET γ y la secuencia putativa de MtN3 (EnsemblPlants) para ZmSWEET α . Las Citosinas están sombreadas en verde, las Adeninas en rojo, las Timinas en azul y las Guaninas en amarillo. Las flechas rojas señalan los nucleótidos distintos entre las secuencias alineadas con ZmSWEET γ y las flechas verdes a los nucleótidos distintos con ZmSWEET α . La secuenciación de cada clona se hizo por duplicado, obteniéndose la misma secuencia para cada una.

IX.3 Clonación de la región ORF de ZmSWEET α

Se realizó la clonación de la región traducible (ORF) del gen *ZmSWEET α* en el vector pGEM[®]-T Easy y posteriormente se secuenció. Se comparó la secuencia obtenida con la utilizada para el diseño de los oligonucleótidos y que se encuentra en la base de datos EnsemblPlant (Figura 17). Como se observa, ambas secuencias son muy similares, con sólo tres nucleótidos distintos, 132T:C, 159A:C y 804T:C, y caen dentro del marco de lectura del gen. A pesar de estos cambios, los codones resultantes no se traducen en un cambio en el residuo de aminoácido de la secuencia.

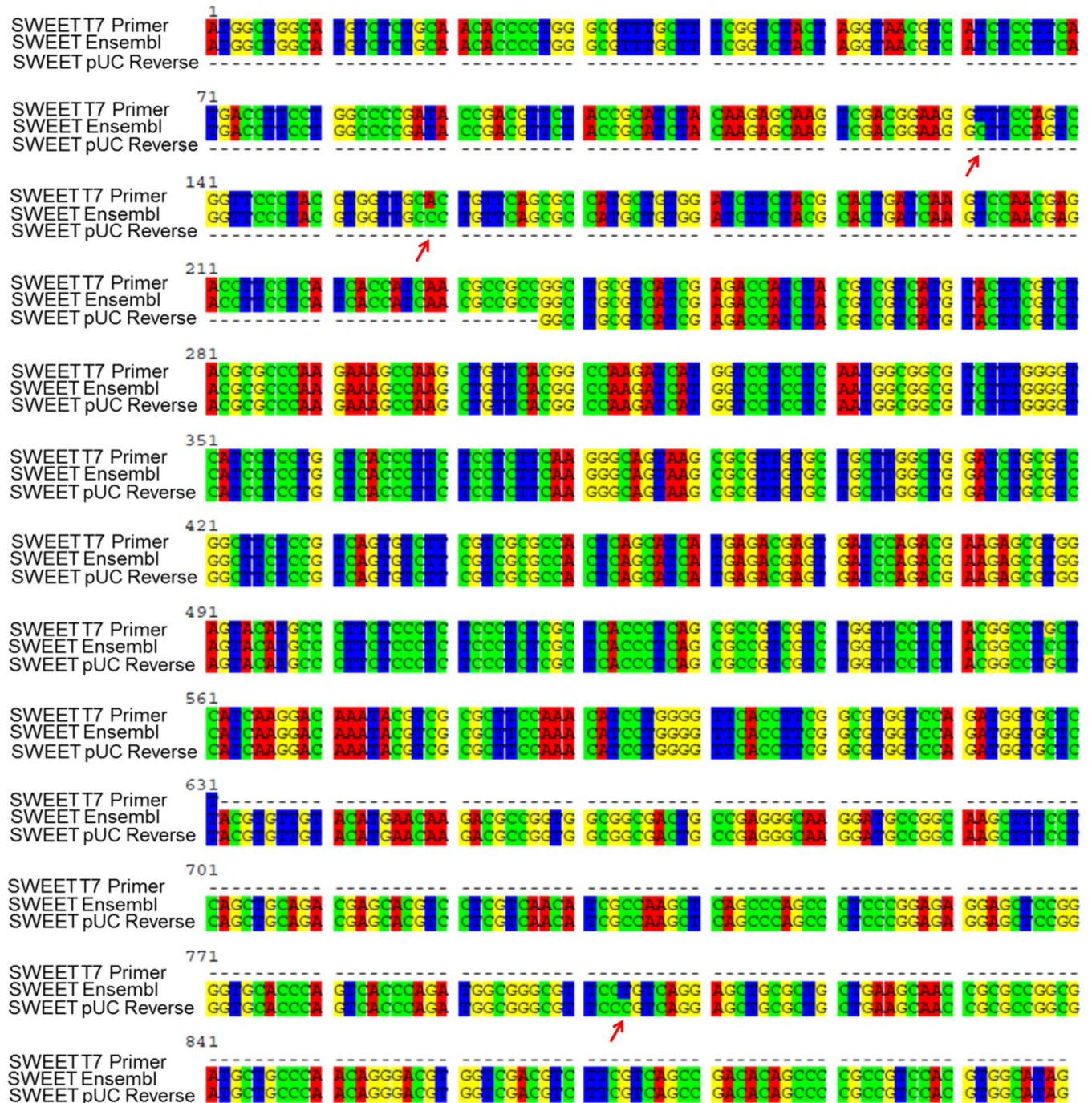


Figura 17. Secuencia de la región ORF de *ZmSWEETα*. Se muestra el resultado de la secuenciación con dos oligonucleótidos universales: el T7 y el m13/pUC antisentido. La secuencia clonada se compara con la secuencia putativa SWEET de la base de datos EnsemblPlants. Se sombreadon con rojo las Adeninas, verde Citosinas, azul las Timinas y amarillo las Guaninas. Con flechas se muestran los nucleótidos distintos entre la secuencia amplificada y la reportada.



IX.4. Análisis *in silico* de ZmSWEET α

La secuencia de aminoácidos de ZmSWEET α se analizó bioinformáticamente para determinar su posible arreglo topológico en la membrana y su similitud a la predicha para este tipo de proteínas (Chen *et al.*, 2010; Yuan y Wang, 2013).

a) Predicción de Barriles Beta transmembranales

Para excluir que se tratara de una proteína con conformación barril beta transmembranal, se analizó la secuencia con el programa TBBpred. El programa estableció que la conformación más probable era la de una proteína globular.

b) Análisis de estructura secundaria

El análisis de la estructura secundaria se llevó a cabo en los programas GOR, Porter, SOPMA, Scratch PP y PSIPred. Se tomaron las predicciones de cada uno de estos programas y se realizó un consenso para definir la estructura secundaria a lo largo de toda la secuencia. Se lograron identificar 7 regiones con posible estructura de α -hélice (Figura 18).

c) Análisis de hidrofobicidad

Para determinar si las α -hélices predichas son cruces transmembranales se realizó el análisis de hidrofobicidad mediante los programas DAS, TopPred, HMMTOP, SOSUI, TMHMM, TMpred y TOPCONS. Estos programas predicen 7 zonas con cruces transmembranales (véase Anexo V). Se tomaron todas las predicciones y se estableció un consenso (Figura 18) coincidente con las 7 α -hélices previamente establecidas.

d) Topología

Para establecer la topología de la proteína se emplearon los programas OCTOPUS, TMHMM y PHOBIUS (véase Anexo V); los tres sitúan al amino terminal fuera de la célula y al carboxilo terminal en la región citosólica.

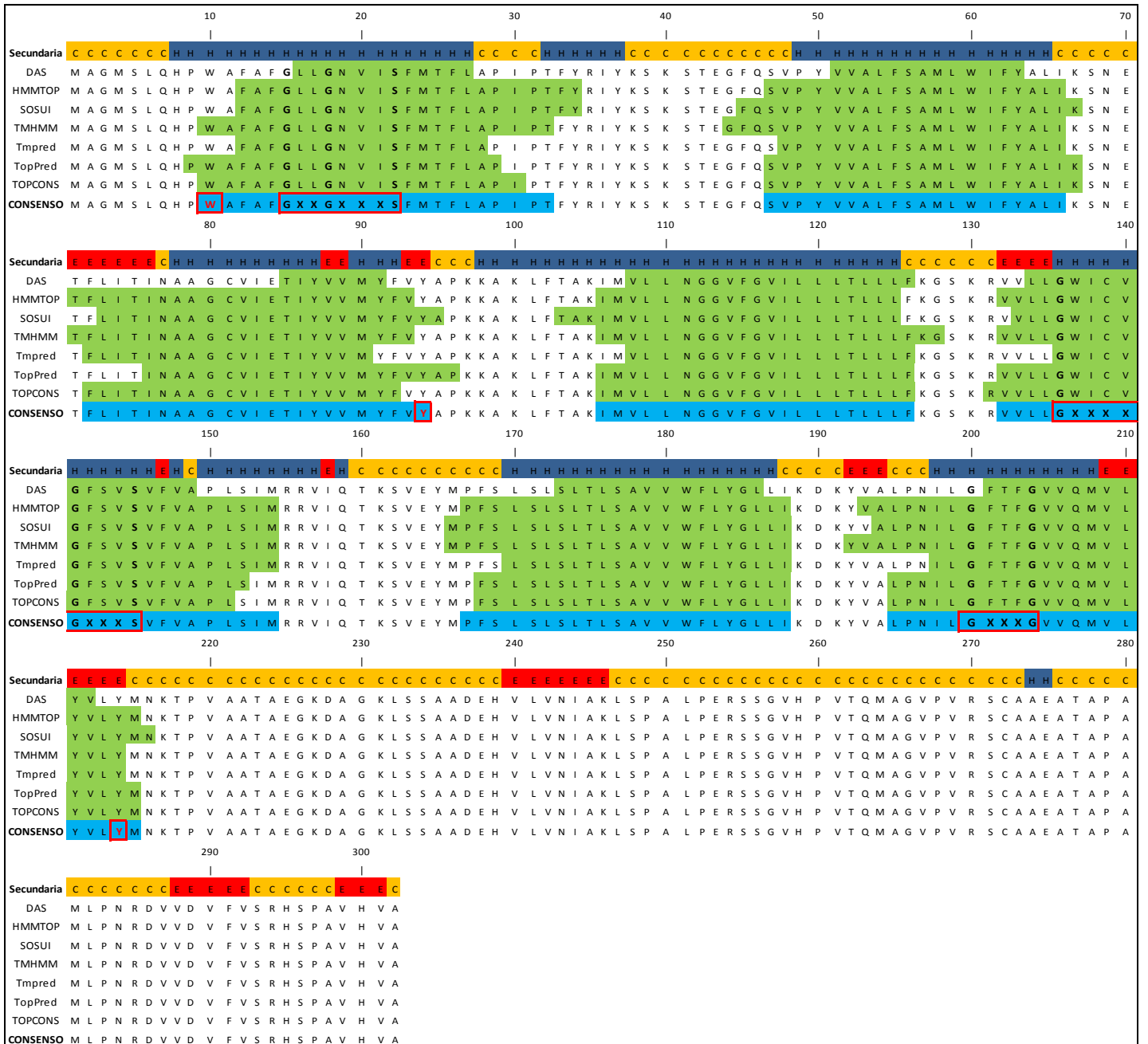


Figura 18. Predicción de estructura secundaria y dominios transmembranales. El primer renglón representa el consenso de estructura secundaria dado por GOR, Porter, SOPMA, Scratch PP y PSIpred. Sombreados en verde, los dominios transmembranales según la hidrofobicidad de la secuencia con los programas DAS, HMMTOP, SOSUI, TMHMM, Tmpred, TopPred y TOPCONS. Sombreado en azul cielo, el consenso elegido como dominio transmembranal, enmarcados en rojo se muestran los tres dominios de glicina encontrados y en letras rojas los residuos de tirosina y triptofano que podrían formar parte de un cinturón aromático.



e) Motivos de glicina (GXXXG), cinturón aromático y prolinas conservadas

Motivos de glicina.- Los motivos de glicina están fuertemente conservados en las proteínas de membrana y poseen un impacto estructural significativo al generar una fuerza de empaquetamiento entre hélices vecinas, una mutación en los motivos de glicina conduce a la pérdida de función en la mayoría de los casos (Kim *et al.*, 2005). Se encontraron 3 posibles dominios de glicina (Figura 18). El primero corresponde al motivo GXXGXXXS. A pesar de que sólo cuenta con dos residuos de aminoácidos entre la primera y segunda glicina se decidió considerarlo, ya que como se puede observar en la figura 19, en donde se comparan las secuencias SWEET de varias especies, este motivo se encuentra conservado, lo cual indica que posee un papel relevante y posiblemente estructural en la proteína. El segundo dominio se encuentra en el cruce transmembranal número 5 y corresponde a un dominio GXXXXGXXXS; el tercero se encuentra en el último cruce transmembranal.

Cinturón aromático.- Fue posible localizar un residuo de triptofano en el extremo del cruce 1, así como dos residuos de tirosina en los extremos de los cruces 3 y 7, lo cual hace suponer que podrían interactuar con las cabezas de los fosfolípidos.

Prolinas conservadas.- Se realizó un alineamiento entre secuencias de diferentes especies en CLUSTALW con proteínas establecidas en NCBI como tipo SWEET (MtN3), además de las ya conocidas de *Arabidopsis*, arroz y *M. truncatula*. Se encontraron 5 residuos de prolina conservados en los cruces transmembranales 1, 2, 5, 6 y 7. La presencia de residuos de prolina supone hélices interrumpidas; sin embargo, al encontrar estos residuos en los extremos de los cruces, se puede inferir que estas prolinas estarían provocando el término de la hélice en ese punto. Además, algunos programas dieron por terminado el cruce en el sitio de estas prolinas: por lo tanto, en los cruces en donde se encontraron prolinas conservadas se tomó la determinación de terminar los cruces transmembranales (Figura 19).

