



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

*Trichoderma asperellum* INDUCE EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE MAÍZ Y  
AUMENTA LA ACTIVIDAD DE LA ATPasa DE H<sup>+</sup> DE LA MEMBRANA  
PLASMÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
BIOL. MONTSERRAT LÓPEZ CORIA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JORGE NIETO SOTELO  
Instituto de Biología, UNAM.

DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN  
Facultad de Química, UNAM.

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2015



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.

## AGRADECIMIENTOS

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

Se agradece al comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM
Dr. Jorge Nieto Sotelo	Instituto de Biología, UNAM.
Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por el financiamiento de: DGAPA-PAPIIT (IN217214), PAIP (50009125) y el Proyecto CONACyT 252001 para Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2015. Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis. Así mismo recibí financiamiento del Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al curso Biotecnología de hongos: alternativa de desarrollo sustentable, impartido en INECOL, Xalapa, México.

Agradecimientos especiales para la Dra. Marina Gavilanez Ruiz por la donación de anticuerpos para la detección de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP, Fosfo-treonina/serina y la proteína 14-3-3; a la QFB. Julieta Sandoval Guillén por los servicios prestados para las mediciones en HPLC; y a la QFB. Laurel E. Fábila Ibarra, por su apoyo técnico en el uso de centrifugas y el lector de microplacas.

El jurado de examen de maestría, al que se le agradece la exhaustiva revisión de la presente tesis, estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dra. Marietta Tuena Sangri	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
VOCAL	Dra Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. José de Jesús García Trejo	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dra. Irma Bernal Lugo	Facultad de Química, UNAM
SECRETARIO	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	v
Resumen .....	vi
Abstract.....	vii
Introducción.....	1
El maíz en México.....	1
La semilla del maíz.....	2
Crecimiento y elongación radicular.....	3
<i>Trichoderma asperellum</i> .....	6
<i>Trichoderma</i> , hongo biocontrol de patógenos y promotor del crecimiento vegetal.....	7
<i>Trichoderma</i> y la promoción del crecimiento.....	8
Auxinas en la planta.....	9
Auxinas endógenas.....	9
Auxinas exógenas.....	11
Auxina y desarrollo radicular.....	12
La ATPasa de protones de la membrana plasmática.....	14
Regulación de la ATPasa.....	18
<i>Regulación post-traducciona</i> l.....	19
Auxinas, la elongación celular y la ATPasa.....	22
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos particulares.....	26
Materiales y métodos.....	27

Material biológico. ....	27
Evaluación de cambios morfológicos. ....	29
Crecimiento de las plántulas. ....	29
Localización de hifas en el tejido. ....	30
Desarrollo de pelos radiculares. ....	30
Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	30
Obtención del extracto metabólico de <i>T. asperellum</i> . ....	31
Determinación de la cantidad de AIA en tejidos y en extracto metabólico de <i>T. asperellum</i> . ....	32
Improntas de tejido para detección y localización de AIA. ....	33
Prueba fisiológica de la salida de protones de la membrana plasmática. ....	34
Obtención de fracción microsomal. ....	34
Actividad de H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática. ....	35
Inmunorréplica tipo Western para detectar a la ATPasa de H <sup>+</sup> de la membrana plasmática. ....	36
Inmunorréplica tipo Western para detectar residuos fosfotreonina/fosfoserina. ....	37
Determinación de efecto de la fosforilación en la actividad de la H <sup>+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática. ....	37
Resultados. ....	39
Cambios en la arquitectura radical de plántulas de maíz debidos a la cantidad de inóculo de <i>Trichoderma asperellum</i> . ....	39
<i>Trichoderma asperellum</i> no coloniza a las radículas de la semillas a tiempos cortos de germinación. ....	41
Cambios morfológicos debidos a la presencia de <i>Trichoderma asperellum</i> . ....	44
Comparación del efecto de las auxinas y los tratamientos con <i>T. asperellum</i> en la elongación del tejido. ....	44

Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	51
Cuantificación del contenido de AIA .....	51
Detección y localización de AIA en la parte aérea y radicular de plántulas de 72 h de germinación. ....	53
Detección de acidez extracelular durante la interacción de la planta con <i>T. asperellum</i> . ....	55
Actividad de la H <sup>+</sup> -ATPasa de MP .....	56
Determinación de la cantidad de proteína 14-3-3 y Thr <sup>P</sup> .....	61
Determinación de efecto de la defosforilación en la actividad de la H <sup>+</sup> -ATPasa de MP inducida por los extractos de hongo o AIA .....	61
Discusión .....	65
<i>T. asperellum</i> y la elongación de plántulas de maíz. ....	65
El papel de las auxinas en el efecto de elongación inducido por <i>T. asperellum</i> . ....	68
La activación de la H <sup>+</sup> -ATPasa inducida por <i>T. asperellum</i> es mediante un mecanismo distinto al de la auxina. ....	73
Otros mecanismos inducidos por <i>T. asperellum</i> que tienen efecto positivo en el crecimiento. ....	76
Incremento en la absorción de nutrimentos. ....	76
Aumento en el crecimiento debido al control de patógenos en la rizósfera. ....	76
Conclusión .....	79
Perspectivas .....	79
Bibliografía .....	80
Anexo 1. H <sup>+</sup> -ATPasas de la membrana plasmática .....	89
Anexo 2. Cromatogramas de HPLC .....	91
Anexo 3. Acidificación del agar .....	94
Anexo 4. Glosario .....	95

## ABREVIATURAS

<b>AIA</b>	Ácido indol acético.
<b>CQ</b>	Centro quiescente.
<b>ETPD</b>	Extracto metabólico del cultivo de <i>T. asperellum</i> en papa dextrosa.
<b>H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP</b>	ATPasa de protones de la membrana plasmática.
<b>ISR</b>	Resistencia sistémica adquirida.
<b>LPC</b>	L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina.
<b>PD</b>	Medio de cultivo líquido papa dextrosa.
<b>PDA</b>	Medio de cultivo papa dextrosa agar.
<b>PIN</b>	Transportadores polares de auxina PIN-LIKE FORMED.
<b>PR</b>	Pelos radiculares.
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>TIBA</b>	Ácido triiodo benzoico.

---

## RESUMEN

*Trichoderma asperellum* es un hongo promotor del crecimiento de una amplia variedad de plantas. Sin embargo se sabe poco sobre el mecanismo por el cual se promueve el crecimiento. Al respecto, se ha propuesto que las auxinas son responsables del incremento en el desarrollo de plantas que están en contacto con el hongo. Aunque existen cepas de *Trichoderma* que no producen auxinas y también promueven la elongación y crecimiento de las plantas con las que se asocian. En esta tesis se comparó el efecto de *T. asperellum* y el de la auxina ácido indol acético (AIA) sobre los cambios fisiológicos en plántulas de maíz de 72 h de germinación. A nivel molecular se hizo la comparación del efecto de ambos tratamientos sobre la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP, enzima fundamental en la elongación celular.

Se encontró que después de 72 h de crecimiento con *T. asperellum*, el hongo no colonizó internamente el tejido, pero sí provocó cambios en la morfología y fisiología de la plántula. En el tejido aéreo, se indujo la elongación, mientras que en la radícula se incrementó el número de pelos radiculares. La elongación inducida por *T. asperellum* correspondió al incremento de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP. Se evaluó la actividad de la enzima en fracciones microsomales y obtuvimos que en los tejidos desarrollados en presencia del hongo, la actividad de la enzima fue mayor, sin que la cantidad de la proteína aumentara, lo que sugiere que el mecanismo de inducción en la actividad fue postraducciona. Es sabido que las auxinas pueden activar a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP, para determinar si la auxina podría ser la responsable de la activación de la enzima en plántulas que interactuaron con *T. asperellum*, primero se determinó que la cepa HK703 fuera productora de la hormona. Encontramos que la cepa si produce AIA y tanto el contacto directo como indirecto de *T. asperellum* con la semilla, lleva a que el contenido de AIA en la plántula se incremente, principalmente en la radícula, y además cambia su distribución haciéndose homogénea. La adición de una alícuota de extracto metabólico del hongo, cuyo contenido de AIA fue de 0.3 nM, a fracciones microsomales aisladas del tejido que nunca tuvo contacto con el hongo, incrementó en 112 % y 257 % la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de tejido aéreo y radícula, respectivamente, niveles superiores a la actividad registrada cuando se añadieron 10 μM de AIA a las mismas fracciones microsomales. Además se encontró que el estado de fosforilación de la ATPasa es importante en la respuesta de activación de la enzima inducida por el extracto metabólico de *T. asperellum*, efecto que difiere de la activación de la enzima cuando se añade auxina. Lo anterior sugiere que además de las auxinas hay uno o varios componentes adicionales en los exudados del hongo que afectan la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP y que podrían también contribuir al mejoramiento del crecimiento de la planta de maíz.

---

## ABSTRACT

*Trichoderma* is a plant growth-promoting fungi genus. Although they have beneficial effects on a variety of plants, there is not enough knowledge about the mechanism that improves the plant growth. The plant hormone auxin has been proposed to be responsible for enhancing the development of plants when interacting with *Trichoderma* species, but *Trichoderma* strains that do not produce auxins still promote the elongation and growth of the plants. In this work, was evaluated the physiological characteristics of maize plantlets from seeds germinated by 72 h with *T. asperellum* or auxin indolacetic acid (IAA). It was also compared the effect of both treatments at a molecular level on the activity the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, a key enzyme on promoting cell elongation.

After 72 h of plant growth with *T. asperellum*, the fungus did not internally colonize the tissues, but it made changes in the plant morphology and physiology. In the aerial tissue, the elongation was enhanced, and in the radicle, the number of radicular hairs increased. The elongation induced by *T. asperellum* was associated with the increase in the PM H<sup>+</sup>-ATPase activity and extracellular pH acidification. The increase in the enzyme activity evaluated in the microsomal fractions was no due to an increase in the protein, suggesting that the fungus increases the enzyme activity by a posttranslational mechanism. It is know that auxins induce activation of the PM H<sup>+</sup>-ATPase activity; plant auxin accumulation could be the reason for the enzyme activation on plantlets treated with the fungus. Initially, the content of auxin was determined by HPLC in a *T. asperellum* culture, and in the aerial and radicular tissues of plants treated with the fungus. *T. asperellum* strain HK703 synthesizes IAA, and the tissues from plants treated with the fungus increases their IAA levels with a change in its distribution, making IAA homogenous in all the plant. Secondly, the metabolic extract of *T. asperellum* was obtained and added to the ATPase assay medium containing microsomal fractions from roots or aerial parts of control plants. The metabolic extract increased the PM H<sup>+</sup>-ATPase activity by 112 and 257 %, on the aerial and radicular microsomal fractions, respectively. However, the raise was higher with the metabolic extract than when 10 μM IAA was added, even though the metabolic extract contained 0.3 nM IAA. Furthermore, the mechanism of activation of the PM H<sup>+</sup>-ATPase activity was different between IAA and the metabolic extract of *T. asperellum*, in the latter; the activation depends on the phosphorylation state of the enzyme. These results suggest that besides IAA another(s) compound(s) are exudated by *T. asperellum* and they could be responsible for the PM H<sup>+</sup>-ATPase activation and the beneficial effect on plant growth.

---

## INTRODUCCIÓN

### **El maíz en México.**

México es el centro de diversificación genética del maíz, lo que significa que en este País se concentra la mayor diversidad de esta especie en el mundo. El maíz pertenece al *Phylum* Magnoliophyta, clase Liliópsida, orden Poales, familia Poacea, género *Zea*, especie *mays*. Este cultivo se originó por la domesticación de gramíneas silvestres llamadas teocintles, hace aproximadamente 10, 000 años (CONABIO, 2012).