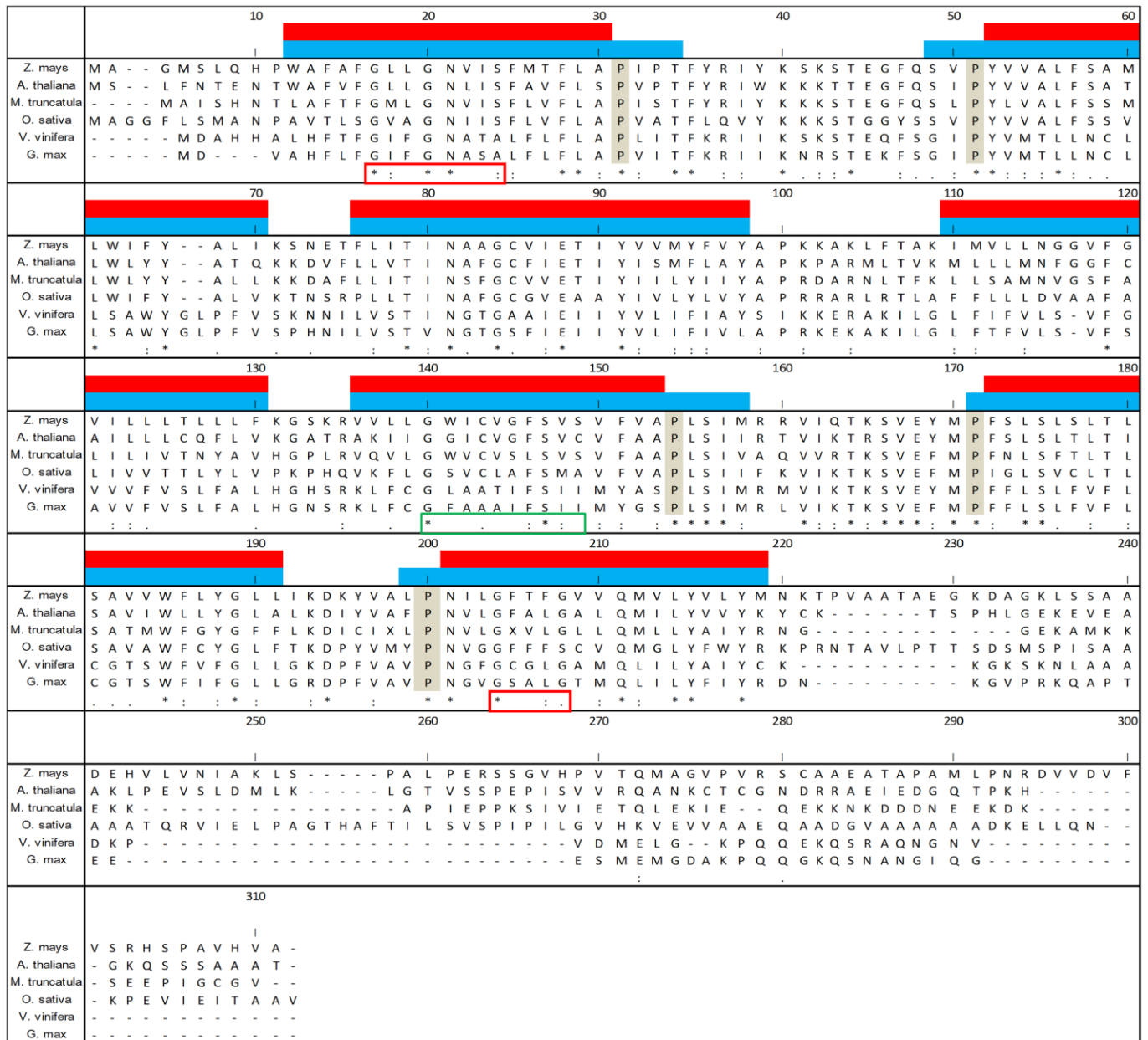


Figura 19. Alineamiento de secuencias de SWEETS o tipo MtN3 de diferentes especies incluyendo la de maíz. Se muestran sombreadas las prolinas conservadas. En la barra azul se consideró el posible cruce transmembranal con las prolinas dentro de los cruces transmembranales; en la barra roja muestra la longitud del cruce transmembranal una vez considerando que las prolinas son las que rompen la estructura de α -hélice transmembranal. Enmarcados en rojo los dominios de glicina que se conservan en las secuencias de las especies evaluadas y enmarcado en verde el dominio que únicamente se encontró en las secuencias de maíz y *Arabidopsis*.

f) Interacción de los cruces transmembranales (proteína-proteína)

Utilizando el programa EMBOSS:PEPWHEEL, se revisaron los residuos de aminoácidos de cada dominio transmembranal para establecer las zonas que podrían tener interacción con proteínas y con los lípidos de la bicapa fosfolipídica. Este programa emplea un algoritmo establecido por Samatey y colaboradores (1995) que indica la propensión de cada residuo de aminoácido para tener interacción proteína-proteína o proteína-lípido. Como se puede apreciar en la figura 20, los cruces transmembrana 1 y 3 cuentan con cuatro residuos de aminoácidos que favorecerían la interacción de esa zona con el resto de la proteína, los 5 cruces restantes sólo cuentan con dos aminoácidos interaccionando al interior de la proteína. Así mismo, se puede observar que en este acomodo podría haber interacción de los dominios de glicina encontrados en los cruces 1 y 7.

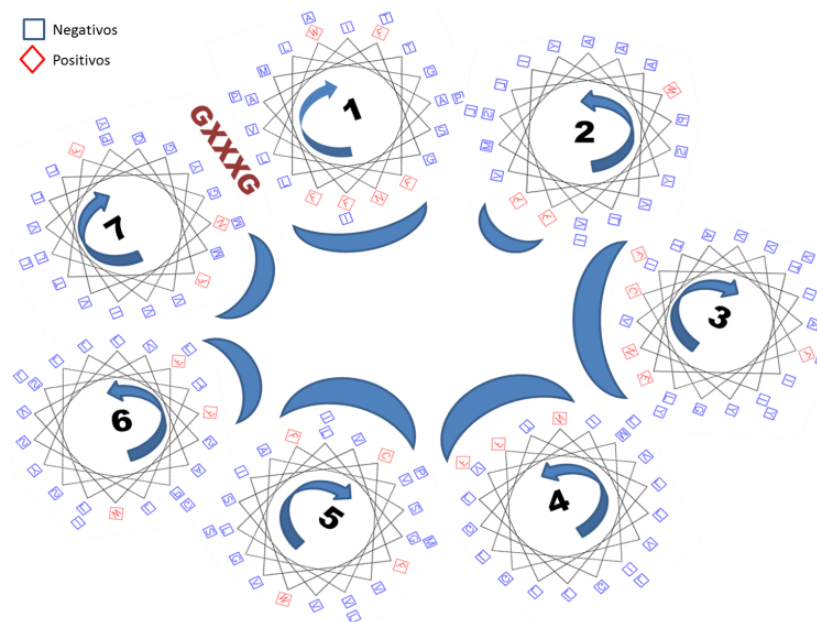


Figura 20. Distribución de aminoácidos en las α -hélices transmembranales según la escala de Popot (1995). Los aminoácidos con valor positivo (rombo rojo) según la escala, son propensos a interactuar con proteínas, en tanto que los valores negativos (cuadro azul) se inclinan por una interacción con los lípidos. Se sugiere que hay una posible interacción de los cruces transmembranales 1 y 7 por la presencia de dominios de glicina en ambas hélices; sin embargo, no se descarta que el dominio de glicina en el cruce transmembranal número 5 pueda establecer alguna interacción con alguno de los anteriores.

g) Modelo topológico propuesto para *ZmSWEET α*

Con la información obtenida de la base de datos del NCBI y EnsemblPlants, así como de los programas para determinar la presencia de alfa-hélices, dominios transmembranales y predicción de topología; se realizó el modelo topológico de la proteína de maíz (Figura 21A). Se muestran los 7 cruces transmembranales, el amino terminal extracelular y el carboxilo terminal en el citosol. Cabe mencionar que Chen y colaboradores (2010), establecieron la posible estructura para los SWEETs en *Arabidopsis* de forma similar a la que se presenta en este trabajo, encontrando una estructura parecida a la de maíz (Figura 21B).

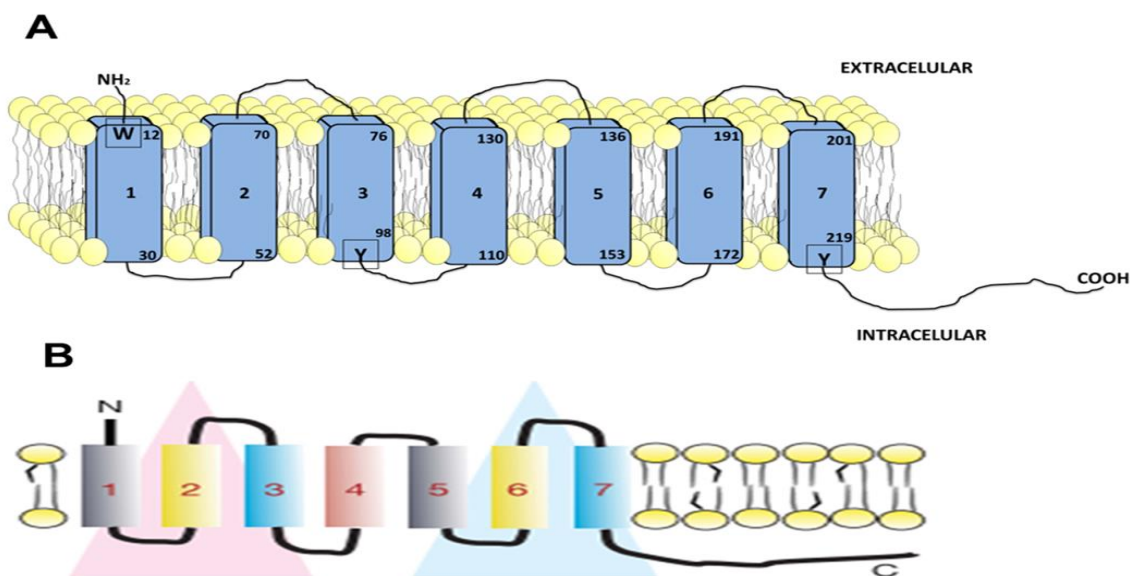


Figura 21. Comparación entre los modelos topológicos propuestos para el SWEET de maíz y *Arabidopsis*. A) Modelo obtenido para el transportador putativo SWEET de maíz en este trabajo. B) Modelo propuesto para SWEET en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2010). En ambos modelos se muestran los 7 posibles dominios transmembranales, el amino terminal extracelular y el carboxilo terminal en la región citosólica.

IX.5 Expresión de *ZmSWEET α* en células HEK293

Para determinar si el gen *ZmSWEET α* se traduciría a proteína, se subclonó el gen del vector pGEM[®]-T Easy al vector pDONR[™]221 utilizando la Tecnología Gateway[®]. Posteriormente se transfirió el ORF del *ZmSWEET α* al vector de

expresión pcDNA™3.2/V5-DEST. La construcción en pDONR™221 se verificó por secuenciación (Véase Anexo VI) y la de pcDNA™3.2/V5-DEST por ensayo de restricción (Figura 22). De esta clona se purificó DNA que fue usado para la transfección.

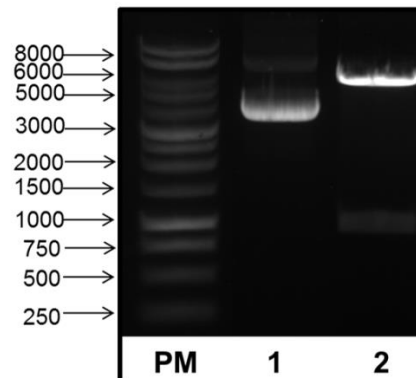


Figura 22. Ensayo de restricción de la construcción pcDNA™3.2/V5-DEST + ZmSWEET α con SacI. Tanto ZmSWEET α como el vector pcDNA™3.2/V5-DEST cuentan con un sitio de restricción para SacI, por lo cual se espera la liberación de un fragmento de 1000 pb. PM= Marcador de pesos moleculares. 1) Vector pcDNA™3.2/V5-DEST + ZmSWEET α sin digerir. 2) Vector pcDNA™3.2/V5-DEST + ZmSWEET α digerido con SacI.

La expresión de la proteína se realizó en un sistema heterólogo, células embrionarias de riñón humano, HEK293 adherentes que tienen la característica de no contener transportador de sacarosa ni de hexosas en sus membranas, por lo que se emplea para caracterizar a los transportadores de azúcares en plantas (Chen *et al.*, 2010).

Para estandarizar la transfección transitoria de células HEK293 adherentes se probaron tres concentraciones de DNA (250, 500 y 1000 ng). Se evaluó el éxito de la transfección mediante una inmunorréplica tipo Western utilizando un anticuerpo contra el epítipo V5 que le fue adicionado a la proteína a través de la secuencia del vector pcDNA™3.2/V5-DEST. En la figura 23A se muestra que se produjo la proteína con el peso molecular esperado de 33 KDa.

La transfección se realizó con la ayuda técnica de la Dra. Sara L. Morales Lázaro en el laboratorio de la Dra. Tamara Rosenbaum en el departamento de Neurodesarrollo y Fisiología del IFC.

Dado que con 500 ng de plásmido fue posible detectar a la proteína, se empleó esta cantidad para una nueva transfección de células HEK293 en la que se evaluó la localización de ZmSWEET α . La proteína se localizó en la fracción membranal (Figura 23B).

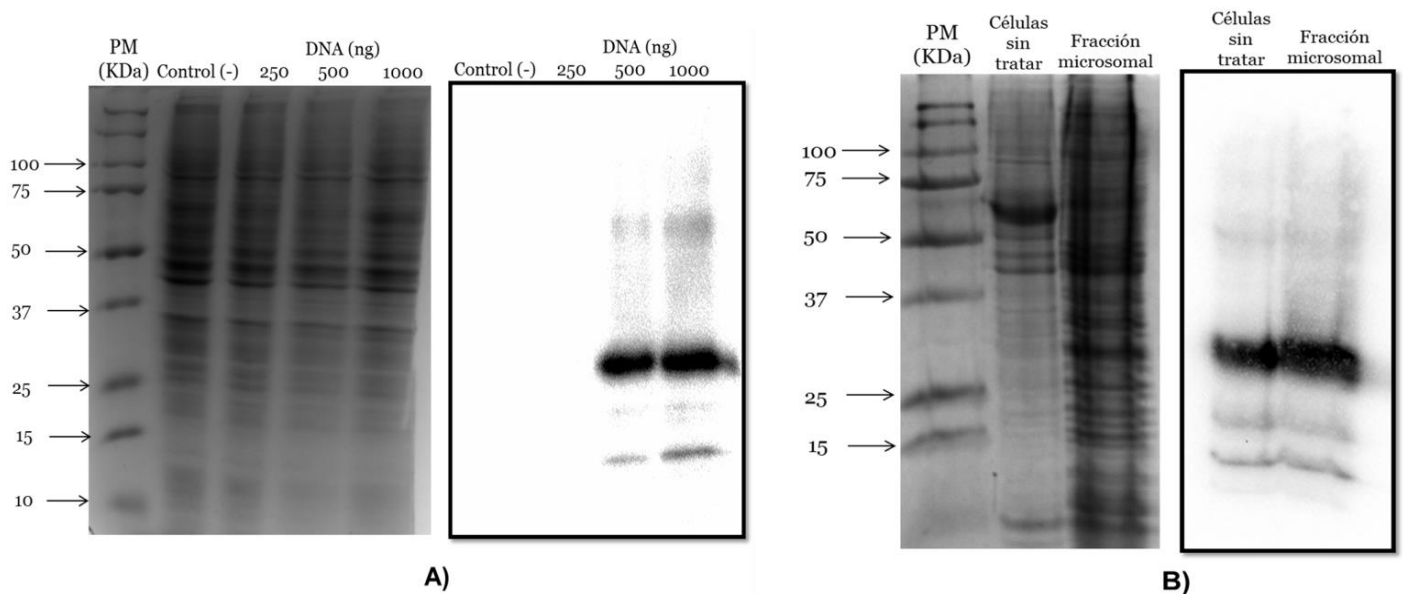


Figura 23. Detección de ZmSWEET α por inmunorréplica tipo Western. anti-V5-HRP. A) PAGE-SDS (izquierda) e Inmunorréplica tipo Western (derecha) de las células HEK293 que fueron transfectadas con 250, 500 y 1000 ng de plásmido. B) PAGE-SDS izquierda e Inmunorréplica tipo Western Blot derecha, de las células completas sin tratar con amortiguador de lisis y fracción microsomal. PM=Marcador de Pesos Moleculares, Control(-)= Células HEK293 sin transfectar.

Por lo anterior, la secuencia de maíz GRMZM2G173669_T01 reportada en EnsemblPlant codifica para una proteína membranal que por su secuencia es similar a los SWEET de otras especies ya caracterizadas. La caracterización funcional como transportador de azúcares se hace necesaria para determinar qué azúcar prefiere transportar y cuál es su Km, además de evaluar si es un transportador difusional. Estos estudios se encuentran en progreso en el laboratorio.

IX.6 Efecto de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum* en la expresión de *ZmSWEETα*

Para evaluar si la expresión de *ZmSWEETα* se afectaba al infectar el maíz con microorganismos, se utilizó un sistema experimental previamente montado en el laboratorio, en donde se germinaron semillas de maíz en ausencia (Lote control) o en presencia del hongo benéfico *Trichoderma asperellum* (Lote *T. asperellum*). Después de 7 días de crecimiento se infiltraron con la ayuda de una jeringa, con agua estéril (CH) o con el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*. Contando entonces con los siguientes tratamientos (Figura 24):

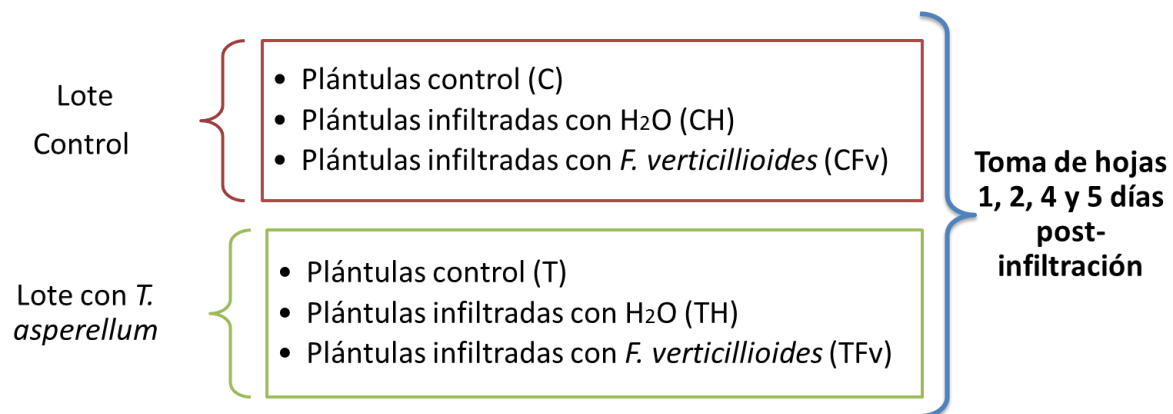
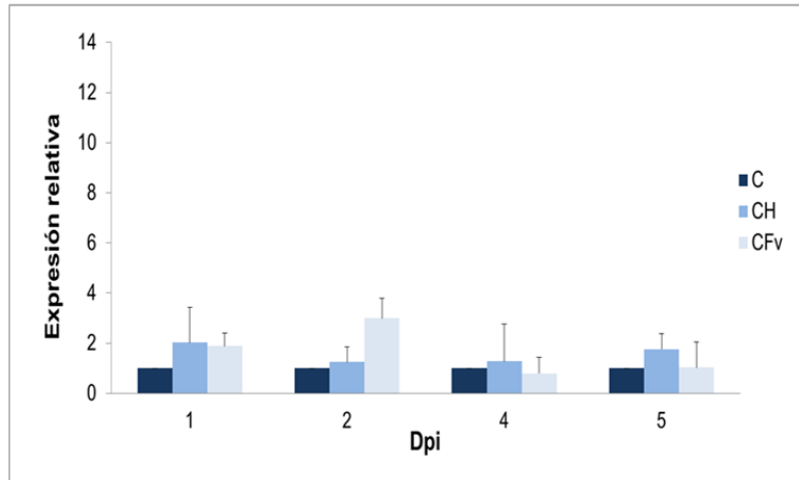


Figura 24. Tratamientos realizados sobre plántulas de maíz con 7 días de crecimiento. Plántulas control se refiere a plántulas que no fueron inyectadas con hongo. Una vez infiltradas las plantas se tomaron las hojas de 5 plantas a cada uno de los días indicados para obtener el RNA y evaluar la expresión de *ZmSWEETα*.

La cuantificación de la expresión de *ZmSWEETα* se realizó tanto por PCR punto final como por qRT-PCR a los días 1, 2, 4 y 5 post-infiltración. Para el experimento se tomaron las hojas de 5 plántulas por tratamiento, a las cuales se les extrajo RNA, se calibró la cantidad de RNA de todas las muestras y entonces se produjo el cDNA. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de PCR para *ZmSWEETα*. Cada muestra se ensayó por triplicado en las tres réplicas independientes de cada lote de plantas.

Se muestran sólo los resultados del análisis por qPCR (Figura 25). El nivel de los transcritos durante los 5 días post-infiltración de las plantas del lote control fue muy similar entre las plantas sin tratar (C) y las que fueron infiltradas con agua o con *F. verticillioides*, excepto a los 2 días post-infiltración en donde *F. verticillioides* aumenta la expresión 2.99 ± 0.79 veces (Figura 25A).

A)



B)

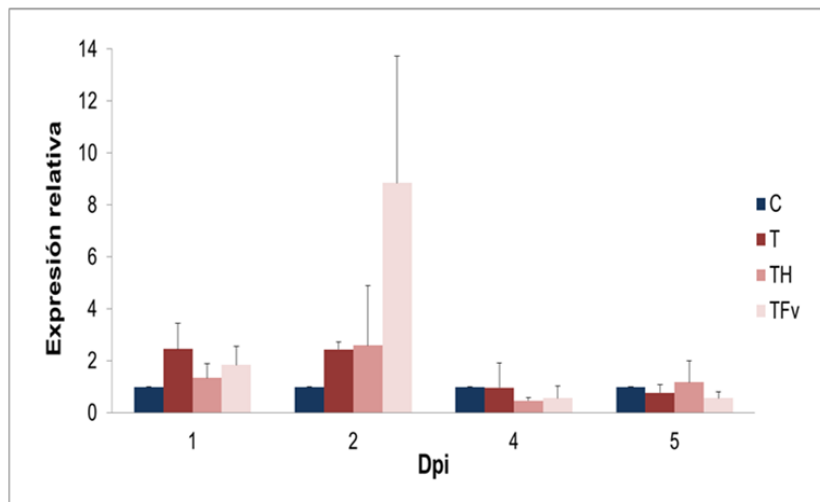


Figura 25. Perfil de expresión del RNAm de *ZmSWEETα* en hojas de plántulas de maíz a 1, 2, 4 y 5 días post-infiltración (Dpi). A) Lote control: Control (C), infiltración con agua (CH) e infiltración con *F. verticillioides* (CFv). **B) Lote con *T. asperellum*:** Control (T), infiltración con agua (TH) e infiltración con *F. verticillioides* (TFv). Calibradores: Control (C) para cada tiempo. Se muestra la media \pm desviación estándar ($n=3$). El experimento se realizó en tres lotes de plantas con al menos cuatro plántulas por tratamiento y de cada tratamiento se realizó la reacción de PCR por triplicado.



El perfil de expresión de las hojas de las plántulas que no fueron germinadas con *T. asperellum* es diferente al de las hojas de las plántulas que fueron germinadas con el hongo *T. asperellum* (Figura 25B). Al día uno se detectó que hay más transcritos en todos los tratamientos de las hojas del Lote *T. asperellum* comparadas con el lote control (C), esto es: 2.44 ± 1.00 veces en las hojas de las plantas crecidas sólo con *T. asperellum* (T), 1.34 ± 0.54 en las hojas TH y 1.84 ± 0.72 en las hojas TFv. El mayor cambio en la expresión se detectó al día 2, en donde hubo diferencia significativa entre las plántulas TFv y las plántulas control (C), así como con las plántulas tratadas sólo con *T. asperellum* (T), presentando 8.84 ± 4.89 y casi 4 veces más transcritos respectivamente. Los niveles de expresión disminuyen al día cuatro y cinco para todos los tratamientos, situándose prácticamente al mismo nivel que el control.

Es claro que las plantas que pasaron por bioprimering con *T. asperellum* son más susceptibles a aumentar la expresión de *ZmSWEET α* al ser retadas a la infección por un segundo hongo, aunque la inducción de la expresión de *ZmSWEET α* por *F. verticillioides* se presenta temporalmente igual (Figura 25).

IX.6.1 Crecimiento de *T. asperellum* y *F. verticillioides* en hojas

Para comprobar si *T. asperellum* y/o *F. verticillioides* se encontraban en las hojas de los diferentes tratamientos, se sembraron en medio PDA trozos de hojas de los tratamientos a los 5 Dpi. En la figura 26 se muestran los tejidos incubados en el medio, así como las fotos de la inspección microscópica.

Las plántulas control infiltradas con *F. verticillioides* (CFv) presentaron crecimiento fúngico y la morfología microscópica típica del género *Fusarium*. Las hojas de las plántulas germinadas con *T. asperellum* (T), también produjeron crecimiento fúngico con la morfología microscópica del género *Trichoderma*. Mientras que en las plántulas que fueron germinadas con *T. asperellum* y posteriormente se infiltraron con *F. verticillioides* (TFv) se identificó a *Trichoderma* tanto macroscópica como microscópicamente, aunque no se logró observar a *Fusarium*.