El cultivo en México se hace actualmente en un amplio intervalo de altitud y variación climática, desde el nivel del mar hasta los 3,400 msnm, en zonas con escasa precipitación, en regiones templadas, cálidas o húmedas, en escaso suelo, en diferentes épocas del año y bajo múltiples sistemas de manejo y desarrollo tecnológico (CONABIO, 2011).

En este trabajo se usó al maíz raza Chalqueño como material biológico. El término raza se ha utilizado en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (CONABIO 2012). En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz (Goodman y Bird, 1977), 64 de las cuales (29 %) se han identificado y descrito para México (Sánchez *et al.*, 2000).

El grupo Cónico incluye razas de maíz cuya característica es la forma cónica o piramidal de sus mazorcas y se distribuyen predominantemente en las regiones con elevaciones de más de 2,000 m (Sánchez, 2011). A éste grupo pertenece el maíz Chalqueño, una de las razas más productivas. Se caracteriza por sus plantas de porte alto, mazorcas grandes y cónicas con alto número de hileras. Presenta alto vigor de germinación y emergencia, ciclo largo y resistencia a la sequía en etapas medias de crecimiento (CONABIO 2010).

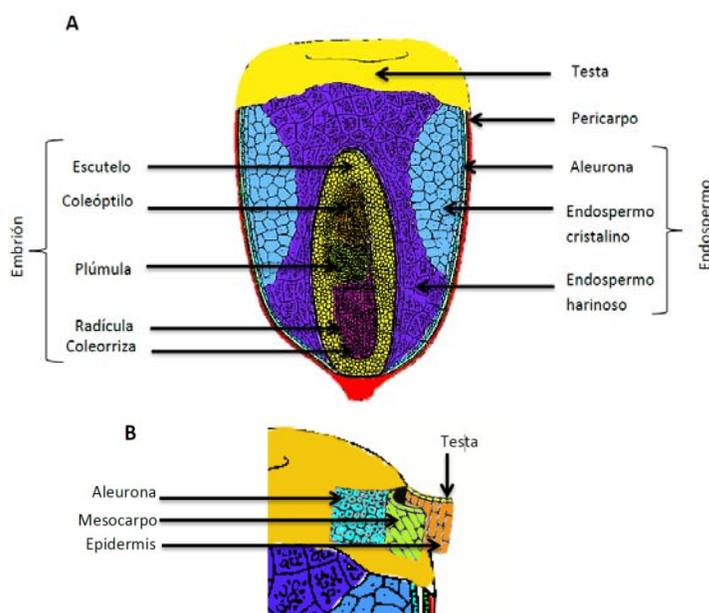
El maíz además de ser la base de la dieta mexicana, es utilizado como materia prima para la elaboración de variados productos. Si bien toda la planta es utilizada con fines diferentes, la obtención de la semilla del maíz es el principal objetivo para la producción agrícola.

---

### **La semilla del maíz.**

Se conoce botánicamente como cariósipide. Los tejidos que la conforman de la periferia hacia adentro son (Figura 1): **Testa**, cubierta impermeable más externa de la semilla; el **pericarpio**, conforma la cubierta externa; la **aleurona** es una monocapa de células contigua al endospermo, encargada de la síntesis de enzimas hidrolíticas durante la geminación; el **endospermo**, es el tejido que representa el 83% del peso de la semilla y contiene un alto contenido de almidón, el cual es usado principalmente por el embrión, durante el periodo post-germinativo; el **embrión**, que ocupa el tercio inferior de la semilla, está formado por el **cotiledón o escutelo** que tiene varias funciones, una es la de permitir el transporte de sustancias desde el endospermo hacia el embrión y otra es la de producir las enzimas necesarias para el metabolismo de las sustancias de reserva. El escutelo envuelve al **eje embrionario** que en la parte superior presenta al **coleoptilo** que funciona como capa protectora para las hojas embrionarias producidas por la **plúmula**. En la parte inferior del eje embrionario se encuentra la **radícula** que es la raíz embrionaria la cual está recubierta por un tejido protector denominado **coleorriza** (Nemose, 2008).

La semilla contiene las reservas necesarias para que el embrión germine y que le permiten nutrirse hasta que la plántula sea fotosintéticamente activa. Si bien es importante el establecimiento de la capacidad fotosintética en la planta, también es necesario que se desarrolle de manera óptima el tejido radicular, ya que el anclaje de la planta al suelo, garantiza la absorción de agua y nutrimentos (López-Bucio *et al.*, 2005; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014), y es el sitio donde se establece la interacción con los diferentes organismos que conforman la **rizósfera**, que en algunos casos ayudan al crecimiento de la planta. Un pobre desarrollo de la planta generalmente obedece a una **arquitectura radical** dañada, esto puede deberse a suelos muy compactos o secos, así como al daño por parásitos o patógenos presentes en el suelo (Bohn *et al.*, 2006).



**Fig. 1. Esquema de las partes que componen a la semilla de maíz.** A. Corte sagital de la semilla de maíz. B. Acercamiento donde se muestran las capas que forman el pericarpio y la testa. Tomado y modificado de FAO (1993 y 2001).

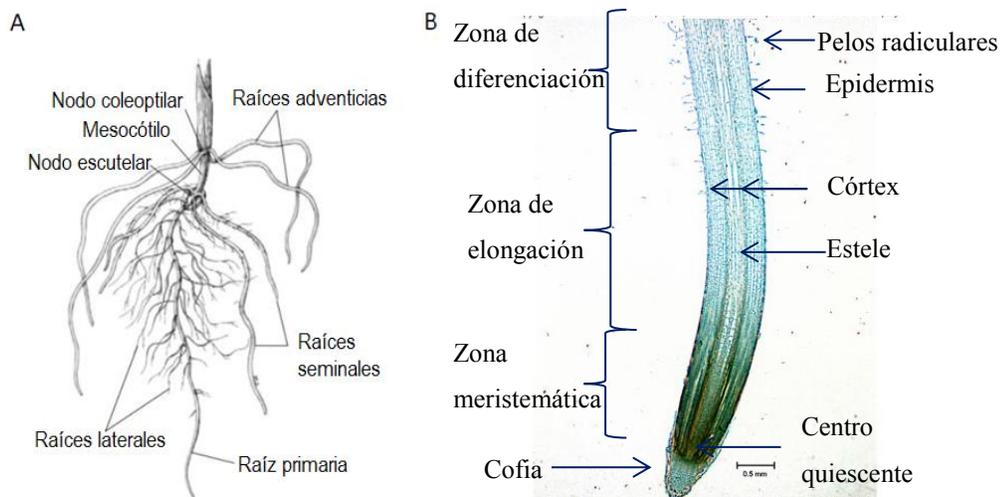
### Crecimiento y elongación radicular.

El desarrollo radicular comienza con el crecimiento de una raíz de origen embrionario, visible en semillas de maíz a los 2 o 3 días de germinación, llamada **raíz primaria** (Figura 2A). Este tejido es funcional sólo durante los primeros estadios de desarrollo de la planta. De manera característica, en el maíz presenta un número variable de **raíces seminales**, también de origen embrionario, que emergen del cotiledón, ayudan al desarrollo de la plántula al tomar agua del suelo. Otro tipo de raíces en maíz son las **adventicias**, tejido que se desarrolla en condiciones inusuales, por ejemplo con la aplicación de alguna hormona, sin embargo, diferentes autores utilizan el término adventicias para referirse a las raíces nacidas de los **vástagos** (Hochholdinger *et al.*, 2004).

En la organización longitudinal de las raíces de cereales como el maíz (Figura 2B) se observa en la parte distal a la **cofia**, zona protectora de la punta de la raíz. Por arriba de la cofia en la región central se observa el **centro quiescente** (CQ). Éste se caracteriza por tener una actividad mitótica reducida o nula, en cereales consta de 800–1200 células (Jiang

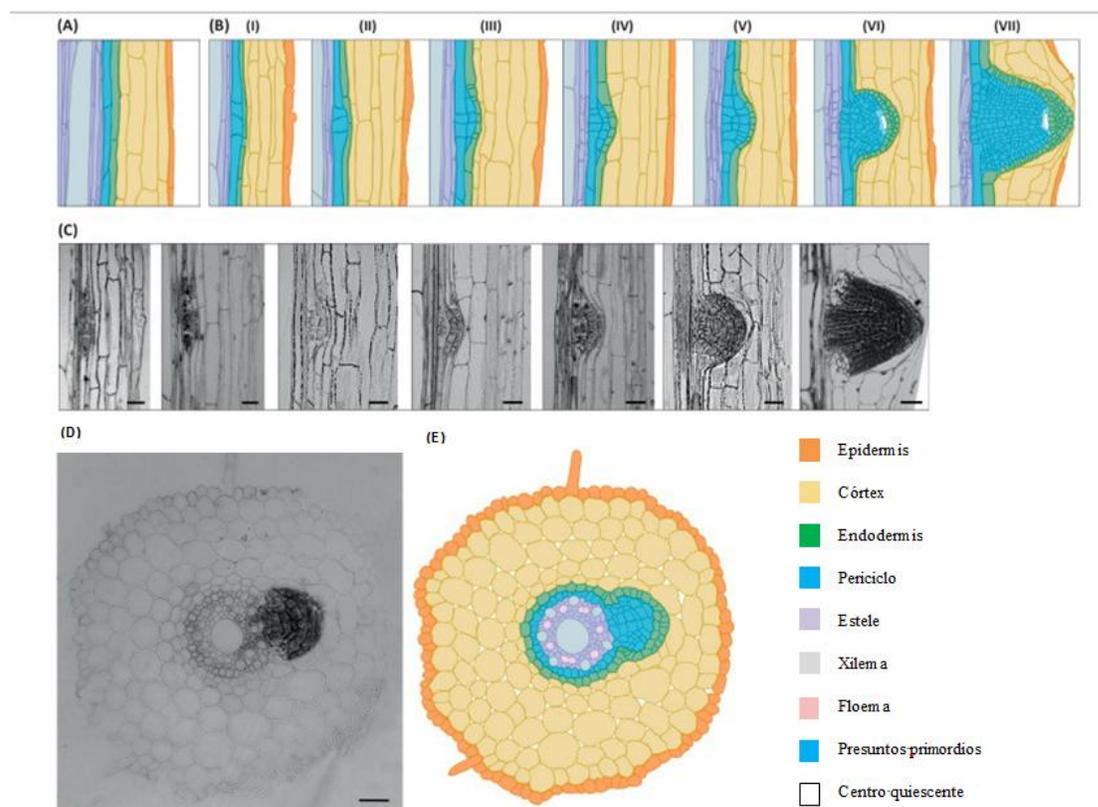
*et al.*, 2003), una cantidad muy superior en comparación con plantas dicotiledóneas en donde está formado por dos células.

Las células que se encuentran sobre el CQ son las **células “iniciadoras” o meristemáticas**, grupo de células que reciben información del CQ para dividirse y dar lugar a los diferentes tejidos que conforman la raíz, de tal manera que hay células del meristemo vascular, células del meristemo del periciclo y células del meristemo del córtex. El CQ mantiene un flujo de señales que permite que estas células se mantengan dividiendo, por lo que la formación del CQ puede tomarse como indicador de la iniciación de una raíz funcional (Bennet y Scheres, 2010) y es un paso requerido para el **crecimiento indeterminado de raíces**, en donde se ha planteado que algunas hormonas como las auxinas podrían ser clave en su especificación (Sabatini *et al.*, 1999). Cuando las células del meristemo salen de mitosis, comienza el periodo de elongación, así el grupo de células en este proceso delimita la **zona de elongación** (Bennet y Scheres, 2010). Terminada la etapa de elongación celular comienza la diferenciación, periodo definido típicamente por la aparición de **pelos radiculares**, que son extensiones citoplasmáticas de las células de la epidermis.