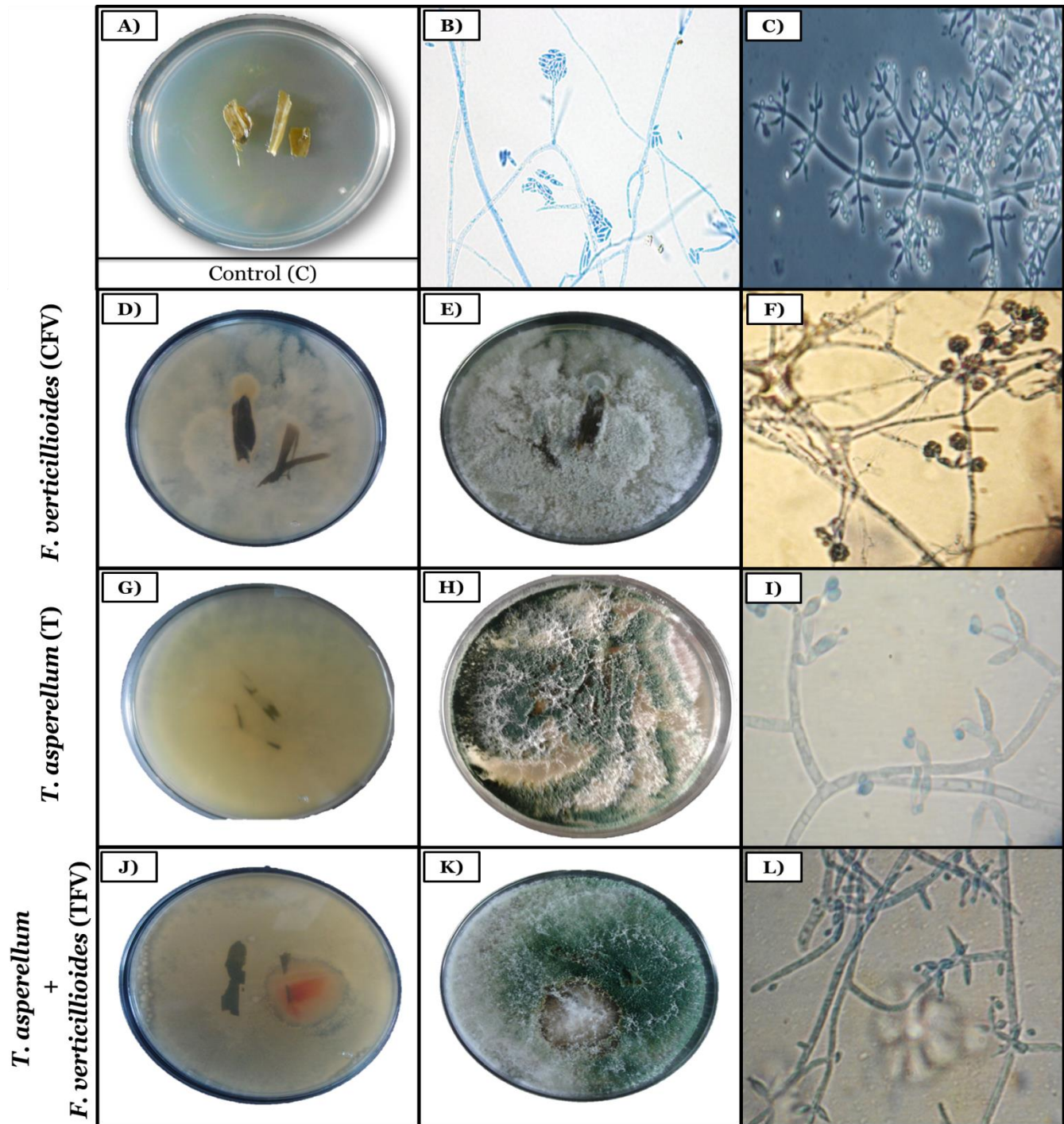


Figura 26. Morfología macroscópica y microscópica de los hongos provenientes de las hojas de plántulas de los lotes control y tratamiento con *T. asperellum* después 5 Dpi con *F. verticillioides*. A) Tratamiento Control (C). B) Vista microscópica del hongo caracterizado como *F. verticillioides* (INSPQ, 2014) C) Vista microscópica del hongo caracterizado como *T. asperellum* (Samuels *et al.*, 2014) D), E), F) Hojas del Lote control infiltradas con *F. verticillioides* (CFV) G), H), I) Hojas del Lote T. asperellum (T) J), K), L) Hojas del Lote T. asperellum infiltrado con *F. verticillioides*. Se muestra la vista anterior (D,G y J) y posterior (E,H y K) de cada caja con PDA. Vista microscópica de los cultivos (F, I y L).

IX.6.2 Identificación de *T. asperellum* y *F. verticillioides* en hojas mediante PCR.

Se corrieron ensayos de PCR para las secuencias VER de *F. verticillioides* y tag83 de *T. asperellum* (Mulè *et al.*, 2004; Marcello *et al.*, 2010) empleando como templado el DNA de los hongos que crecieron en PDA. La secuencia dirigida a VER de *F. verticillioides* no mostró amplificación, por su parte en la figura 27 se muestra la amplificación para tag83. Como se puede apreciar, es posible encontrar en hojas a *T. asperellum* en los tratamientos con biopriming (T y TFv), lo cual coincide con lo observado microscópicamente.

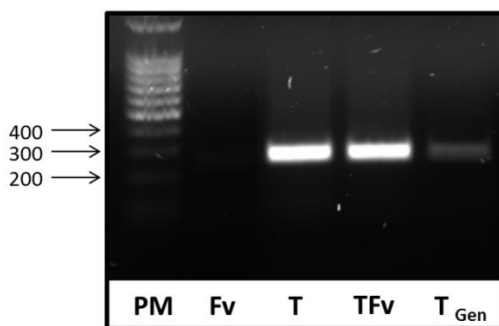


Figura 27. Amplificación de tag83 de *T. asperellum*. PCR empleando como templado el DNA de los hongos que crecieron en hojas de plántulas infectadas con: **Fv**= *F. verticillioides*, **T**= *T. asperellum*, **TFv**= *T. asperellum* + *F. verticillioides*. **T_{Gen}**= DNA genómico de *Trichoderma asperellum*.



X. DISCUSIÓN

X.1 Genes ortólogos y parálogos de *ZmSWEETα*

El número de miembros de la familia SWEET varía entre especies, lo cual no se ha visto asociado a su complejidad evolutiva. Los mamíferos poseen un solo gen, mientras que las plantas poseen el mayor número de genes *SWEET*, en comparación con el resto de las especies en las que se han descubierto, sugiriendo que estos genes podrían desempeñar más funciones en las plantas que en los animales (Yuan y Wang, 2013). A la fecha, en la base de datos de proteínas de membrana “Aramemnon” se han reportado 9 especies de plantas con secuencias para SWEET (4 monocotiledóneas y 5 dicotiledóneas) (Tabla 15), de ellas sólo en *Arabidopsis* y arroz se ha buscado y demostrado su actividad transportadora de azúcares, aunque sólo para 6 y 2 secuencias respectivamente, el resto permanecen como secuencias de cDNA putativas descubiertas en su mayoría por análisis de expresión a través de microarreglos.

Tabla 15. Número de secuencias encontradas en monocotiledóneas y dicotiledóneas. Información tomada de la base de datos Aramemnon

Espece	Secuencias SWEETs putativas (sin caracterizar)	Proteínas SWEETs con actividad de transporte demostrada
Monocotiledóneas		
<i>Musa acuminata</i> (plátano)	26	0
<i>Oryza sativa</i> (arroz)	21	2
<i>Zea mays</i> (maíz)	22	0
<i>Brachypodium distachyon</i>	19	0
Dicotiledóneas		0
<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	32	0
<i>Populus trichocarpa</i> (álamo)	28	0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	9	9
<i>Cucumis melo</i> (melón)	18	0
<i>Vitis vinifera</i> (uva)	16	0



En el caso del maíz, la base de datos Aramemnon establece un mínimo de 22 secuencias (Tabla 15). El hecho de que en *A. thaliana* y *O. sativa* se hayan comprobado que hay proteínas tipo SWEET con actividad de transportadores de carbohidratos, sugiere que maíz muy posiblemente también cuente con varios parálogos. El alineamiento de las secuencias putativas de los SWEETs de maíz a nivel de aminoácidos (Tabla 16) muestra un porcentaje de identidad amplio entre el 27-95%, lo cual coincide con la alta variabilidad hallada entre los parálogos de *Arabidopsis* que van del 27-80% (Chen *et al.*, 2010).

Tabla 16. Porcentaje de identidad a nivel de aminoácidos de los 22 parálogos SWEET en maíz. Se muestra en verde el porcentaje de identidad de ZmSWEET α respecto a los 21 SWEETs putativos de maíz, así como respecto a ZmSWEET γ y a AtSWEET12.

	SWEET 2	SWEET 3	SWEET 4	SWEET 5	SWEET 6	SWEET 7	SWEET 8	SWEET 9	SWEET 10	SWEET 11	SWEET 12	SWEET 13	SWEET 14	SWEET 15	SWEET 16	SWEET 17	SWEET 18	SWEET 19	SWEET 20	SWEET 21	SWEET α	SWEET γ	AtSWEET 12
SWEET1	38	36	39	34	35	43	40	43	36	82	93	42	56	39	35	33	42	30	61	38	36	40	37
SWEET 2		77	38	86	49	36	43	37	62	30	36	39	35	58	79	30	37	49	36	66	75	65	58
SWEET 3			36	74	52	39	42	39	54	33	36	36	43	59	89	33	37	44	43	60	95	86	60
SWEET 4				38	36	36	39	37	38	36	37	40	37	36	27	51	44	34	38	39	36	35	33
SWEET 5					56	36	42	39	58	31	35	37	36	65	77	29	36	50	35	63	67	78	59
SWEET 6						35	40	36	81	29	33	34	35	47	48	33	31	44	35	57	44	53	42
SWEET 7							51	90	36	37	41	42	39	40	37	34	41	35	40	42	38	38	42
SWEET 8								49	38	36	40	45	42	45	39	32	41	40	41	47	41	43	37
SWEET 9									36	38	41	40	40	42	37	33	41	37	41	43	39	40	43
SWEET 10										29	32	33	37	58	49	34	31	45	34	58	50	53	54
SWEET 11											84	39	56	37	28	33	41	29	57	36	32	33	32
SWEET 12												41	60	40	34	32	43	31	61	38	35	37	35
SWEET 13													45	41	37	35	48	40	46	42	39	41	39
SWEET 14														39	37	33	39	36	95	40	44	43	41
SWEET 15															61	32	38	48	37	72	56	59	49
SWEET 16																27	29	51	35	61	90	98	58
SWEET 17																	37	33	33	33	33	31	31
SWEET 18																		32	38	38	35	35	38
SWEET 19																			35	55	47	51	40
SWEET 20																				39	40	39	41
SWEET 21																					61	60	54
SWEET α																						86	58
SWEET γ																							55

Durante la búsqueda de la(s) secuencias que codificaran o fueran similares a las de un transportador SWEET en maíz se hallaron algunas secuencias que compartían un porcentaje de identidad >60% a nivel de nucleótidos respecto al gen ortólogo *AtSWEET12*. Dos de estas secuencias fueron amplificadas: *ZmSWEET α* (NM_001155615.1) y *ZmSWEET γ* (NM_001147634.1). Aunque los oligonucleótidos utilizados para amplificarlos fueron distintos, el producto



amplificado compartió una zona de 147 nucleótidos, con pocas diferencias en esa región. Sin embargo, el alineamiento de las secuencias completas resulta en un porcentaje de identidad del 87% a nivel de nucleótidos cubriendo el 75 % de la secuencia de *ZmSWEET α* . Al hacer el alineamiento a nivel de aminoácidos, el porcentaje de identidad fue del 86 % (Tabla 16) cubriendo el 99% de la secuencia. Por lo cual las diferencias existentes se encuentran principalmente en las regiones UTR de cada gen (véase Anexo VII).

El análisis *in silico* de la secuencia traducida del gen *ZmSWEET α* mostró algunos residuos altamente conservados al alinearla con otras 5 presuntas secuencias SWEET de diferentes especies de plantas (*A. thaliana*, *M. truncatula*, *O. sativa*, *V. vinífera* y *G. max*). Entre estos residuos se encuentran dos prolinas (P³¹ y P⁵²) localizadas dentro de los cruces transmembrana uno y dos respectivamente (Figura 19), estas dos prolinas también se encontraron en un estudio en el que se llevó a cabo el alineamiento para secuencias putativas en 7 especies diferentes (*A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Z. mays*, *M. truncatula*, *C. sinensis*, *P. hybrida* y *T. aestivum*) (Xuan *et al.*, 2013). Los autores además determinaron la importancia de una de estas prolinas en la función del SWEET, cuando al cambiarla (P³¹:T), se eliminó la capacidad de transporte de carbohidratos. El hecho de que se encuentre la prolina en la secuencia del *ZmSWEET α* sugiere que podría tener actividad de transporte.

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la probable proteína codificada por el gen *ZmSWEET α* sugiere un plegamiento de la proteína en siete cruces transmembranales, con el amino terminal en la región extracelular y el carboxilo terminal en el citosol, arreglo que ya ha sido descrito para los SWEETs en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2010; Xuan *et al.*, 2013). El modelo topológico que se produjo para el SWEET de maíz sugiere a los aminoácidos que podrían estar en la frontera de cada cruce transmembrana (Figura 21A). Además, el análisis *in silico* de la interacción proteína-proteína y proteína-lípido sugiere un acomodo de la proteína en forma de poro (Figura 20). Sin embargo, datos recientes por el grupo



del Dr. Frommer sugieren que la proteína debe oligomerizarse, en al menos un dímero, lo anterior lo proponen después de realizar la co-expresión en levadura del SWEET1 de *Arabidopsis* con cuatro mutantes no funcionales del mismo SWEET (P²³T, Y⁵⁷A, G⁵⁸D, G¹⁸⁰D), el análisis del crecimiento de la levadura en medio con glucosa como única fuente de carbono mostró una reducción en la actividad de transporte en comparación a cuando únicamente se encuentra expresado el SWEET1 silvestre, lo cual indica que la oligomerización es necesaria para la función. Además, también se identificaron homólogos en procariotes con sólo 3 cruces transmembranales (semiSWEETs) que mediante un ensayo de interacción basado en la separación de ubiquitina mostraron oligomerización (Xuan *et al.*, 2013).

Lo anterior sugiere la formación de un tetrámero en los semiSWEETs y un dímero en los SWEETs de eucariontes para la creación de un poro funcional (Xuan *et al.*, 2013), para al menos acercarse al número de cruces transmembrana que contienen los transportadores SUTs y MST que cuentan con 12 dominios transmembranales y se propone pueden ser suficientes para que la proteína produzca el poro por el cual el azúcar puede ser transportado (Milne *et al.*, 2013).

X.2 Función transportadora de los SWEET

Los trabajos de Chen y colaboradores en 2010 y 2012 han demostrado que los miembros de la familia de proteínas SWEET en las plantas funcionan como transportadores de azúcares. Específicamente, AtSWEET11 y 12 (Km~70 mM) tienen un papel importante en el transporte de sacarosa, al estar involucrados en su exportación y por su localización ser los presuntos responsables del primer paso en el cargado del floema.

Para comprobar que ZmSWEET α puede transportar sacarosa se tendrían que realizar ensayos de toma de carbohidratos radiactivos en las células HEK293, en



presencia y ausencia de ionóforos para protones, lo último para verificar si el transporte depende del gradiente de protones. O bien co-transfectar las células HEK293 con DNA para el transportador SWEET y con plásmido para producir una proteína sensora de azúcares, FLIP. Existen diversas variantes de las FLIP, proteínas que contienen tres dominios, que fueron construidas para contener un dominio con una proteína que une maltosa o alguna otra proteína que une azúcares y que posee una o varias mutaciones para percibir diferentes moléculas, entre ellas glucosa, sacarosa, galactosa y fructosa. Además de este dominio, las FLIP presentan en los extremos amino y carboxilo de la proteína sensora de carbohidratos a dos proteínas fluorescentes distintas, de tal forma que cuando el carbohidrato se une, la conformación de la proteína central cambia, acercando a las proteínas fluorescentes, lo que ocasiona que haya transferencia de energía resonante entre ambos fluorocromos (FRET). Esta herramienta es la que más ha utilizado el Dr. Frommer para caracterizar a los transportadores SWEET, debido a que su grupo también desarrolló a las proteínas FLIPs (Lager *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010; Chaudhuri *et al.*, 2011). Otra manera de comprobar la función del transportador sería a través de la expresión heteróloga en una mutante de levadura, la cepa EBY.VW4000 (MATa Dhxt1-17 Dgal2 Dstl1 Dagt1 Dmph2 Dmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-D1 MAL2-8c SUC2), que no transporta sacarosa ni glucosa y que se ha utilizado para caracterizar transportadores de azúcares de diferentes especies incluyendo plantas (Wieczorke *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2011).

De los transportadores caracterizados en *Arabidopsis*, 7 transportan sacarosa (AtSWEET9 al 15) (Chen *et al.*, 2012), mientras que en el arroz se ha demostrado el transporte de sacarosa para OsSWEET 11 y 14; en estos últimos también se ha observado el transporte de glucosa aunque en menor medida (Chen *et al.*, 2010 y 2012). Además de glucosa y sacarosa los SWEETs logran transportar maltosa, fructosa y manosa; lo anterior se ha observado por el crecimiento de la levadura EBY.VW4000 en medio conteniendo el carbohidrato a evaluar como única fuente de carbono.



X.3 La expresión de *ZmSWEETα* cambia cuando el maíz ha sido infectado con *T. asperellum* y cuando éste y *F. verticillioides* coexisten en la planta.

Los SWEETs se han localizado principalmente en las membranas plasmáticas de las células del parénquima del floema (Chen *et al.*, 2012), aunque también se presentan en órganos reproductivos, como los transportadores OsSWEET11 y 14, que han sido caracterizados regulando el desarrollo reproductivo del arroz. En *Arabidopsis*, *AtSWEET8* codifica para una proteína expresada fuertemente en microesporas teniendo un importante papel en la integridad celular de las mismas. Además de los anteriores, existen otros genes que se sugiere están involucrados en el desarrollo reproductivo. Basándose en sus patrones de expresión: *OsSWEET1*, *OsSWEET2*, *OsSWEET3*, *OsSWEET4*, *OsSWEET5* y *OsSWEET15* muestran niveles altos de expresión en las flores y panículas a diferentes estadios de desarrollo. Por su parte, *AtSWEET5* y *AtSWEET7* están involucrados en el desarrollo de polen (Chen *et al.*, 2010; Yuan y Wang, 2013). En eucariotes también parecen estar asociados con el desarrollo reproductivo, ya que el gen *MtN3/saliva* está altamente expresado durante el desarrollo embrionario en las glándulas salivales (Artero *et al.*, 1998).

Además se ha encontrado un aumento en la expresión de los SWEETs cuando la planta ha sido infectada por microorganismos (Yang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012; Verdier *et al.*, 2012). En el presente trabajo se analizó la expresión del presunto transportador de azúcares *ZmSWEETα* en un curso temporal de infección con los hongos *T. asperellum* (benéfico), y el posterior reto con el patógeno *F. verticillioides* (patógeno). Cabe mencionar que la infección de las plántulas de maíz con *F. verticillioides* progresa rápidamente de 2 a 3 días cuando las semillas no pasaron por biopriming, mientras que el biopriming o germinación con *T. asperellum* mantiene a las plántulas sanas por un mayor tiempo después de la infección con *F. verticillioides* (Guzmán-Chávez, 2013). Por ello se esperaba que los resultados no fueran idénticos con los microorganismos solos o en conjunto, a pesar de que sí era factible que ambos indujeran la expresión del SWEET, debido



a que necesitan de un aporte de sacarosa por parte de la planta. Sugerimos lo anterior porque existen hongos capaces de expresar un transportador específico de sacarosa cuando invaden a la célula vegetal; entre ellos se encuentran *Trichoderma virens* que expresa a la proteína TvSUT (Vargas *et al.*, 2011) y *U. maydis* que expresa a la proteína UmSrt1 (Wahl *et al.*, 2010), ambos durante la infección al maíz.

El nivel de transcritos, *ZmSWEETα* aumentó cuando las plántulas de maíz fueron infectadas con *Fusarium* o con *Trichoderma*. En el primer caso se encontró que se producía más transcrito del SWEET a los 2 Dpi, independientemente de si las plántulas habían pasado o no por la infección previa con el hongo *T. asperellum*. Sin embargo en estas últimas, el nivel de expresión que produjo *Fusarium* fue 6 veces mayor a la inducción que se producía cuando las plántulas no provenían del biopriming. Los hongos al mismo tiempo indujeron una mayor expresión del SWEET.

También se encontró que las plántulas que pasaron por biopriming aumentaron el nivel de transcrito después de la sola infiltración con agua. Este aumento en la expresión de *ZmSWEETα* puede estar ligado al encendido de algunos genes de defensa (Guzmán-Chávez, 2013), como el gen que codifica para la fenilalanina amonio liasa (PAL). La PAL cataliza la desaminación de fenilalanina a ácido cinámico, precursor en la síntesis de lignina, necesaria para la reparación de las paredes celulares de la planta (Camarena-Gutiérrez y De la Torre-Almaraz, 2007). La lignificación de la pared celular puede inducirse cuando las plantas son heridas o infectadas por patógenos o insectos, para actuar como una barrera de protección para el resto de las células de la planta en caso de daño posterior (Santiago *et al.*, 2013). Este proceso representaría un gasto energético para el cual es posible que se requiera del reclutamiento de fuentes metabolizables de carbono.



La inducción de la expresión del SWEET en las hojas por los hongos fue transitoria, sólo al día 2, lo que podría sugerir que la planta se adaptó a la exigencia o demanda de carbono de los microorganismos.

En una asociación benéfica, las plantas permanecen vivas, asegurando un aporte prolongado de carbono al hospedante; comúnmente los hongos pueden producir invaginaciones especializadas en la célula hospedera sin destruirla, como los haustorios (Pieterse *et al.*, 2009). El crecimiento de la masa fúngica compite por los fotoasimilados dentro de los tejidos de su hospedero en donde actúa como un tejido adicional (demanda) y altera los patrones normales de reparto del carbono orgánico (Lemoine, 2013). Este podría ser el caso de *Trichoderma*, una adaptación, por lo que tanto el metabolismo como el transporte pudieran regularse y observarse como un incremento transitorio en la expresión del SWEET.

Por otra parte, los microorganismos patógenos pueden provocar la necrosis del tejido (estilo de vida necrótrofo) generalmente a través de la producción de fitotoxinas y enzimas despolimerizantes que degradan las células de la planta, para posteriormente alimentarse de ellas (Pieterse *et al.*, 2009). Algunos patógenos exhiben ambos tipos de nutrición, cambiando de un crecimiento biótrofo a uno necrótrofo (hemibiótrofos). *F. verticillioides* es un hongo hemibiótrofo por lo que la disminución en la expresión del SWEET podría ser efecto del comienzo de la necrosis del tejido.

Esta inducción transitoria del SWEET del maíz por los dos hongos se ha observado también para *AtSWEET12* cuando *Arabidopsis* fue infectada por el hongo patógeno *G. cichoraceaum*, con un máximo en la expresión (15 veces) a las 8 h post-infección, seguido de una reducción de mensajeros a las 12, 24 y 72 h de 10, 2.5 y 3 veces de expresión, respectivamente (Chen *et al.*, 2010).

El nivel de expresión de *ZmSWEET α* aumenta 8 veces en las hojas cuando ambos microorganismos coexisten en la planta, en comparación con el nivel en las



plantas sin infectar. El incremento podría deberse a diferentes mecanismos de acción entre los que se podrían incluir una modificación a nivel hormonal, efectos a distancia provocados por la producción y secreción de moléculas efectoras, o un efecto directo por establecimiento del microorganismo en la zona de infección.

Modificación hormonal

Aunque no se ha reportado que las hormonas tengan como blanco la región promotora de los genes SWEET, se ha visto por análisis de expresión por microarreglos, que el ácido abscísico podría tener un papel importante en el aumento en la expresión del SWEET (ANEXO VIII). Este efecto podría ser provocado por los hongos, ya que ambos tienen la capacidad de modificar las concentraciones hormonales de la planta, cambios debidos a la producción de hormonas propias del hongo o por la inducción de la síntesis y/o producción de éstas por parte de la planta.

La inoculación con *Trichoderma asperellum* aumenta los niveles de la auxina ácido indolacético desde las 8 hasta las 48 h en embriones de maíz germinados con el hongo (Arciniega-Ruíz, 2012), mientras que *T. virens* sintetiza compuestos indólicos que afectan el sistema radicular de las plántulas de *Arabidopsis silvestres*. Las mutantes de *Arabidopsis* en genes involucrados en el transporte y señalización por auxinas redujeron el crecimiento y desarrollo de la raíz, efectos provocados cuando se inocula *T. virens* en la planta (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Además, *T. asperellum* induce la expresión de varios genes involucrados en las vías de síntesis del ácido salicílico y del ácido jasmónico (Guzmán-Chávez, 2013) e induce cambios en los niveles de ambas hormonas (Segarra *et al.*, 2007), que dependiendo de sus niveles y localización afectan la producción de metabolitos para la defensa de la planta. En vista de que el aumento en la acumulación de biomasa y la síntesis de compuestos para la defensa necesitan de esqueletos carbonados, es posible que la regulación del transporte de carbohidratos sea muy importante y pueda darse a través de un efecto hormonal.



Por su parte, *F. verticillioides* aumenta los niveles de ácido salicílico (De la Torre *et al.*, 2010) aunque mantiene altos los niveles de ácido abscísico y ácido giberélico en embriones de maíz durante la germinación (Arciniega-Ruiz, 2012).

A la fecha existe un reporte en el que el transportador de hexosas *VvHT5* en hojas de uva fue altamente inducido tanto en la infección con el hongo *Erysiphe cichoracearum* como en respuesta a herida y bajo tratamiento con ácido abscísico. Ello ha sugerido un papel clave del ABA en la regulación de este transportador en respuesta a la infección por patógenos biótropos (Hayes *et al.*, 2010).

Alteración en el metabolismo de la planta

Cuando *T. virens* se establece en la raíz, se ha observado un aumento en la toma de CO₂ en hojas, así como un aumento en los transcritos de la subunidad pequeña de Rubisco. Estos dos incrementos dependen de la degradación de sacarosa, ya que las mutantes para la invertasa citosólica de *Trichoderma* no muestran estos efectos (Vargas *et al.*, 2009). Por tanto, una mayor toma de sacarosa en las raíces por parte del hongo, representa una mayor demanda de fotoasimilados, lo cual alteraría sistemáticamente el metabolismo de la planta. Esto podría aumentar la expresión del SWEET en las hojas. La coexistencia de un microorganismo biocontrol y de un microorganismo patogénico aumentaría la demanda de carbohidratos y explicaría el aumento en los niveles del SWEET.

El aumento en el eflujo de carbono de las hojas, si es que es el resultado final del incremento en el nivel de expresión de *ZmSWEET α* , asociado al retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad ocasionados por *F. verticillioides* cuando las plántulas han sido sometidas primero al biopriming con *T. asperellum*, puede explicarse si consideramos que *Trichoderma* prefiere instalarse en las raíces, por lo que la salida de azúcares de la hoja sería para abastecer la demanda de *Trichoderma* en ellas y mantener la síntesis de compuestos que benefician el crecimiento de la planta y la defensa contra patógenos. Para probar que el flujo de carbono ha cambiado, sería necesario determinar el contenido de



azúcares en los apoplastos de la hoja y/o en las raíces después de la infección y determinar si esta asociado a un aumento en los niveles de ZmSWEET α por efecto del patógeno, además de caracterizar la actividad de transporte de ZmSWEET α .