**Fig. 2. Arquitectura de la raíz de maíz.** A) Raíces de maíz. Tomado y modificado de Hochholdinger *et al.* (2004). B) Corte longitudinal de la raíz. Tomado y modificado de Solomon y Crawford (2010) y McGraw Hill Companies (Disponible en: <http://highered.mheducation.com>).

Transversalmente en las raíces se observan capas concéntricas de **células corticales** que varían de 8 a 15 capas y una capa de **células de endodermis** y **periciclo** que rodea el cilindro vascular (Figura 3E). En la **endodermis** y en el periciclo de plantas monocotiledóneas, se desarrollan las **raíces laterales** que se desarrollan de 6 a 10 días de germinación (Husakova *et al.*, 2013) y participan en la exploración del suelo para la absorción de agua y nutrimentos. Se ha sugerido que ciertas células del periciclo se precondicionan para desarrollar raíces secundarias mientras están en la zona meristemática (de Smet *et al.*, 2007).



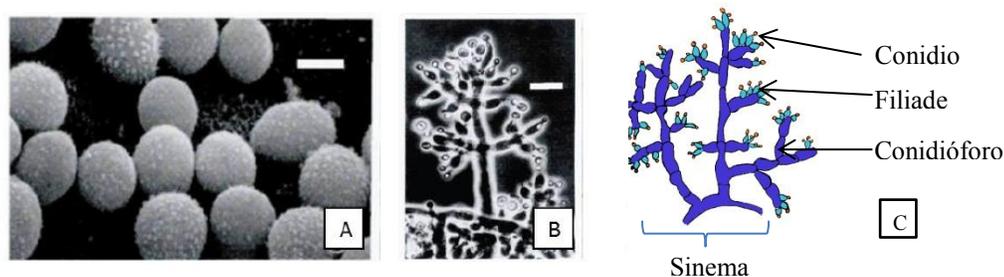
**Fig. 3. Desarrollo de raíces laterales en cebada.** **A)** Esquema de una sección longitudinal de raíz con la estructura típica de la raíz de cereales. **B)** Estados morfológicos del desarrollo de la raíz; **BI)** Iniciación o estado I, que está marcado por divisiones asimétricas, transversales y periclinales de dos células adyacentes del periciclo opuestas al eje del protofloema; **BII)** Estado 2, que consta de divisiones asimétricas periclinales que en maíz se observan aproximadamente a 21-24 nm de la punta de la raíz. Las divisiones celulares se continúan hasta el estado VII (**BIV)** cuando ha atravesado el **córtex**. Es importante remarcar que en el estado VI (**BVI)**, es visible una zona meristemática y la cofia del primordio en crecimiento. **C)** Cortes histológicos teñidos con azul de toluidina que muestran el desarrollo de la raíz secundaria. **D)** Corte transversal de raíz mostrando la organización radial de los tejidos. **E)** Esquema del corte transversal. Barra= 50  $\mu$ m. Tomado y modificado de Orman *et al.* (2013).

La raíz primaria tiene la capacidad de desarrollar raíces laterales, pero todos los tipos de raíz pueden formar pelos radiculares que como ya se había mencionado, son extensiones citoplasmáticas de las células de la epidermis que facilitan la absorción de nutrimentos y agua. Los pelos radiculares están en contacto estrecho con partículas de suelo, lo que facilita la comunicación en la interfaz suelo-raíz (McCully, 1995), en donde se encuentran microorganismos que, sumados a las condiciones ambientales influyen en el desarrollo radical. Se ha reportado que uno de estos microorganismos, el hongo *Trichoderma asperellum*, modifica la arquitectura radicular de varias especies de plantas.

### *Trichoderma asperellum*

*T. asperellum*, fue descrito en 1999 por Lieckfeldt *et al.* Es un hongo de vida libre anaerobio facultativo que pertenece a la clase Deuteromycetes y al Orden Moniliales (clasificación anamorfa) (Osorio *et al.*, 2009), está reconocido como promotor del crecimiento y del desarrollo así como un agente que aumenta la resistencia a enfermedades en algunas plantas.

Las especies del género *Trichoderma* spp. producen tres tipos de propágulos: **hifas**, **clamidosporas** (**conidio tálico** de pared gruesa que actúa como espora de resistencia) y **conidios** (Osorio *et al.*, 2009). Los conidios son esporas asexuadas (Carrillo, 2003) que tienen forma ovoide globosa, carecen de flagelos y su ornamentación es nula, se forman en el ápice o en los laterales de una **célula fiálide** (células rectas y ampuliformes, arregladas en **verticilios** cruzados), la fiálide es sostenida por un **conidióforo** regularmente ramificado que tiene forma de **sinema**, esto es, un grupo de conidióforos a menudo unidos por la base con ramificaciones en la parte superior (Figura 4). *In vitro* el hongo crece a una temperatura óptima de 29-30°C en agar papa dextrosa (PDA) (Samuels *et al.*, 1999).



**Fig. 4. *Trichoderma asperellum*.** A) Ornamentación de conidios, barra 2.5  $\mu\text{m}$ . B) Conidióforos, barra 10  $\mu\text{m}$ . C) Esquema de conidióforo. Tomado y modificado de Samuels *et al.* (1999).

---

## ***Trichoderma*, hongo biocontrol de patógenos y promotor del crecimiento vegetal.**

La colonización de las raíces de la planta por hongos del género *Trichoderma* cambia el transcriptoma y el proteoma de la planta, con el aumento en la expresión de genes y/o proteínas relacionados a la respuesta al estrés biótico y abiótico, además de los involucrados en el crecimiento. El hongo induce incremento en el crecimiento vegetal, la absorción de nutrimentos, la eficacia de fertilizantes, el porcentaje y la tasa de germinación e induce la resistencia sistémica a enfermedades (Brotman *et al.*, 2013).

Uno de los beneficios para la planta infectada con el hongo *Trichoderma* es la resistencia a una infección posterior, actividad denominada biocontrol de patógenos. Se ha postulado que *Trichoderma* induce la respuesta de defensa de la planta y lo hace a través de la señalización mediada por la vía del ácido jasmónico/etileno en la denominada resistencia sistémica inducida (ISR), que es la vía que se enciende por la presencia de microorganismos benéficos y que resulta en una respuesta rápida y fuerte a un atacante posterior. No se descarta la participación de otras vías de señalización durante la interacción *Trichoderma*-planta, como la del ácido salicílico, en la que la resistencia sistémica adquirida (SAR) tiene lugar. La SAR se enciende generalmente cuando hay microorganismos patógenos (Guzmán-Chávez, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2013).

Aunque con una contribución menor a la inducción de respuesta de defensa contra patógenos, están las moléculas que *Trichoderma* sintetiza al estar en contacto directo con otros microorganismos como antibióticos, micotoxinas y enzimas que degradan la pared celular de hongos y bacterias, como quitinasas, xilanasas y expansinas, y proteasas (Harman *et al.*, 2004; Reithner *et al.*, 2011). El efecto antagonista y de micoparasitismo del género *Trichoderma* se ha demostrado sobre hongos patógenos como *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Sclerotium*, entre otros (Osorio *et al.*, 2009; Ferrigo *et al.*, 2014). La alta tasa de crecimiento del género *Trichoderma* es uno de los factores que favorece la reparación de su pared celular y le permite sobrevivir a su propia batería extensa de enzimas cuando ataca a los microorganismos cercanos.

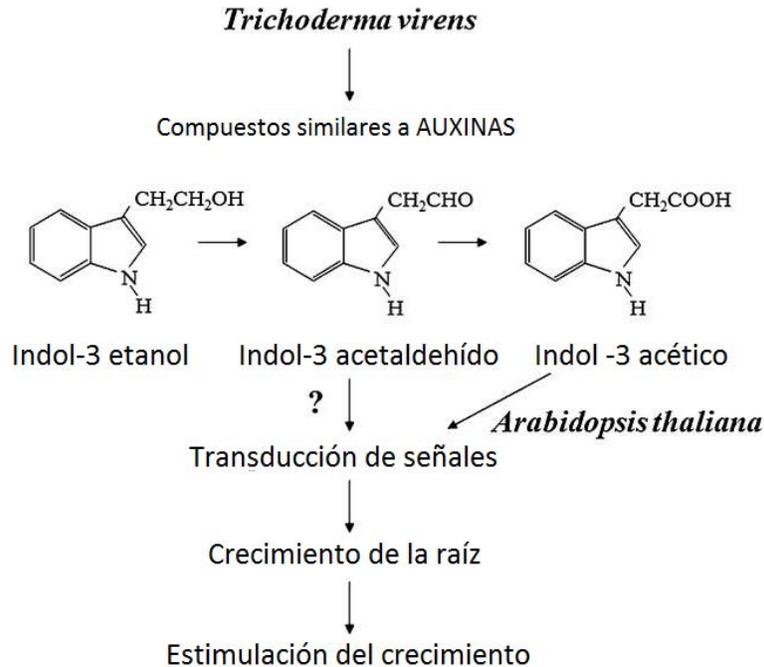
### ***Trichoderma* y la promoción del crecimiento.**

El género *Trichoderma* es ampliamente utilizado en la horticultura por su papel en la promoción del crecimiento vegetal (Harman *et al.*, 2004). Múltiples estudios han demostrado el efecto benéfico del hongo sobre el crecimiento y en el porte de las plantas inoculadas con él. Por ejemplo la cepa T22 incrementa el desarrollo de raíces en una enorme variedad de plantas en donde están incluidas maíz, melón, algodón y calabaza, además de los helechos (Harman *et al.*, 2000). Este efecto dura toda la vida de la planta y puede ser inducido por una poca cantidad del hongo, menos de 1 g ha<sup>-1</sup> aplicado como tratamiento a las semillas (Harman *et al.*, 2004). Se ha sugerido que el cambio en la arquitectura radical inducido por *Trichoderma* está relacionado con el incremento en la resistencia a sequía y probablemente a la resistencia en suelos compactados.

Contreras-Cornejo *et al.* (2009) reportaron que las auxinas sintetizadas por el hongo *Trichoderma virens* participan en la promoción del crecimiento de la planta. En su estudio, plantas de *Arabidopsis* mutantes en transportadores de auxina (*aux1-7*, *eir1*, y *doc1*) mostraron una respuesta reducida a la presencia del hongo en términos de la promoción del crecimiento y del desarrollo de raíces laterales, por lo que el transporte normal de auxinas es importante para la promoción del crecimiento de las raíces inducido por el hongo. Adicionalmente, los autores encontraron que *T. virens* Gv. 29-8 secreta ácido indol acético (AIA, la auxina más abundante en plantas), indol-3-etanol e indolacetaldehído, siendo este último el que alcanza las concentraciones más altas. La adición de estos compuestos aislados a las plantas de *A. thaliana* inducen el incremento del crecimiento radicular, excepto el indol-3-etanol. Con lo anterior los autores propusieron un modelo en el que sugieren que, ya que el indol-3-etanol no mostró una función auxínica clara, podría actuar como un reservorio de compuestos indólicos y su posterior metabolismo a indolacetaldehído o bien a AIA puede llevar a regular directamente la expresión de genes de plantas crecidas en presencia de *Trichoderma* (Figura 5).

Sin embargo no todas las cepas de *Trichoderma* producen AIA o alguno de sus análogos, según demostraron Hoyos *et al.* (2009), al analizar 101 cepas de *Trichoderma*, donde solo el 60% los produjo. Algunas de estas cepas de *Trichoderma* indujeron el crecimiento en frijol pero tuvieron un patrón variable en la síntesis de auxinas, lo cual les llevó a proponer

1) que la síntesis de auxina depende de la cepa y no de la especie y 2) la producción de auxinas es el único factor importante para favorecer el crecimiento de las plantas.



**Fig. 5. Acción de las auxinas en la respuesta de *A. thaliana* a la presencia de *T. virens*.** Se propone que las auxinas secretadas en el medio por el hongo inducen una cascada de señales de transducción que promoverán el desarrollo radicular lo que está directamente relacionado con la estimulación del crecimiento. Tomado y modificado de Contreras-Cornejo *et al.* (2009).

## Auxinas en la planta.

### Auxinas endógenas.

El término auxina deriva de la palabra griega “auxein” que significa crecer. Las auxinas son hormonas relacionadas con la elongación y crecimiento celular (Overvoorde *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, la auxina principal sintetizada por las plantas es el ácido indol acético (AIA), aunque las plantas también sintetizan al 2-Cl-AIA y el ácido fenil-acético, además de las formas precursoras inactivas, el ácido indol-3 butírico (IBA), el ácido indol-3 propiónico (IPrA), el aminoácido-AIA, el metil-éster-AIA y la glucosa-AIA (Ender y Strader, 2015). Aún se desconocen todos los pasos enzimáticos en la vía

biosintética de AIA en plantas, pero se reconoce que hay dos vías: la dependiente del triptófano y la independiente del triptófano. Se conoce muy poco sobre la vía independiente de triptófano. Esta vía se ha propuesto a partir de estudios con mutantes en la biosíntesis del aminoácido de maíz y *Arabidopsis* en las cuales se demostró que la síntesis de *novo* de auxinas ocurre principalmente de los intermediarios de la vía dependiente del triptófano como el indol (Ouyang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2015).

Cuando la auxina se sintetiza a partir del triptófano, hay cuatro diferentes vías metabólicas que pueden intervenir: a) la vía del indol-3-acetamida (IAM); b) la vía del indol-3-piruvato (IPA), c) la vía de la triptamina (TAM) y la del indol-3-acetaldoxima. Sin embargo, no todas están presentes en todas las plantas (Mano y Nemoto, 2012).

El triptófano se sintetiza en los cloroplastos por lo que de manera natural la auxina es sintetizada en los ápices, hojas jóvenes y yemas (Overvoorde *et al.*, 2010). Generalmente las auxinas no ejercen su acción en el sitio en donde son sintetizadas. Su transporte, puede ser a corta o a larga distancia, el primero ocurre entre células adyacentes y el segundo cuando la auxina se mueve por ejemplo del ápice del tallo hasta el inicio de la raíz lateral.

El mecanismo de transporte a distancia puede caer en dos vías; la apoplástica, en donde la auxina se mueve asociada al flujo vascular del floema de los tejidos fotosintéticos a los no fotosintéticos, de manera similar a como se mueven los azúcares, aminoácidos y algunas proteínas y RNA en el floema, alcanzado una velocidad de movimiento de 7 cm/h (Overvoorde *et al.*, 2010). La otra vía es el transporte polar célula a célula (Figura 6), que ocurre gracias a la fuerza protón-motriz impuesta en la membrana plasmática, la auxina es transportada en dirección **basipétala** en el vástago a través del floema (Lomax *et al.*, 1995, citado por Ostrec y Štampar, 2011), este transporte asimétrico de auxinas que direcciona el eflujo de auxinas depende esencialmente de las características químicas de la hormona y de la localización de los transportadores en la membrana celular, llegando a una velocidad de transporte de 0.10 cm/h (Overvoorde *et al.*, 2010).

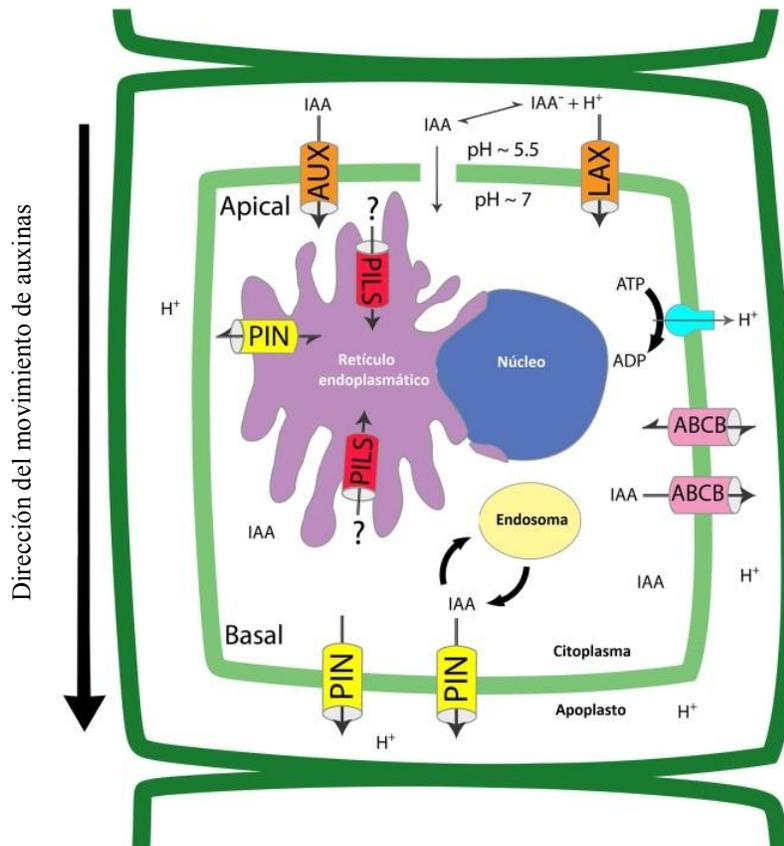
El AIA tiene un pKa de 4.85 y a pH ácido (5.5 en el apoplasto) hay una proporción del 83% en forma aniónica y el restante en forma protonada. La forma protonada es transportada por difusión pasiva hacia el citoplasma (Figura 6), y se disocia convirtiéndose en la forma

aniónica debido al pH citoplasmático, lo que impide su regreso al apoplasto. Posteriormente esta forma aniónica es transportada hacia el exterior celular por diferentes transportadores membranales que pueden ser transportadores difusionales como los tipo PIN. La forma aniónica de la auxina también puede ser introducida a la célula a través de transportadores dependientes de ATP en un mecanismo simporte, mediante los transportadores de la familia Auxin Resistant 1 (AUX1) y la familia Like-Auxin1 (LAX). La presencia de los transportadores de tipo activo es requerida para asegurar una rápida absorción de auxina en procesos que involucren altas cantidades de la hormona (Zazimalová *et al.*, 2010). Además, la localización de los transportadores en la membrana celular es polar, lo que provee un mecanismo de salida de auxinas direccionado (Overvoorde *et al.*, 2010; Zazimalová *et al.*, 2010).

### **Auxinas exógenas**

Se ha reportado que la auxina añadida entra al tejido mediante la superficie que está en contacto con la hormona (da Costa *et al.*, 2013) y puede ser absorbido por las células mediante dos mecanismos, uno dependiente de pH, donde la absorción es afectada por cambios en el pH de la pared celular (Rubery y Sheldrake, 1973) y el otro mecanismo es a través de acarreadores de entrada AUX1/LAX (Delbarre *et al.*, 1996, citado por da Costa *et al.*, 2013).

En explantes, la mayor proporción de la auxina exógena actúa en el lugar de corte y una porción de la auxina suplementada puede ser distribuida a lo largo del corte, principalmente por el xilema, pero también la absorción de la auxina puede ser a través del floema. En estos casos los acarreadores de entrada y salida no tienen un papel significativo en el proceso de direccionamiento de las auxinas (da Costa *et al.*, 2013). Con AIA marcado radioactivamente se ha observado que los explantes de hojas se enriquecen rápidamente de la hormona aplicada exógenamente, lo que sugiere que el transporte se debe al flujo de masas (Osterc y Spethmann, 2001) que es el movimiento de nutrientes a través del xilema, debido a la presión radicular y la tensión negativa generada por la evapotranspiración. Sin embargo en tejidos juveniles, se ha observado que la absorción es principalmente mediante el floema (Osterc y Spethmann, 2001).

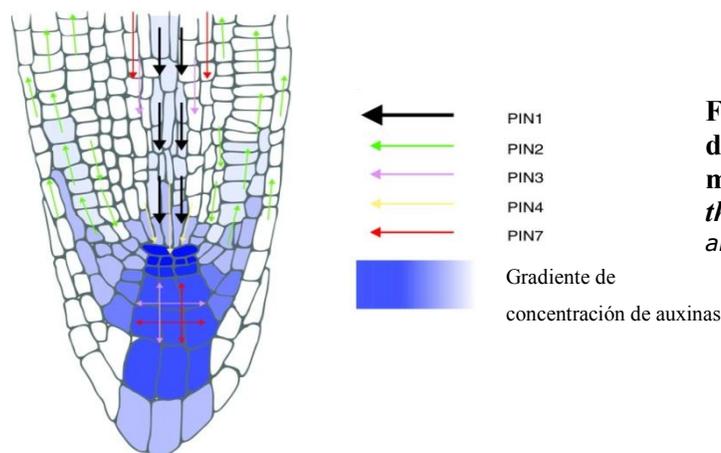


**Fig. 6. Transporte polar de auxinas.** Las auxinas protonadas pueden difundirse pasivamente a través de la membrana plasmática, sin embargo la mayor cantidad de auxina en el apoplasto se encuentra desprotonada y requiere de un transporte activo. Los transportadores PIN son acarreadores de eflujo localizados en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático y puede haber un recambio de PINs entre los dos organelos. AUX/LAX y PILs son acarreadores de influjo localizados en la membrana plasmática y retículo endoplasmático, respectivamente. ABCBs están localizados en la membrana plasmática y usan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar a la auxina. La localización diferencial de los diferentes transportadores determina la dirección del flujo de auxina y contribuyen a la regulación de niveles de auxina intracelular. AUX (AUXIN 1); LAX (Like AUX1); PIN (PIN-Formed); ABCB (Transportadores ABC de tipo B); PILS (PIN-LIKES). Tomado y modificado de Balzan *et al.* (2014).

### Auxina y desarrollo radicular.

AIA induce la elongación celular, sin embargo en raíces, hay una fuerte relación inversa entre el contenido de las hormonas y la elongación (Pilet, 1989; Overvoorde *et al.*, 2010), ya que su acumulación limita la elongación de la raíz principal, pero promueve el desarrollo de raíces laterales y pelos radicales. La auxina es redistribuida lateralmente en la raíz por

medio de los transportadores PIN3 y PIN7 (Figura 7) cuando es detectada por la cofia, lo que provoca que haya acumulación en un solo lado de la cofia (transporte polar). Esta acumulación diferencial da lugar al flujo asimétrico de auxina a través de la epidermis que se refleja en la elongación radical asimétrica (Bennet y Scheres, 2010).



**Fig. 7. Flujo de auxinas dependiente del transporte mediante PINs en *A. thaliana*.** Tomado de Křeček *et al.* (2009)

En el desarrollo de la raíz primaria se ha reportado la participación de la auxina en la diferenciación de elementos vasculares del periciclo (Jansen *et al.*, 2012).