Efectores del hongo con actividad de factor transcripcional en la planta

Durante la interacción de una planta con un microorganismo se establece un diálogo molecular en el que ambos pueden percibir la presencia del otro de manera específica, e incluso alterar la respuesta de defensa del organismo. Algunos efectores de hongos son factores transcripcionales con una alta especificidad por su blanco en la planta, aunque también son capaces de inducir la expresión de un número significativo de genes en las células del hospedero (Streubel *et al.*, 2013).

Trichoderma prefiere establecerse en la raíz, por lo cual el efecto observado pudiera ser indirecto y a distancia, dado por alguna proteína efectora. A la fecha sólo se ha descrito una proteína efectora en *T. virens*, la Sm1, que se ha mostrado como evocador, debido a que carece de actividad tóxica contra plantas y microorganismos, pero es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes relacionados con la defensa como quitinasas y glucanasas, tanto local como sistémicamente (Djonović *et al.*, 2006). Además, es interesante que se haya visto que la expresión de Sm1 es controlada por la hidrólisis de sacarosa, que es tomada por Trichoderma de los exudados de la raíz. Lo anterior se propone debido a que las mutantes para la invertasa citosólica de *T. virens* son incapaces de expresar a Sm1 (Vargas *et al.*, 2009). Por ello es posible que para mantener los efectos benéficos, aún en presencia del hongo patogénico, *T. virens* induzca la expresión del SWEET a través de un efector que viaja hasta las hojas. Para probarlo se hace necesario obtener los efectores de *T. asperellum* y ponerlos en contacto o introducirlos en la célula vegetal.



Por su parte, *F. verticillioides* es un hongo ampliamente conocido por su habilidad de colonizar el maíz y por su alta producción de fumonisina B₁; de hecho, se ha observado una clara correlación entre la inoculación de las semillas con cepas productoras de fumonisinas y el desarrollo de los síntomas de enfermedad (Baldwin *et al.*, 2014). La FB₁ se ha sugerido como un factor de virulencia y tiene al menos tres blancos conocidos en las plantas, la ceramida sintasa del retículo endoplásmico, la ATPasa de protones de la membrana plasmática y las β-1,3-glucanasas en maíz. En las dos primeras enzimas la toxina reduce su actividad, lo que lleva a un incremento en las bases esfingoideas y cambios en la toma de nutrientes, mientras que para la tercera enzima induce una isoforma ácida e inhibe dos básicas, esta modulación podría contribuir a la colonización por *F. verticillioides* (Gutiérrez-Nájera, 2005; Sánchez-Rangel *et al.*, 2012; Baldwin *et al.*, 2014). Este efecto de la FB₁ puede llevar a la salida de solutos de una manera rápida, sin inducir la expresión de un SWEET, por lo que *Fusarium* no sería el responsable directo de la expresión del SWEET. Consideramos lo anterior en vista de que experimentos en el laboratorio muestran una alteración de la permeabilidad membranal en embriones germinados con *F. verticillioides* a partir de las 18 h del crecimiento con el hongo (Calzada-Alejo, 2011).

No podemos descartar que *Fusarium* también regule la expresión del SWEET y que lo haga a través de la producción de efectores. Entonces, si cada hongo produjera sus respectivos efectores, estos podrían estar tomando control sobre la expresión de los SWEETs, de manera similar a como lo hace el patógeno *X. oryzae* en arroz (Yang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010), para cumplir con sus requerimientos de carbono al alimentarse con los azúcares liberados por estos transportadores. Además, resulta muy probable que existan diferentes blancos para cada efector que contribuyan en conjunto con la infección de la plántula, tal como sucede con los efectores TAL de *Xoo*, en donde se ha demostrado que hasta 5 SWEETs pueden ser manipulados para favorecer la enfermedad (Streubel *et al.*, 2013).



En el caso de las interacciones con microorganismos benéficos con la planta, se han identificado los genes *MtN3* en *Medicago truncatula*, inducidos durante los diferentes estadios de la nodulación en la formación de micorrizas generada por *Rhizobium meliloti*, aunque se desconoce si la inducción se debe a un efector específico introducido a la célula vegetal por el hongo (Gamas *et al.*, 1996).

La presencia de efectores y un efecto a distancia puede ser una respuesta a la sobreexpresión de *ZmSWEET α* , que explicaría el aumento de 8 veces en la expresión del SWEET cuando se encuentran en la planta ambos hongos; los cuales posiblemente se encuentren en la hoja. Pese a que *Trichoderma* coloniza suelos y raíces, se han reportado algunas variedades como *T. pseudokoningii* y *T. harzianum* que también son capaces de establecerse como endófitos y viajar por el tallo desde el sitio de inoculación en plantas de maíz hasta las hojas (Sobowale *et al.*, 2011). Los datos que hasta ahora se obtuvieron demuestran que en las hojas sí hay presencia del hongo, por lo que si el hongo produce efectores éstos son directamente secretados en las hojas y es por ello que se incrementa la expresión del SWEET en la hoja.

En el caso de *F. verticillioides*, puede viajar sistémicamente hasta las partes superiores de la planta (Munkvold y Desjardins, 1997), y se encontró que efectivamente a nivel microscópico lo hay en las hojas. Sin embargo, no se detectó que se tratara de *F. verticillioides*; es posible que el crecimiento acelerado de *Trichoderma* impida detectar el crecimiento de *Fusarium* en la placa de PDA, o bien que esté ejerciendo su efecto de micoparásito estrangulando al hongo patógeno.

Si ambos hongos se mantienen en las hojas, ello también explicaría que ambos estén en competencia por los nutrientes de la planta, y el aumento en la expresión del *ZmSWEET α* . Sin embargo, no se pueden descartar que algunos efectos a distancia o de manera sistémica también puedan estar ocurriendo y tengan efecto



en la movilización de carbono y por ende en la modulación de la expresión de genes de transporte de azúcares.

Lo anterior hace interesante conocer cuáles son las moléculas involucradas en la inducción del transportador SWEET, así como de cuántos SWEET en realidad está expresando el maíz y en qué tejidos.



XI. CONCLUSIONES

- El gen *ZmSWEETα* clonado del maíz chalqueño se traduce a proteína en las células HEK293 y se localiza en la membrana.
- Su topología en la membrana es similar a la descrita para el SWEET de *Arabidopsis*, con siete cruces transmembranales.
- El transcrito de *ZmSWEETα* aumenta cuando la planta interacciona, tanto con el hongo benéfico como con el patogénico, aunque el nivel del transcrito es más alto cuando la planta ha sido infectada primero con el hongo benéfico y posteriormente con el patogénico.
- *T. asperellum* fue identificado por fenotipo y genotipo en hojas, pero no se logró detectar a *F. verticillioides* en las plantas que fueron infectadas con ambos.



XII. PERSPECTIVAS

1. Medir la expresión de *ZmSWEETα* en diferentes estadios de la planta y en plantas sometidas a diferentes tratamientos:
 - a) Estrés salino
 - b) Otros microorganismos patógenos y no patógenos de maíz.
 - c) Compuestos efectores (FB₁ y Sm1)
 - d) Hormonas
2. Caracterizar la actividad de transporte de azúcares en un sistema heterólogo como levadura o en células HEK293.
3. Determinación de los niveles de sacarosa y glucosa en los apoplastos de las hojas de las plantas que pasaron por el tratamiento con los hongos.
4. Determinación del papel fisiológico de *ZmSWEETα* a través de la producción de mutantes sobreexpresoras o suprimidas.
5. Determinación de la localización de *ZmSWEETα* en protoplastos de maíz
6. Búsqueda de más SWEETs en maíz.



XIII. ANEXOS

ANEXO I. Purificación de producto de PCR de gel de agarosa

Los productos de PCR resueltos en gel de agarosa se purificaron empleando el Kit MinElute Gel Extraction de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para lo cual se cortaron aproximadamente 300 mg del gel que contenía el amplicón de interés, y se le agregaron 900 μ L de amortiguador QC. Se incubó a 50°C hasta que el gel se disolvió por completo. Posteriormente se agregó un volumen igual de isopropanol y se mezcló. Para unir el DNA, se aplicó la muestra a la columna MinElute y se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm (16,000 x g). Se descartó el sobrenadante, se agregaron 500 μ L de amortiguador QC y se volvió a centrifugar. Para lavar se agregaron 750 μ L de amortiguador PE y se centrifugó por 1 min, se descartó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm (16,000 x g) por 1 min. Finalmente, para eluir el DNA se agregaron 30 μ L de amortiguador EB en el centro de la membrana, dejando reposar la columna por 4 min y posteriormente centrifugando por 1 min a 13,000 rpm (16,000 x g). La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso.

ANEXO II: Transformación por choque térmico

Preparación de células competentes

Para obtener células competentes se tomó una asada de un stock de glicerol con la cepa de interés y se inoculó en 10 mL de caldo Luria (LB), se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 2 mL del cultivo y se transfirieron a 200 mL de caldo LB, los cuales se incubaron con agitación (200 rpm) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.37 a 590 nm. El cultivo se repartió en 4 tubos Falcon de 50 mL estériles y fríos, se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C por 7min. El botón obtenido se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂, después se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min a 4°C, los botones resultantes se resuspendieron en 10 mL de solución de CaCl₂ fría, se juntaron en un mismo tubo Falcon y se dejaron reposar en hielo por 30 min. Transcurrido el



tiempo, se centrifugó a 3,000 rpm por 7 min a 4°C y se resuspendió el botón en 2.5 mL de CaCl₂. El volumen obtenido se repartió en alícuotas de 100 µL en tubos de 1.5 mL. Finalmente las células se congelaron con N₂ líquido y se almacenaron a -70°C.

Choque térmico

Se agregaron 10 µL de plásmido resultantes de la ligación, a 60 µL de células competentes, se mezcló cuidadosamente por inversión y se colocaron en hielo por 20 min. Posteriormente se incubó a 42°C por 1 min y se colocó en hielo por otros 2 min. Entonces se le agregaron 900 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se dejó incubando a 37°C por 2 h con agitación (150 rpm). Transcurrida la incubación, se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm (16,000 x g) y el botón se resuspendió en 100 µL de caldo LB.

ANEXO III: Purificación del plásmido con Kit Zyppy Plasmid Miniprep

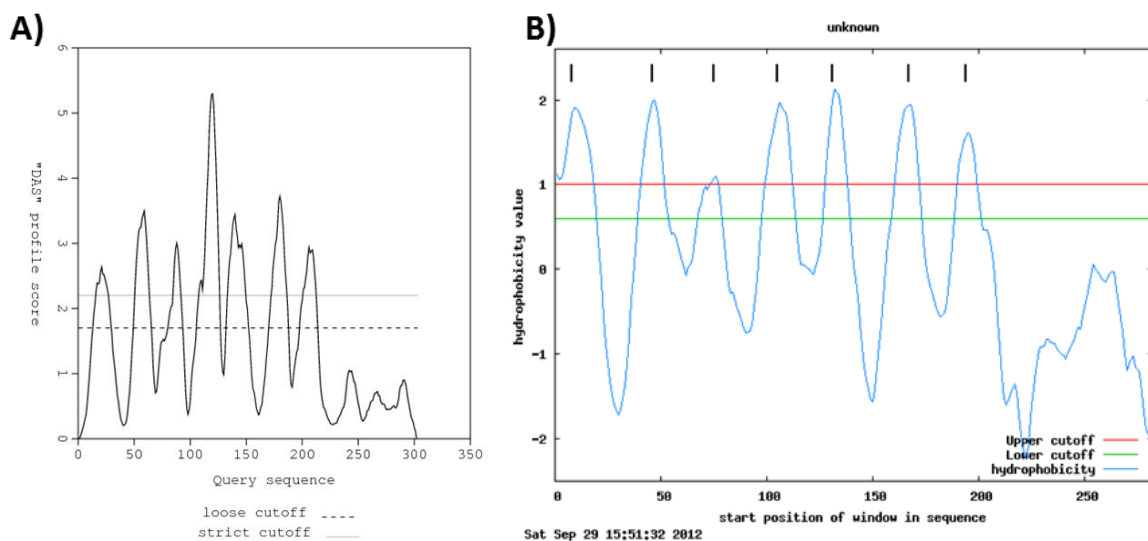
Con una punta de micropipeta estéril se tomaron 2 colonias transformantes y se sembraron en 4 mL de caldo LB con el antibiótico adecuado según el plásmido trabajado, se incubó con agitación (200 rpm) toda la noche. El cultivo resultante se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g)/30 s y el botón se resuspendió en 600 µL de agua estéril, posteriormente se agregaron 100 µL de amortiguador de lisis 7x y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Posteriormente se agregaron 350 µL de amortiguador de neutralización y se mezcló. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g)/4 min y el sobrenadante se transfirió a la columna Zymo-Spin™ IIN. Se centrifugó a 13,000 rpm (16,000 x g) por 15 seg. Posteriormente se agregaron 200 µL de amortiguador Endo-wash, centrifugando durante 30 seg. Para lavar la columna se añadieron 400 µL de amortiguador de lavado Zyppy a la columna y se centrifugó durante 1 min. Para eluir se adicionaron 30 µL de agua estéril a la matriz de la columna y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó por 30 s y se cuantificó el plásmido.