En *A. thaliana* se ha identificado que las auxinas actúan en diferentes fases del desarrollo de las raíces laterales, incluyendo la especificación de nuevos primordios (Péret *et al.*, 2009), los cuales en cereales siguen una secuencia **acropétala** (Orman *et al.*, 2013). Diferencias pequeñas en la concentración de auxinas en el periciclo son suficientes para que se dé el reflujo de auxina, el cual está acoplado a la diferenciación de la raíz lateral, su formación y crecimiento (Bennet y Scheres, 2010). Guo y colaboradores (2005) reportaron que la estimulación del crecimiento de raíces laterales depende del transporte de auxinas del vástago a la raíz.

En las raíces, el fenotipo mejor caracterizado es la elongación de las células de la epidermis dependiente del incremento de la auxina, un proceso que resulta en la formación de pelos radiculares (Overvoorde *et al.*, 2010).

La formación de los pelos radiculares depende del transporte intracelular de la auxina a través de AUX1 (transportador de influjo). Sin embargo, la expresión de este transportador

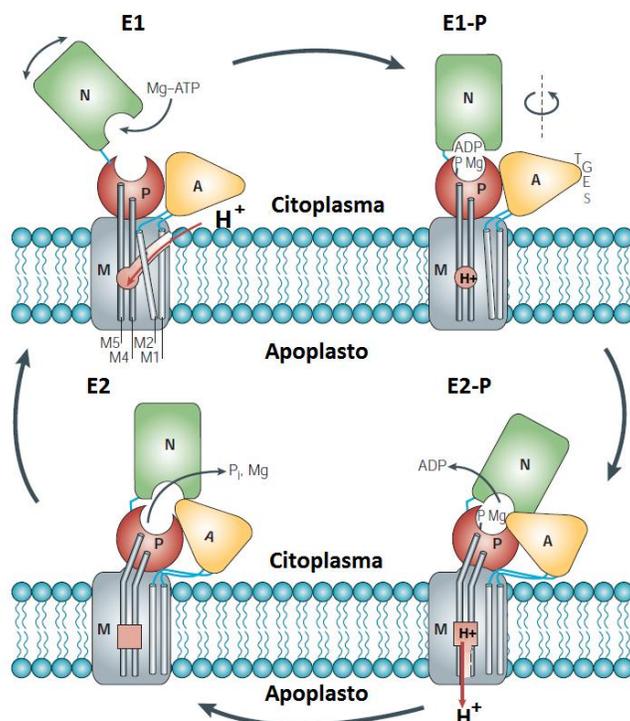
se da en las células no formadoras de pelos, mientras que el transportador PIN2 (transportador de eflujo), sí se expresa en células formadoras y no formadoras de pelos. Las células no formadoras promueven el crecimiento de los pelos y no se ha reportado que sean responsivas a auxina, sin embargo, acumulan mayor concentración citoplasmática de auxina que el otro tipo celular. PIN2 puede ser importante para determinar la polaridad de la célula y mantener un gradiente intracelular de la hormona en ambos tipos celulares (Jones *et al.*, 2009).

### **La ATPasa de protones de la membrana plasmática.**

La elongación inducida por auxinas en órganos como el coleoptilo y la raíz, ha sido explicada desde hace varios años mediante la teoría del crecimiento ácido (Figura 12): la exposición a auxinas de células sensibles a la hormona lleva a un incremento en la salida de protones desde el citoplasma hacia la pared celular. Este decremento en el pH del apoplasto provoca el relajamiento de la pared celular requerido para la elongación (Robert-Kleber *et al.*, 2003). La actividad de bombeo de protones mediada por la ATPasa de protones de la membrana plasmática ( $H^+$ -ATPasa de MP) es la responsable de la acidificación del apoplasto (Moloney *et al.*, 1981), que además es requerida para la nutrición y el ajuste osmótico de la célula (Azcon-Bieto, 2008) y es clave para el desarrollo de la planta.

La  $H^+$ -ATPasa de MP es la bomba principal de la membrana plasmática, pertenece a la superfamilia de bombas denominadas ATPasas de tipo P, las cuales forman un intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico (Janicka-Russak, 2011). La enzima presenta dos conformeros, denominados E1 y E2 que tienen diferente afinidad por los cationes que transportan y diferente reactividad en el sitio de unión del nucleótido (Morsomme y Boutry, 2000). El primer paso del ciclo de reacción (Figura 8) es cuando el ATP se une al conformero E1 que tiene unido un protón. Esta unión da como resultado un intermediario fosforilado de alta energía (E1-P). Después de que el ADP es liberado, la enzima presenta un cambio conformacional a la forma E2 fosforilada (E2-P) y se libera el protón hacia el exterior. En el siguiente paso, el fosfato es liberado y la enzima adquiere la conformación E2 (Morsomme y Boutry, 2000; Kühlbrandt, 2004). Se piensa que la transición de E1 a E2 es facilitada por la fijación del protón y ha sido propuesto como el paso limitante del ciclo (Amory *et al.*, 1980 citado por Morsomme y Boutry, 2000). El

vanadato, el cual es inhibidor de las ATPasas tipo P, presenta una conformación espacial similar al fosfato por lo que al unirse a la enzima la mantiene en su forma E2.



**Fig. 8. Ciclo catalítico de las P-ATPasas.** Donde **N** es el dominio de unión del nucleótido, **A** el dominio de activación, **P** el dominio de fosforilación y **M** el dominio transmembranal. Se observa el movimiento del dominio **N** para la formación del sitio catalítico en E1-P y la rotación del dominio **A** en E2-P favorece la desfosforilación del dominio **P**. Tomado y modificado de Kühlbrandt (2004).

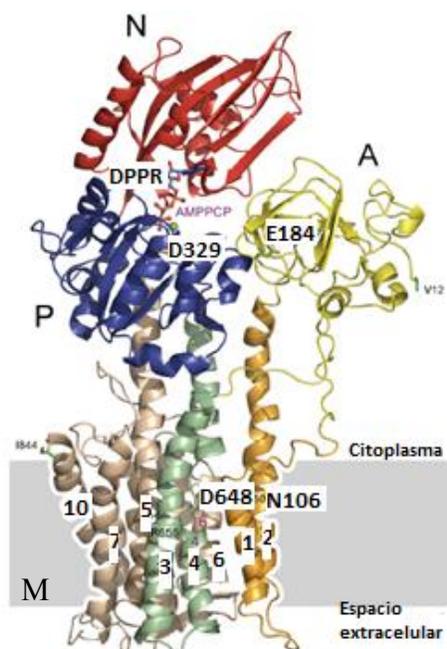
La  $H^+$ -ATPasa de MP presenta un peso molecular aproximado de 100 kDa, con los extremos carboxilo y amino expuestos hacia el citoplasma. Para el transporte de protones al exterior celular utiliza la energía de la hidrólisis del ATP. Se ha postulado que la proteína puede oligomerizarse formando dímeros o hexámeros, pero puede funcionar como monómero (Kanczewska *et al.*, 2005), el cual presenta 4 dominios. De acuerdo a la descripción de Pedersen *et al.*, 2007: el **dominio M** está formado por los 10 cruces transmembranales, M1 a M10, que permiten el paso de protones del citosol hacia el apoplasto. El cruce transmembranal M4 no forma una hélice completa, tiene un asa en la zona media que forma una cavidad con secciones de las hélices M5 y M6. En M6 se encuentra el Asp648 conservado y se ha mostrado que es esencial para el transporte de



dominio A estimula la desfosforilación del Asp329 (que pertenece al dominio P) mediante el motivo conservado TGES (Thr-Gly-Glu-Ser) que contiene el Glu184. El motivo TGES se encuentra aproximadamente a 28 Å del Asp 329 del dominio P, lo que sugiere una rotación del dominio A para desfosforilar al Asp329 del dominio P.

**Dominio P**, dominio de fosforilación. Está unido a los cruces transmembranales M4 y M5 y va desde el aminoácido 308 al 337 y del 489 al 625 y contiene al Asp329 que es fosforilado durante la catálisis.

**Dominio N**, dominio de unión al nucleótido, del residuo 338 al 488. En el cristal obtenido de la proteína con AMPPCP (análogo no hidrolizable del ATP) observaron que el grupo trifosfato entra al dominio P. El dominio N está unido e insertado al dominio P mediante una bisagra que contiene un motivo Asp-Pro-Pro-Arg conservado. Se ha reportado que con la unión del nucleótido, el dominio N puede moverse a través del dominio P para formar el sitio catalítico, en donde el Asp329 será fosforilado. Para la unión del ATP se requiere  $Mg^{2+}$ , el cual se coordina probablemente con los residuos Asp588 y Asp592 (del dominio P) en una interacción próxima al Asp329 (Palmgren, 2001).



**Fig. 10. Estructura cristalográfica de la ATPasa de  $H^+$ .** Se aprecian los dominios membranales (M) y citosólicos (P, N y A) Ver explicación en el texto. Tomado y modificado de Pedersen y Palmgren (2007).

Adicionalmente a los anteriores dominios, las ATPasas tipo PIII a la que pertenecen las  $Mg^{2+}$ -ATPasas bacterianas y las  $H^+$ -ATPasas, contienen el **Dominio R** o dominio de regulación que se encuentra en la porción del carboxilo terminal, residuos 858 al 948 (Kühlbrandt, 2004). En el estudio de Pedersen *et al.* (2007), muestran los cristales de la proteína AHA2 completa en la forma activada por detergente, y a una resolución de 5.5 Å, sin embargo en el cristal no se observa la densidad electrónica de la región del dominio R, lo que sugiere que el dominio no adquiere una estructura definida en su forma activada.

### **Regulación de la ATPasa.**

La  $H^+$ -ATPasa de MP es altamente regulada a diferentes niveles, esto es necesario debido a que la enzima participa en procesos fisiológicos importantes para la planta (Morsomme y Boutry, 2000; Morth *et al.*, 2011).

### Regulación transcripcional.

A nivel transcripcional, se ha reportado que las isoformas de la enzima se transcriben diferencialmente tanto en cantidad como en diferentes tejidos (Frías *et al.*, 1996; Morsomme y Boutry, 2000; Janicka-Russak, 2011). La enzima pertenece a una familia multigénica (Tabla 1).

**Tabla 1. Isoformas de la ATPasa de  $H^+$ -MP en diferentes especies.**  
Tomado de Janicka-Russak, (2011).

<b>Especie</b>	<b>Isoformas de <math>H^+</math>-ATPasa de MP</b>
<i>A. thaliana</i>	12
<i>Lycopersicon sculentum</i>	10-12
<i>Oryza sativa</i>	10
<i>Cucumis sativus</i>	10
<i>N. plumbaginifolia</i>	9
<i>Vicia faba</i>	5
<i>Zea mays</i>	14 (presuntas, Anexo 1)

Las  $H^+$ -ATPasas de la MP se han clasificado en subfamilias principalmente debido a la posición y número de intrones que contienen, sin embargo no es en lo único en que difieren. En las subfamilias tipo I y II no está restringida la expresión a un órgano, por

ejemplo en *A thaliana*, AHA1 y AHA2 se expresan en todos los tejidos, predominantemente en vástagos y raíz. En maíz, MHA2 se expresa en diferentes tejidos incluyendo meristemas, epidermis de la raíz, floema y células guarda (Frias *et al.*, 1996; Janicka-Russak, 2011). Las ATPasas de las subfamilias, III, IV y V se expresan en tejidos específicos (Arango *et al.*, 2003).

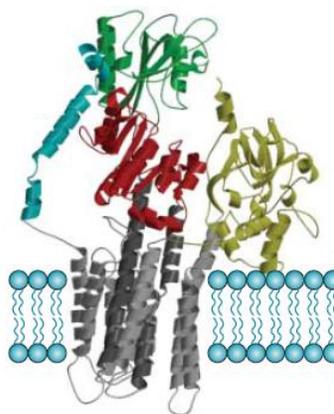
Además, se ha reportado que factores externos estimulan la expresión de la enzima, como estrés salino, bajas temperaturas, y exposición a hormonas exógenas.

#### Regulación post-traducciona

Numerosas evidencias señalan a la región del carboxilo terminal como un dominio autoinhibitorio de la enzima (Figura 11). La remoción de 89 o 100 aminoácidos del carboxilo terminal de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de plantas provoca un aumento en su actividad (Speth *et al.*, 2010). La presencia de cinco sitios potenciales de fosforilación dentro de los últimos 100 residuos de la proteína (Axelsen *et al.*, 1999), ha llevado a la búsqueda de cinasas específicas que activen a la enzima. A la fecha, sólo se ha identificado a una de las cinasas, PKS5, una proteína cinasa que fosforila a proteínas de la familia de sensores de calcio SOS (*salt overly sensitive Ca<sup>2+</sup> sensors*). El residuo 931 en AHA, localizado en la región del carboxilo terminal, es fosforilado por la PKS5, sin embargo esta fosforilación inhibe a la enzima (Fuglsang *et al.*, 2007). Otro residuo que es fosforilado, por una enzima aún desconocida es el que se encuentra en el penúltimo residuo de la enzima, que en AHA1 es la Thr 948 y en PMA2 (H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de *Nicotiana plumbaginifolia*) es la Thr 955. Su fosforilación crea el motivo QQXY<sup>P</sup>TV, blanco de unión de una proteína dimérica denominada 14-3-3 (Svennelid *et al.*, 1999, Figura 13). Las proteínas 14-3-3 participan en la regulación del metabolismo primario, el transporte de iones y la transcripción de genes (Aducci *et al.*, 2002), además de la señalización hormonal, la regulación de los factores de transcripción MYB y la alteración de la actividad de la ATPasa (Denison *et al.*, 2011).

El supuesto desplazamiento de la región del carboxilo terminal debido a su fosforilación en la penúltima treonina, aumenta la actividad de hidrólisis de ATP y también el bombeo de los protones de la ATPasa (Svennelid *et al.*, 1999). Como ya se mencionó, la estructura cristalográfica de la ATPasa de Arabidopsis AHA2 no resolvió la estructura de la región del carboxilo terminal (Pedersen *et al.*, 2007), pero el análisis de las posibles superficies de

contacto entre esta región y el resto de la enzima asume que el carboxilo terminal interacciona con algunos residuos localizados entre los cruces transmembranales 1 y 2, puerta probable de entrada de los protones a la enzima, así como con algunos residuos que se localizan en el dominio activador (Figura 11). Posición del carboxilo que puede bloquear la entrada de protones y restringir el movimiento del dominio A que es necesario para la desfosforilación del Asp 329, y detiene la transición del ciclo catalítico. Lo anterior podría explicar la mayor actividad en las dos funciones de la enzima, la hidrólisis de ATP y el bombeo de protones.



**Fig. 11. Modelo del dominio R de  $H^+$ -ATPasa de MP.** Modelo de homología de la enzima de *Neurospora crassa* en el estado E1 que también es una P-ATPasa de tipo III. Mecanismo de regulación descrito en el texto. En verde se muestra el dominio N, en rojo el dominio P, en amarillo el dominio A, en azul el dominio R, en gris, el dominio M. Tomado y modificado de Külbrandt (2004).

Los lípidos también funcionan como reguladores de la enzima, ya que se ha reportado que la actividad de la ATPasa se anula si se remueven los lípidos con detergentes y la actividad puede ser recuperada al añadir fosfolípidos. Además el incremento en las insaturaciones y longitud de la cadena de ácido graso se relaciona con la disminución de la actividad de la enzima. Uno de los lípidos que aumenta la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de MP es la lisofosfatidilcolina (LPC), que tiene un efecto sobre la asociación de la región del carboxilo terminal y probablemente desplace a este dominio autoinhibitorio.

Los microorganismos que se asocian a las plantas también son capaces de regular la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de MP a través de diferentes mecanismos. Microorganismos

parásitos afectan la actividad de la enzima mediante la acción de metabolitos y péptidos secretados por los microorganismos como la fusicoccina, micotoxina que entre otros efectos, estimula la apertura estomática irreversible (Elmore *et al.*, 2011) y la acidificación del apoplasto lo cual está relacionado con la activación de la ATPasa (Johansson *et al.*, 1993; Elmore *et al.*, 2011). Se ha reportado que la fusicoccina estabiliza la unión de la proteína 14-3-3 al COOH<sup>-</sup> terminal de la enzima, manteniéndola en su forma activa (Elmore *et al.*, 2011). Otro ejemplo son los efectores inductores de necrosis (NIP1) secretados por *Rhynchosporium secalis* que afectan a cereales, activando a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de una manera indirecta, ya que la unión de NIP1 a su receptor desencadena señales que inducen a la activación de la enzima y la actividad continua de la enzima lleva a la necrosis del tejido (van't Slot *et al.*, 2007; Elmore *et al.*, 2011).

Por otra parte, algunos metabolitos exudados por microorganismos pueden inhibir o disminuir la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP, por ejemplo, la fitotoxina FB1 producida por microorganismos del género de hongos hemibiótrofos *Fusarium* puede insertarse en la membrana plasmática y tanto la FB1 como los esfingolípidos intermediarios con estructura análoga actúan como inhibidores acompetitivos de la enzima (Gutiérrez-Nájera, 2005). También se ha reportado que toxinas como las beticolinas producidas por *Cercospora beticola*, un hongo necrótrofo, provocan la disminución de la actividad de la enzima de forma indirecta al formar poros en la membrana, lo que rompe el gradiente electroquímico inducido por la enzima (Goudet *et al.*, 2000).

Contraria a la respuesta ante microorganismos parásitos, muchas especies de plantas promueven la asociación con microorganismos, los cuales proporcionan nutrientes a la planta hospedera, mientras que la planta provee de fotosintatos al microorganismo simbiote.

En interacciones simbiotes con hongos micorrízicos arbusculares se ha reportado que la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP es muy activa en la zona periarbuscular, (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000). En tabaco, la transcripción de isoformas de la enzima es diferente entre tejidos con micorrizas y sin micorrizas. En células que contienen arbusculos específicamente se expresan las isoformas *pma2* y *pma4* (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000). En arroz, la isoforma OsHA1 se induce al ser colonizada con *Rhizophagus irregularis* y en *Medicago*

*truncatula* se induce específicamente la isoforma MtHA1. En concordancia, la actividad de bombeo de protones en arroz y *M. truncatula* aumenta un 40 % después de 6 semanas post-inoculación con *R. irregularis* (Wang *et al.*, 2014). Así que se propone que la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP genera el gradiente electroquímico que activa el cotransporte secundario de diferentes iones en las células de las plantas y puede dirigir el intercambio de nutrimentos a través de las membranas plasmáticas periarbusculares o peribacteroidales (Campos *et al.*, 1996).

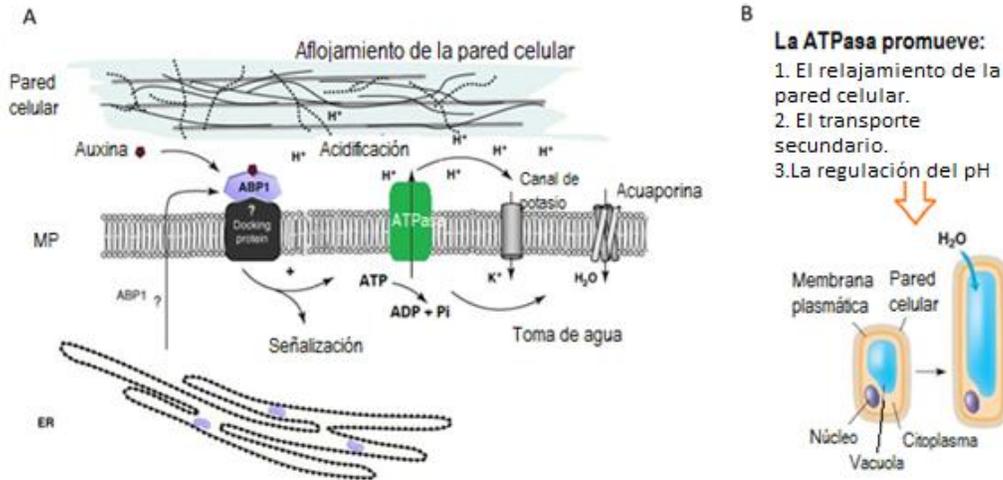
Además de los hongos, las bacterias también producen metabolitos que afectan la actividad de bombeo de protones, como la siringomicina y siringopeptinas secretadas por el género *Pseudomonas* (Elmore *et al.*, 2011) éstos lipopéptidos también forman poros en la membrana plasmática.

### **Auxinas, la elongación celular y la ATPasa.**

El aumento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP debido a la presencia de auxinas se ha explicado de formas distintas. Una de ellas es el aumento en la cantidad de la enzima, se ha reportado que en el coleoptilo de maíz la auxina aumenta el flujo de vesículas que acarrean a la proteína desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática, lo que aumenta la cantidad de H<sup>+</sup>-ATPasa presente en la membrana plasmática, por lo que el aumento en su actividad es debido a la incorporación de enzima ya preformada (Hager *et al.*, 1991; Frías *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha reportado que hay una respuesta temprana a auxinas que no involucra la modificación del contenido de la enzima en las membranas plasmáticas, en este proceso de señalización la auxina se une a la proteína ABP1 (auxin binding protein) en la cara externa a la membrana plasmática. Posteriormente se desata una cascada de transducción de señales en la que ABP1 se une a una proteína de la membrana plasmática, aun no identificada, para activar a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP. La acidificación del apoplasto induce el aflojamiento de la pared celular por activación de las enzimas que remodelan la pared celular como las expansinas, lo que facilita la posterior expansión de la célula. Mientras que la hiperpolarización de la membrana inducida por la ATPasa induce el importe de potasio a través de los canales dependientes de voltaje, lo que provoca la entrada de agua a la célula a

través de acuaporinas (Figura 12). El resultado de lo anterior es la promoción de la elongación celular (Tomas *et al.*, 2010).



**Fig. 12. Teoría ácida del crecimiento.** A) La auxina es percibida por la proteína ABP1 que se asocia a una proteína de unión a la membrana plasmática, la unión genera señales que pueden activar a la ATPasa de protones. La acidificación del apoplasto provoca el relajamiento de la estructura de la pared, mientras que la diferencia de carga eléctrica en la membrana estimula la actividad de canales de potasio lo cual aumenta la absorción de agua por la célula. B) La mayor actividad de ATPasa entonces promueve la elongación celular Tomado y modificado de Cunnings, (2005) y de Tomas *et al.* (2010).

En coleoptilos etiolados de *A. thaliana* carentes de AIA endógeno, la adición exógena de AIA activa la H<sup>+</sup>-ATPasa mediante la fosforilación del penúltimo residuo de treonina de la enzima (Takahashi *et al.*, 2012). Recientemente se demostró que la sobreexpresión de las proteínas SAUR (Small auxin up-RNA) aumenta la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa y el nivel de fosforilación de la enzima. Adicionalmente Spartz y colaboradores (2014) demostraron que las proteínas SAUR inhiben la actividad de una familia de fosfatasas de proteína tipo 2C (PP2Cs) mismas que modulan el nivel de fosforilación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP en su penúltimo residuo de treonina, por lo que en presencia de auxina se activa la transcripción de la proteína SAUR, por tanto se disminuye la desfosforilación de la ATPasa dando lugar a un aumento en el bombeo de protones y al alargamiento celular.