ANEXO IV: Propagación del vector pcDNA™ 3.2/V5-DEST

La propagación de este vector se realizó transformando 1 μL del vector en 100 μL de células competentes de *E. coli* DB3.1, empleando como marcador de selección medio LB agar con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol. La cepa empleada fue *E. coli* DB3.1 debido a que el vector pcDNA™ 3.2/V5-DEST contiene al gen *CcdB*, el cual se traduce en la proteína CcdB capaz de interferir con la DNA girasa y por tanto inhibir el crecimiento de la mayoría de las cepas de *E. coli*. Cuando ocurre la recombinación por Gateway® Technology este gen es reemplazado por el gen de interés. La cepa *E. coli* DB3.1 cuenta con una mutación en su girasa (*gyrA462*), lo cual la vuelve resistente al efecto de CcdB (Gateway®, 2003).

ANEXO V: Análisis de hidrofobicidad en A) DAS y B) TopPred. En ambos casos se muestran 7 posibles cruces transmembranales

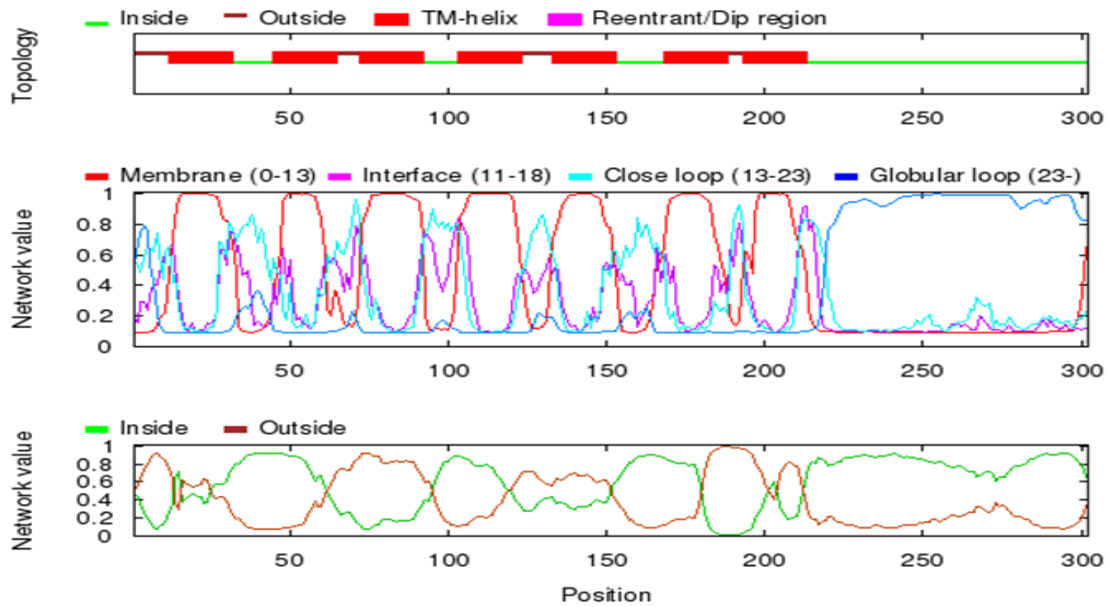




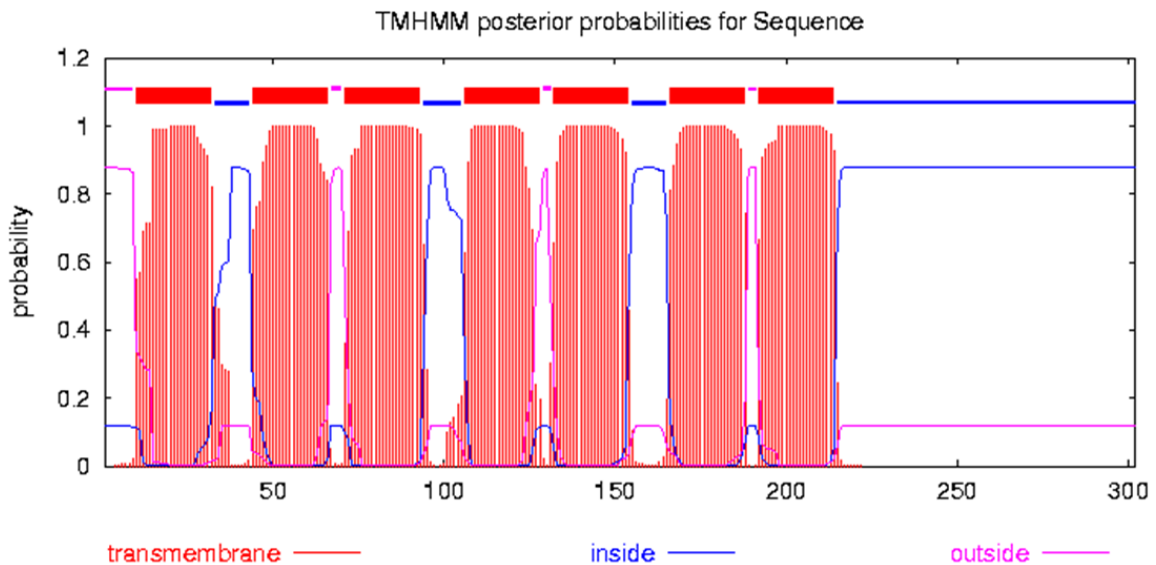
Predicción de la topología en los programas informáticos OCTOPUS, TMHMM y PHOBIUS. También muestran 7 posibles cruces transmembranales.

OCTOPUS

Predicted topology:

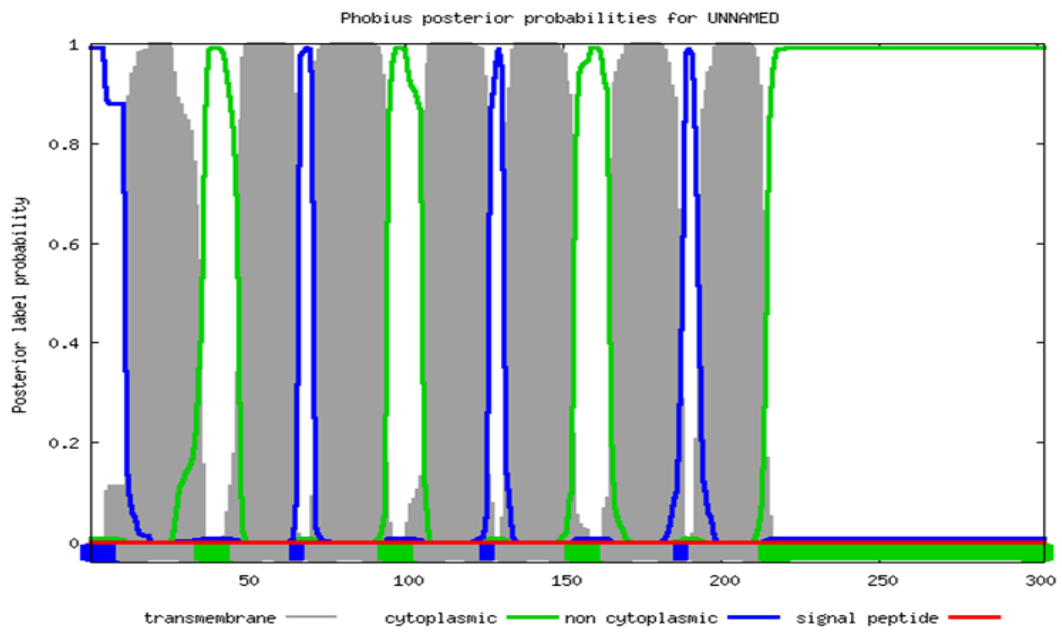


TMHMM



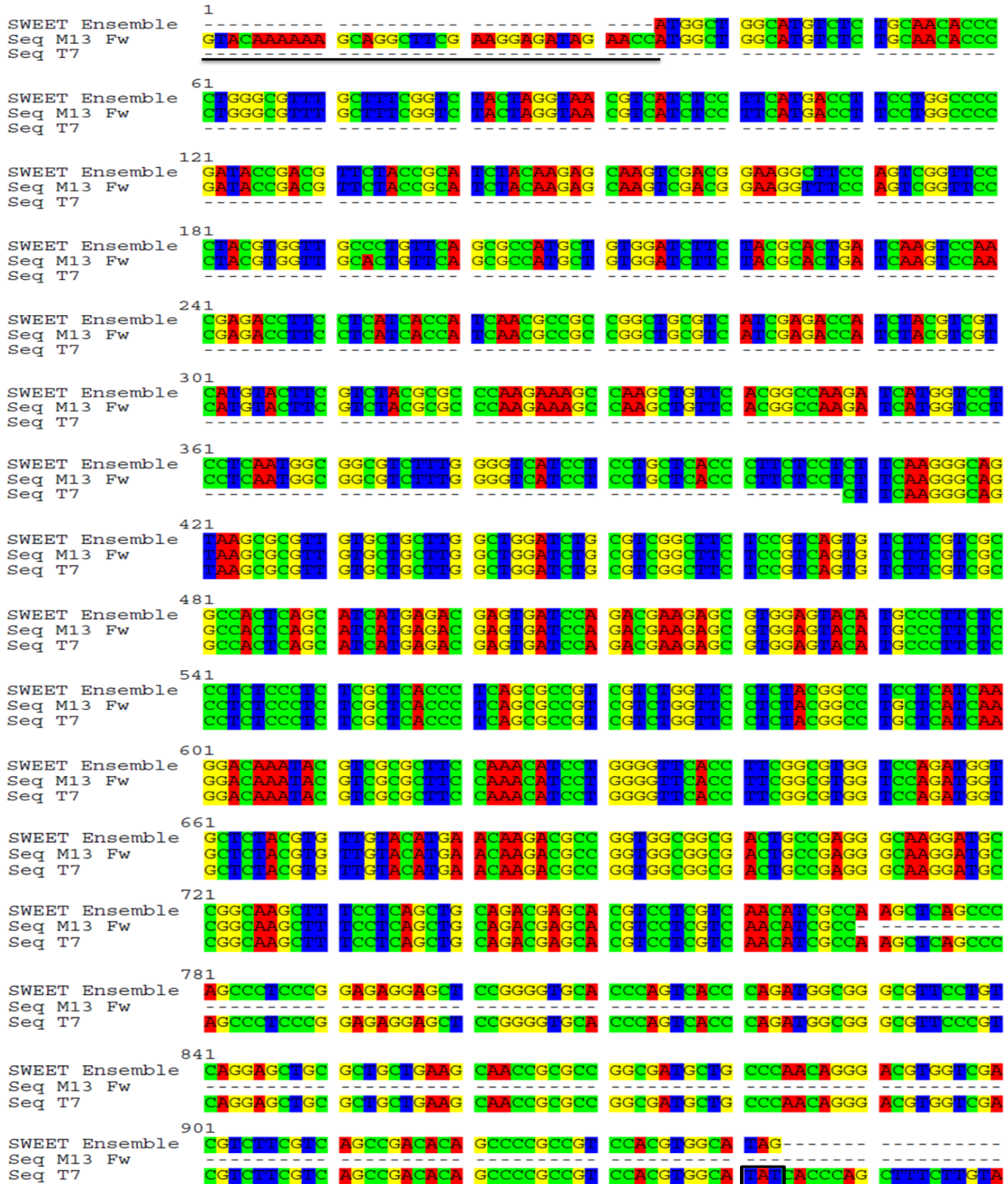


PHOBIUS





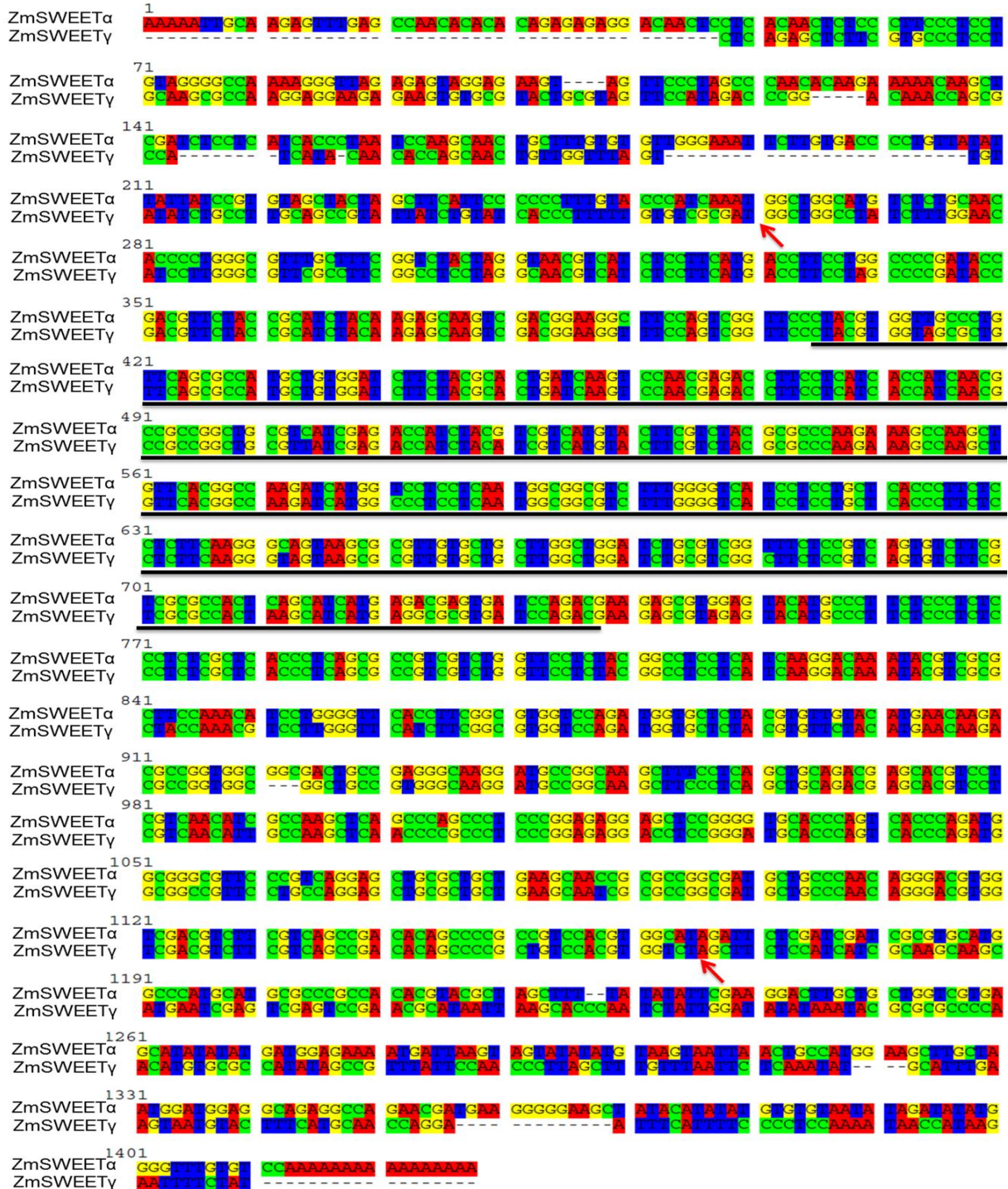
ANEXO VI: Secuencia de la construcción pDONR™221-ZmSWEETα. Se encuentran subrayados los sitios de recombinación *att* y marcado en negro el codón de paro modificado para expresar el epítipo V5 para la identificación de la proteína recombinante por ensayo de Western Blot.





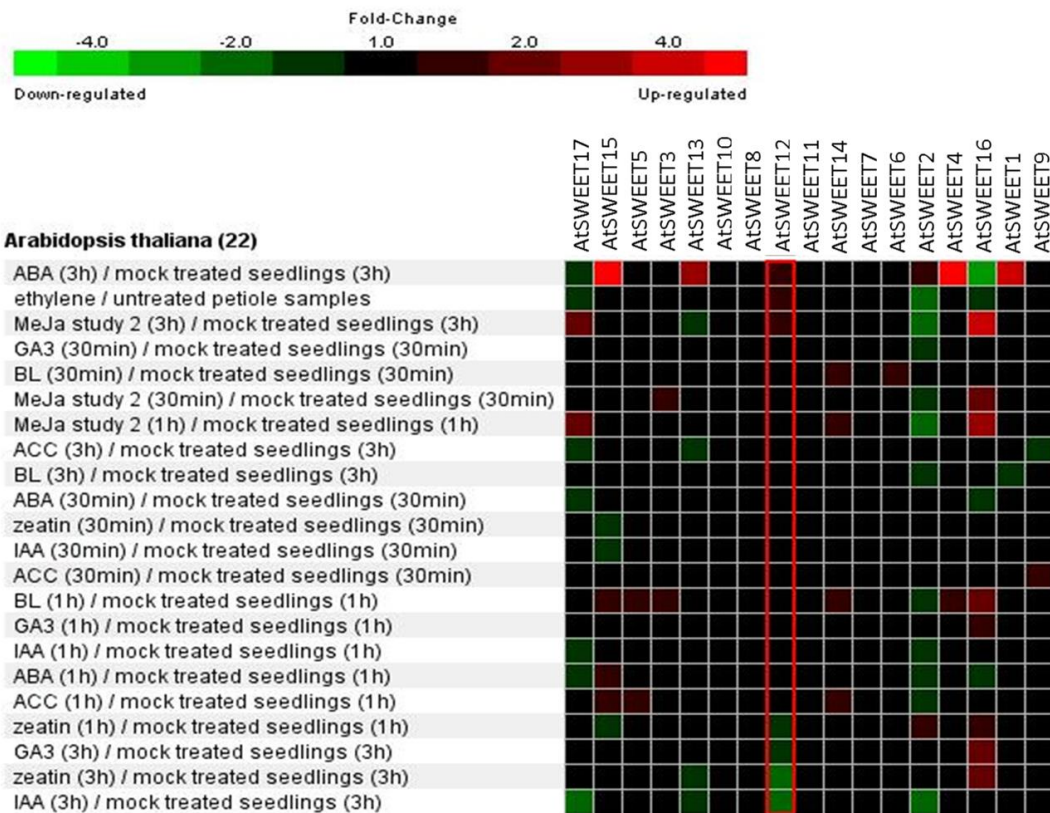
ANEXO VII: Comparación entre las secuencias *ZmSWEETα* y *ZmSWEETγ*.

Ambas son secuencias putativas MtN3 de maíz, obtenidas de la base de datos del NCBI. Subrayado se observa la zona que fue amplificada en este trabajo. Se señalan con flechas los codones de inicio y paro.





ANEXO VIII: Expresión de los *AtSWEET* bajo diferentes tratamientos con hormonas. La expresión más alta se da con ácido abscísico en los genes *AtSWEET 15*, *AtSWEET4* y *AtSWEET1*, en tanto que *AtSWEET16* es el gen mayormente sobreexpresado ante tratamientos con hormonas. ABA=Ácido abscísico, MeJa= Metil jasmonato, GA= Ácido giberélico, BL= Brasinolidina, ACC= Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, IAA= Ácido indolacético. El análisis se llevo a cabo empleando la herramienta Perturbations de Genevestigator.





XIV. REFERENCIAS

- Aramemnon 8.0. 2002-2013. Plant membrane protein database. Botanical Institute University of Cologne.
<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>
- Arciniega-Ruiz JM. 2012. Cambios en los niveles hormonales de embriones de maíz inducidos durante su interacción con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Artero RD, Terol-Alcayde J, Paricio N, Ring J, Bargues M, Torres A, Pérez-Alonso M. 1998. *Saliva*, a new *Drosophila* gene expressed in the embryonic salivary glands with homologues in plants and vertebrates. *Mechanisms of Development* 75, 159-162.
- Ayre BG. 2011. Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Molecular Plant* 4, 377-394.
- Baldwin TT, Zitomer NC, Mitchell TR, Zimeri AM, Bacon CW, Riley RT, Glenn AE. 2014. Maize seedling blight induced by *Fusarium verticillioides*: Accumulation of fumonisin B₁ in leaves without colonization of the leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 2118-2125.
- Barron D. 1997. RNAgents total RNA isolation system. *Promega Notes Magazine*. 61, 33.
- Bonifaz, A. 2010. *Micología Médica Básica*. 3a ed. Mc Graw Hill. México. pp.394.
- Braun DM. 2012. SWEET! The pathway is complete. *Plant Science* 335, 173-174.



- Braun DM, Wang L, Ruan YL. 2014. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany* 65, 1713-1735.
- Brunkard JO, Runkel AM, Zambryski PC. 2013. Plasmodesmata dynamics are coordinated by intracellular signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 16, 614-620.
- Büttner M. 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581, 2318-2324.
- Calzada-Alejo. 2011. Cambios en el patrón de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas por la presencia de *Fusarium verticillioides* durante la germinación de embriones de maíz. Detección de las proteínas por anticuerpos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Camarena-Gutiérrez G, De la Torre-Almaraz R. 2007 Resistencia adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo* 13, 157-162.
- Chaudhuri B, Hörmann F, Frommer WB. 2011. Dynamic imaging of glucose flux impedance using FRET sensors in wild-type *Arabidopsis* plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 2411-2417.
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 206-211.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu XQ, Guo WJ, Kim JG, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468, 527-534.



- Chu Z, Yuan M, Yao J. 2006. Promoter mutations of an essential gene for pollen development result in disease resistance in rice. *Genes & Development* 20, 1250–1255.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149, 1579-1592.
- De la Torre-Hernandez 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.
- Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerly CM. 2006. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense response and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 838-853.
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D. 2012. Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* 17, 413-422.
- Domijan A-M. 2012. Fumonisin B₁: A neurotoxic mycotoxin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63, 531-544.
- Druzhinina IS, Seidl-Selboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature* 9, 749-759.



- Ferrigo D, Raiola A, Piccolo E, Scopel C, Causin R. 2014. *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Pathology* 96, 133-142.
- Gamas P, Carvalho F, Lescure N, Cullimore J. 1996. Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 233-242.
- Gateway. 2003. Gateway[®] Technology. A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. Invitrogen Corporation.
- Gateway. 2010. pcDNA[™]3.2/V5-DEST and pcDNA[™]6.2/V5-DEST Gateway[®] Vectors. Gateway[®]-adapted destination vectors for cloning and expression of C-terminal V5 fusion proteins in mammalian cells. Invitrogen Corporation.
- Gateway. 2012. Gateway[®] pDONR Vectors. Invitrogen Corporation.
- Gregory PJ. 2006. Plant roots. Growth, activity and interaction with soil. Blackwell Publishing. USA. 174-178 pp
- Gruber S, Seidl-Seiboth V. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158, 26-34.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Pasencia J, Gavilanes-Ruíz M. 2005. Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221, 589-596.



- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature* 2, 43-56.
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153, 211-221.
- Herramientas del sitio: <http://expasy.org/>
- Institut National de Santé Publique Quebec (INSPQ). 2001-2014. *Fusarium spp.* Gouvernement du Québec.
<http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/fusarium-spp>
- Kim H, Woloshuk CP. 2010. Functional characterization of *fst1* in *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24, 18-24.
- Kim S, Jeon TJ, Oberai A, Yang D, Schmidt JJ, Bownie JU. 2005. Transmembrane glycine zippers: Physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 14278-14283.
- Lager I, Looger LL, Hilpert M, Lalonde S, Frommer WB. 2006. Conversion of a putative *Agrobacterium* sugar-binding protein into a FRET sensor with high selectivity for sucrose. *Journal of Biological Chemistry* 281, 30875-83.



- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldpechamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L, Faucher M, Girousse C, Lemonnier P, Parrilla J, Durand M. 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-21.
- Leplant J, Friberg H, Abid M. 2013. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 97-111.
- Marcello CM, Steindorff AS, Da Silva SP, Silva RN, Mendes LA, Ulhoa CJ. 2010. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Reserch* 165, 75-81.
- Milne RJ, Byrt CS, Patrick JW, Grof CPL. 2013. Are sucrose transporter expression profiles linked with patterns of biomass partitioning in *Sorghum* phenotypes? *Frontiers in Plant Science* 4, 1-12.
- Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz A, Zachow C, Berg G, Zeilinger S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interaccions: Advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology* 52, 522-529.
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 495-502.
- Munkvold GP, Desjardins AE. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant disease* 81, 556-565.



- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rangel L, López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4, 701-712.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5, 308-316.
- Pinton R, Varanini Z. 2001. The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. *Marcel Dekker, Inc. USA*. 1-5.
- Samatey FA, Xu C, Popot J-L. 1993. On the distribution of amino acid residues in transmembrane α -helix bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 4577-4581.
- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray EB. 2014. *Trichoderma* Online, Systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA. [/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm](#)
- Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology* 148, 1547-1556.
- Samatey FA, Xu C, Popot JL. 1995. On the distribution of amino acid residues in transmembrane α -helix bundles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 4577-4581.
- Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J. 2005. Fumonisin B₁, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta* 235, 965-978.



- Santiago R, Barros-Rios J, Malvar RA. 2013. Impact of cell wall composition on maize resistance to pest and diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 6960-6980.
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, Horie T, Kochian LV, Munns R, Nishizawa NK, Tsay Y-F, Sanders D. 2013. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature* 497, 60-66.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I. 2007. Proteomic, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7, 3943-3952.
- Slewinski TL, Garg A, Johal GS, Braun DM. 2008. Maize *SUT1* functions in phloem loading. *Plant Signal Behavior* 5, 687–690.
- Sobowale AA, Babalola OO, Ayansina ADV, Obisesan AO. 2011. Abilities of *Trichoderma* species to persist within maize (*Zea mays*) stem long after inoculation. *British Microbiology Research Journal* 1, 95-103.
- Sonnewald U. 2011 SWEETS – The missing sugar efflux carriers. *Frontiers in Plant Science* 2, 1-2. doi: 10.3389/fpls.2011.00007
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B. 2013. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist*, 1-12.
- Talbot NJ. 2010. Living the sweet life: How does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *PLOS Biology* 8, e1000308.



- 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 Phytologist* 189, 777-789.
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology* 151, 792-808.
- Verdier V, Triplett LR, Hummel AW, Corral R, Cernadas RA, Schmidt CL, Bogdanove AJ, Leach JE. 2012. Transcription activator-like (TAL) effectors targeting OsSWEET genes enhance virulence on diverse rice (*Oryza sativa*) varieties when expressed individually in a TAL effector-deficient strain of *Xanthomonas oryzae*. *New Phytologist* 196, 1197-1207.
- Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valéro JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37, 1-20.
- Voegelé RT, Struck C, Hahn M, Mendgen K. 2001. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 8133-8138.
- Wahl R, Wippel K, Goos S, Kämper J, Sauer N. 2010. A Novel High-Affinity Sucrose Transporter Is Required for Virulence of the Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* 8, 1-11.
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E. 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 464, 123-128



- 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 Sciences USA*, E3685-E3694.
- Yang B, Sugio A, White FF. 2006. Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 10503-10508.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7342-7353.
- Young E, Poucher A, Comer A, Bailey A, Alper H. 2011. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Applied and Environmental Microbiology* 77 3311–3319.
- Yuan M, Wang S. 2013. Rice MtN3/Saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. *Molecular Plant* 6, 665-674.
- Zhang L, Hu Y, Yan S, Li H, He S, Huang M, Li L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Molecular Biology* 79, 285-293.