---

La regulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP es un punto clave en el crecimiento de la planta, sin embargo es factible que la activación de la enzima para llevar a la elongación del tejido involucre mecanismos distintos probablemente debido a la intensidad y tipo de estímulo y/o el tejido del que se trate.

## JUSTIFICACIÓN

Se tienen evidencias del papel fisiológico de la  $H^+$ -ATPasa en las raíces en la interacción con micorrizas. Se ha reportado que plantas carentes de una ATPasa en *M. truncatula* (*Mt-ha1-1*) reducen el tamaño del arbusculo, son incapaces de tomar fosfato y de crecer cuando son inoculadas con la micorriza *Rhizophagus irregularis* (anteriormente llamada *Glomus intraradices*), contrario a las plantas silvestres que al ser inoculadas con el hongo aumentan cerca de 2 veces el peso fresco del tallo. La sobreexpresión de la  $H^+$ -ATPasa de arroz (Os-HA1) incrementa la toma de fosfato y el potencial de membrana. Lo anterior indica que la función de la  $H^+$ -ATPasa es importante para establecer la simbiosis en las raíces (Wang *et al.*, 2014).

Sin embargo, los hongos del género *Trichoderma* no establecen simbiosis con las plantas con las que interacciona, pero pueden alterar la morfología y fisiología de las raíces. La relación *Trichoderma*-planta resulta ser benéfica para el crecimiento de la planta.

Se ha propuesto que el efecto sobre la elongación inducido por el hongo es debido a las auxinas que sintetiza el hongo y son percibidas por la planta, sin embargo, cepas de *Trichoderma* que no producen auxinas también inducen la elongación del tejido. Se desconoce por qué otro mecanismo *Trichoderma* puede inducir la elongación. En este trabajo se analizaron los cambios inducidos por hongo *Trichoderma asperellum* y el ácido indol acético en la estructura radical y en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de MP. El objetivo fue determinar si los efectos en la elongación de la radícula se debieron a que *T. asperellum* secreta auxinas y si éstas impactan en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de MP y por tanto en la elongación de los tejidos.

## **HIPÓTESIS**

Las auxinas favorecen la elongación celular al inducir la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa MP, ya que *T. asperellum* también afecta la estructura de la radícula, esto puede deberse a que el hongo produce auxinas lo que afecta a la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa.

## **OBJETIVO GENERAL**

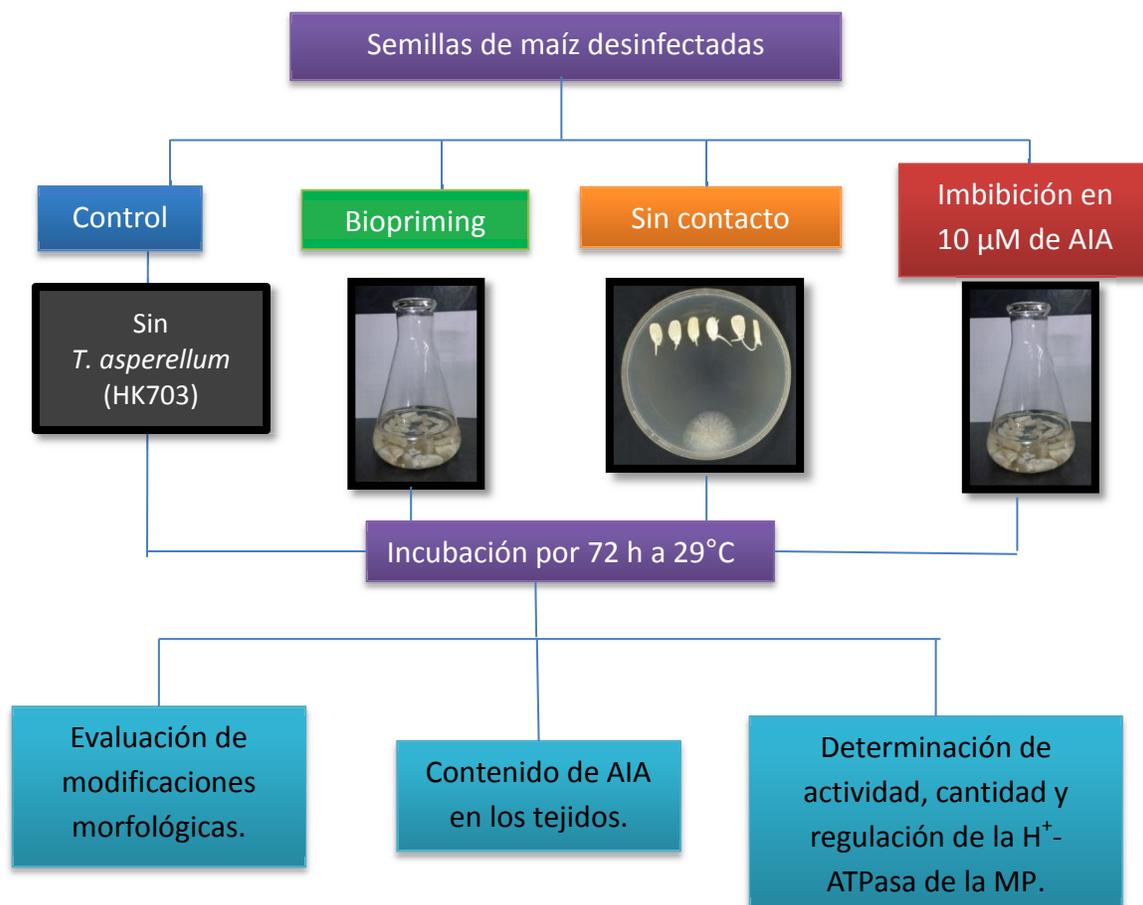
Determinar si *T. asperellum* induce elongación en los tejidos de las plántulas de maíz mediante el incremento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP debido a auxina.

## **Objetivos particulares**

1. Evaluar la elongación de plántulas de maíz en presencia de *T. asperellum*.
2. Determinar si la cepa HK703 de *T. asperellum* es capaz de producir auxinas.
3. Evaluar si *T. asperellum* afecta la distribución y cantidad de AIA en los tejidos de plántulas de maíz.
4. Determinar si *T. asperellum* incrementa la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP en fracciones microsomales de la parte aérea y radicular de maíz.
5. Comprobar si *T. asperellum* aumenta la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa en fracciones microsomales de plántulas de maíz debido a la auxina producida por el hongo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estableció el siguiente esquema general de trabajo (Figura 13):



**Fig. 13. Esquema general de trabajo.**

### Material biológico.

#### *Obtención de suspensión de conidios de T. asperellum*

Se obtuvieron conidios de *T. asperellum* cepa HK703 mediante el protocolo descrito por Guzmán-Chávez (2013). A cultivos de *T. asperellum* de dos semanas de crecimiento en PDA se le agregaron 5 ml de agua estéril desionizada. Después el cultivo se mantuvo en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colectó el líquido en tubos de microfuga estériles y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a 4°C.

Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1.5 ml de agua estéril desionizada. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y los botones fueron resuspendidos en 1 ml de agua estéril desionizada para obtener la suspensión concentrada de conidios. Por último, los conidios fueron cuantificados en una Cámara de Neubauer.

#### *Germinación de plántulas de maíz.*

Se utilizaron semillas de maíz variedad Chalqueño, las cuales se sometieron a un protocolo de desinfección profunda para evitar la interferencia o el efecto de microorganismos en las determinaciones. Para obtener las condiciones óptimas de desinfección, las semillas pasaron por varios tratamientos (Tabla 2) y posteriormente se germinaron. Según se muestra, una de las condiciones que permiten que las semillas germinen más del 80% sin presentar rastros de infección incluye el lavado inicial con hipoclorito de sodio, mientras que el lavado adicional con un choque de calor a 60°C durante 5 min permite que más prontamente alcancen una germinación alta del 97 a 100% (métodos 6 y 8 en Tabla 2).

Por lo anterior, el protocolo final que se siguió para la desinfección de las semillas incluyó el lavado con la solución de hipoclorito de sodio al 2 % (a partir de una solución comercial Cloralex) durante 2 min con agitación. Después, las semillas se enjuagaron 3 veces con agua estéril desionizada y para asegurar la desinfección interna las semillas se sometieron a calentamiento con agua a 60 °C durante 5 min en agitación constante (Glenn *et al.*, 2008).

Una vez desinfectadas, se les aplicaron los siguientes tratamientos a las semillas (Figura 13): Sin la adición de hongo denominado grupo control; el remojo de las semillas con una solución que contuvo 1000 conidios por semilla llamado tratamiento de *biopriming*; el tercer tratamiento fue el de *sin contacto* en el que las semillas se colocaron en una caja Petri de 15 cm de diámetro y de manera opuesta a la semilla se inocularon conidios del hongo y el cuarto tratamiento en el que las semillas fueron preincubadas en una solución de 10  $\mu$ M de AIA antes de ser germinadas. Todas las semillas fueron germinadas en agar, excepto en el tratamiento sin contacto, donde se usó el medio PDA. Se utilizó la cepa HK703 de *Trichoderma asperellum* en los dos modelos de interacción semilla-hongo que se trabajaron: contacto directo o biopriming y sin contacto.

**Tabla 2. Optimización de las condiciones de desinfección de las semillas de maíz y de los medios para lograr una germinación exitosa.** Se muestran los diferentes tratamientos para la desinfección superficial e interna de las semillas, así como las condiciones de germinación de semillas. Las cajas fueron incubadas a 29°C en oscuridad. n=3. Se marca con ++++ la presencia de la mayor cantidad de microorganismos y con – la ausencia de microorganismos.

Método	Lavado	Choque de calor	Medio de germinación	Días para alcanzar el porcentaje de germinación indicado	Contaminación microbiana
1	H <sub>2</sub> O	No aplicado	PDA 1x	5 días, 10%	++++
2	H <sub>2</sub> O	60°C durante 5 min	PDA 1x	5 días, 5%	+++
3	H <sub>2</sub> O	No aplicado	Agar 1x	5 días, 30%	++++
4	H <sub>2</sub> O	60°C durante 5 min	Agar 1x	5 días, 50%	+++
5	NaClO 2%	No aplicado	PDA 1x	3 días, 80%	+
6	NaClO 2%	60°C durante 5 min	PDA 1x	3 días, 97%	-
7	NaClO 2%	No aplicado	Agar 1x	3 días, 90%	-
8	NaClO 2%	60°C durante 5 min	Agar 1x	3 días, 100%	-

### Evaluación de cambios morfológicos.

#### Crecimiento de las plántulas.

La longitud de la parte aérea y de la radícula de las plántulas de los diferentes tratamientos fue determinada con un vernier. Se registró el peso fresco de los tejidos mientras que los

pesos secos se determinaron después de que los tejidos se mantuvieron en una estufa a 60 °C al vacío durante 4 días, hasta que los pesos fueron constantes.

### **Localización de hifas en el tejido.**

Se realizaron cortes longitudinales de las radículas de 10 semillas de los lotes control y bioprimering con una navaja, con la finalidad de identificar en ellas el crecimiento de hifas de *T. asperellum*. Las radículas se seccionaron en 3 partes, el ápice (de la punta de la radícula a 8 mm del tejido), la zona media (de 0.8 a 2.5 cm del ápice de la radícula) y otra basal (de 2.5 cm de ápice hasta la parte más proximal de la raíz). Los cortes de las radículas fueron aclarados en KOH 10 % en ebullición durante 5 min. Después los tejidos fueron sumergidos en una solución de tinta Sheaffer negro 5 % disuelta en vinagre comercial, inmediatamente se destiñeron con agua acidificada con vinagre durante 20 min (Vierheilig, 1998). Mediante esta tinción las hifas se tiñen de color negro. También se analizaron las semillas, para ello se les hicieron cortes transversales y fueron teñidas como se describió anteriormente. Las observaciones se hicieron bajo el microscopio estereoscópico Motic DM-143 y el óptico Olympus CH30.

### **Desarrollo de pelos radiculares.**

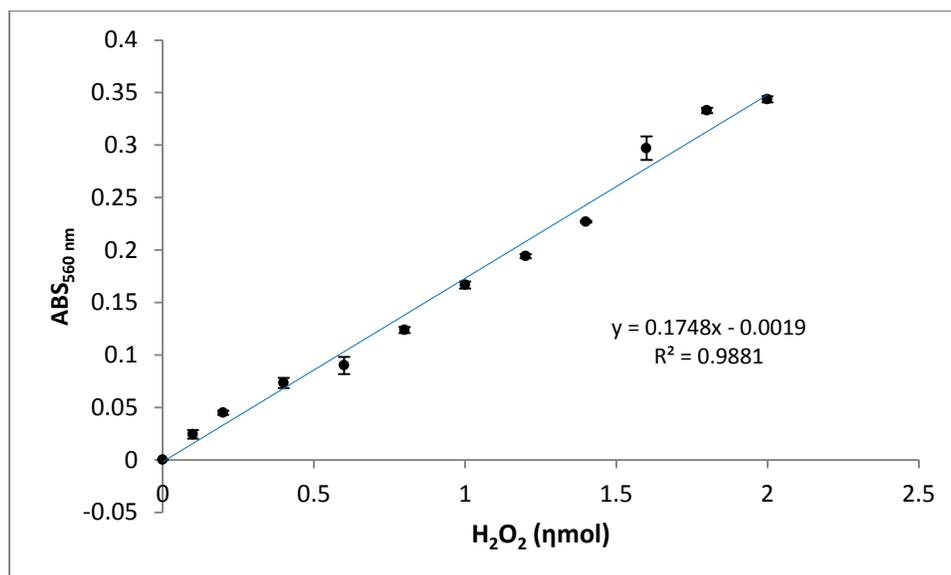
Para obtener la longitud y densidad de los pelos radiculares, la radícula fresca se sumergió en azul de toluidina (50 mg de azul de toluidina en 100 ml de agua destilada; Sandoval, 2005) durante 10 min y se observaron en el microscopio estereoscópico a 20 aumentos. Se tomaron fotografías que se analizaron con el programa Image J v. 1.47 (College of Agricultural Science, 2014). El programa permite medir mediante trazos calibrados, la longitud de los pelos radiculares que fueron capturados en las fotografías, así como contar el número de pelos en un área definida.

### **Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Además del papel que tiene el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la respuesta de defensa y estrés, el aumento en el contenido de peróxido en el tejido puede ser un marcador del proceso de elongación radicular (Ivanchenko *et al.*, 2013). Para obtener el contenido de peróxido de hidrógeno en las radículas se siguió el método del naranja de xilenol (Gray *et al.*, 1999) con las modificaciones descritas por Tapia-de Aquino (2012). Se seccionaron 5 radículas en tres partes, punta, media y basal según se describió anteriormente y cada sección se pulverizó

por separado en nitrógeno líquido. La muestra se colocó en un microtubo y se le añadió 1 ml de 25 mM Tris-HCl pH 7.5. Se centrifugó a 4,000 rpm por 40 s a temperatura ambiente y después de 1 min de reposo, se tomaron 100  $\mu$ L del sobrenadante que se añadieron a un microtubo previamente preparado con 1 ml del reactivo de naranja de xilenol, inmediatamente se agitó y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó a 560 nm. El reactivo de naranja de xilenol se preparó al mezclar 10 ml de la solución 125  $\mu$ M naranja de xilenol-100  $\mu$ M sorbitol con 100  $\mu$ L de una solución que se preparó con 0.5 ml 5 M  $H_2SO_4$ , 0.1 ml 250 mM  $(NH_4)_2SO_4$  y 0.4 ml 62.5 mM  $FeSO_4$ .

La curva patrón se construyó a partir de una solución 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  para obtener las cantidades finales de 0.5, 1, 2, 4 y 6 nmol de  $H_2O_2$  (Figura 14).



**Fig. 14. Curva de calibración de  $H_2O_2$ .**  $n=3$ . Las desviaciones se encuentran en el gráfico, pero debido a que los valores de desviación son muy pequeños son apenas perceptibles las barras de desviación en algunos puntos.

### **Obtención del extracto metabólico de *T. asperellum*.**

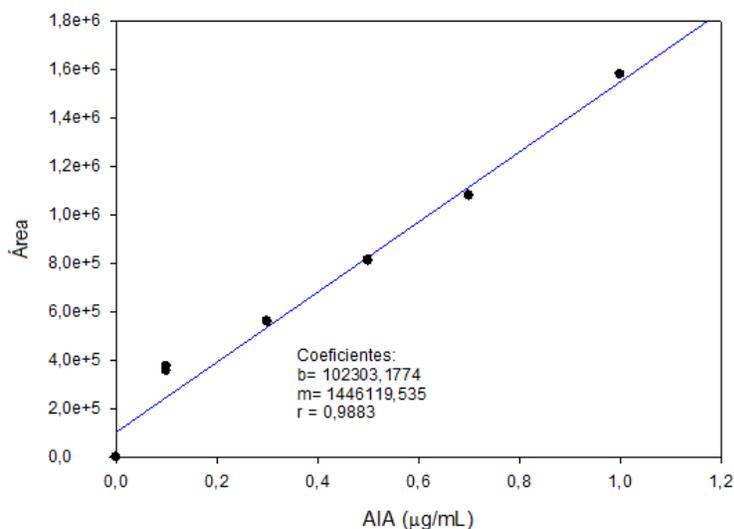
Para determinar si las moléculas secretadas por el hongo son las responsables de los cambios en el crecimiento radicular y en la actividad de la ATPasa, se obtuvo el extracto metabólico de *T. asperellum* siguiendo la metodología descrita por Senyuva (2007). Se sembraron 10,000 conidios del hongo en matraces con 200 ml de papa dextrosa (PD, 24

g/l), se incubaron a 29 °C durante 3 días en la oscuridad y en agitación constante (100 rpm). El cultivo se filtró a través de una membrana de PVDF 0.22  $\mu\text{m}$  y se centrifugó a 2,000 xg durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -70 °C.

### **Determinación de la cantidad de AIA en tejidos y en extracto metabólico de *T. asperellum*.**

Se realizó la extracción de AIA en las siguientes muestras: a) 1 g de radículas o tejido aéreo (peso fresco) molido en nitrógeno líquido, b) 5 ml de extracto metabólico de *T. asperellum* crecido en PD y c) 1 g de crecimiento fúngico obtenido del raspado de la superficie de cultivo sólido en cajas Petri con PDA. A cada muestra se le añadieron 6 ml de 1-propanol: H<sub>2</sub>O: HCl concentrado (2:1:0.002 v/v/v) en un tubo Falcón y se agitó durante 30 min a 4 °C. Después se les añadieron 10 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se agitaron nuevamente por 30 min a 4 °C. Al cabo de este tiempo se formaron dos fases, la superior se desechó. El volumen restante se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a 4 °C. La fase inferior se depositó en viales color ámbar y se concentró con ayuda de un rotavapor a 45 °C con 80 rpm durante 15 min. Las muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso (Pan, 2008).

Para la determinación de AIA las muestras concentradas fueron filtradas a través de una membrana de polifluoruro de fenilideno (PVDF) 0.22  $\mu\text{m}$  y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en un HPLC Waters con detector de fluorescencia, la longitud de onda de análisis fue de 259 nm. La separación fue isocrática usando como fase móvil metanol: ácido acético 0.5 % en una proporción 60:40 v/v previamente desgasificada, a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min a través de una columna C18 (ACE 5, 250 x 4.6mm id) (Castillo *et al.*, 2005). La curva patrón fue realizada con concentraciones de AIA disueltas en 1-propanol (Figura 15). La determinación se hizo en el laboratorio de la Dra. Ma. De los Ángeles Valdivia por la QFB. Julieta Sandoval Guillén.



**Fig. 15. Curva de calibración de AIA.**

### **Improntas de tejido para detección y localización de AIA.**

Para la localización de AIA en los tejidos, se prepararon membranas de nitrocelulosa introduciéndolas en una solución de 0.2 M  $\text{CaCl}_2$  durante 30 min, después se retiraron de la solución y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se realizaron cortes longitudinales del tejido de semillas germinadas 72 h de los lotes control, con bioprimer, sin contacto, semillas incubadas en 10  $\mu\text{M}$  AIA durante 30 min y semillas incubadas 30 min en 10  $\mu\text{M}$  de un inhibidor del transporte de auxinas. El ácido triiodo benzoico, TIBA. Cuatro cortes por tratamiento se presionaron sobre la membrana de nitrocelulosa colocada sobre papel filtro en una superficie plana. La membrana se bloqueó con 5 % de leche Svelty disuelta en solución  $\text{TBS}_2$  (10 mM Trizma base pH 9.5; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl) con agitación constante rotatoria durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó dos veces en  $\text{TTBS}_2$  (Solución  $\text{TBS}_2$ , 0.1% Tween 20) y una vez en  $\text{TBS}_2$  durante 5 min cada lavado. Después se incubó con el anticuerpo anti-AIA obtenido en conejo (Agrisera; dilución 1:500) toda la noche a 4 °C. Se procedió al lavado de manera similar a lo ya indicado y se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra (Millipore; dilución 1:4000) durante 2 h a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó dos veces con  $\text{TTBS}_2$  y una con  $\text{TBS}_2$  por 5 min cada vez. El revelado se hizo bañando a la membrana con la solución para desarrollar color (mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de A y 100  $\mu\text{L}$  de B en 30 ml de  $\text{TBS}_2$ ,

en donde A contuvo 30 mg de Nitroazul tetrazolio o NBT en 1 ml de dimetilformamida al 70%, mientras B contuvo 15 mg de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato o BCIP en 1 ml de dimetilformamida). La reacción de color se detuvo con el lavado de la membrana en agua destilada. Se escaneó la membrana y posteriormente se tiñeron las proteínas en la membrana con rojo de Ponceau (0.1% de rojo de Ponceau en 5% ácido acético) y se volvió a escanear la membrana.

### **Prueba fisiológica de la salida de protones de la membrana plasmática.**

La ATPasa durante su ciclo catalítico transporta un protón desde el citosol hacia el apoplasto por lo que se genera acidificación (Tomas *et al.*, 2010). Para evidenciar el aumento en la acidez del medio se incubaron durante 72 h semillas bajo los tratamientos de biopriming, sin contacto, imbibición en 10  $\mu$ M de AIA y el grupo control. Posteriormente, las raíces se sumergieron en agua desionizada pH 7 con 0.003% de púrpura de bromocresol (Vázquez-Vázquez, 2015), colorante indicador de pH el cual cambia de color de morado a amarillo cuando el pH disminuye de 6.8 a 5.2 (Lei *et al.*, 2015). Se midió el pH de alícuotas de la solución con un potenciómetro a diferentes tiempos de incubación.

Mientras que otro lote de plántulas fueron trasplantadas a tubos de vidrio con 15 ml de agar 0.5x pH 7, adicionado con 0.003% de púrpura de bromocresol. Se tomó registro fotográfico a diferentes tiempos.

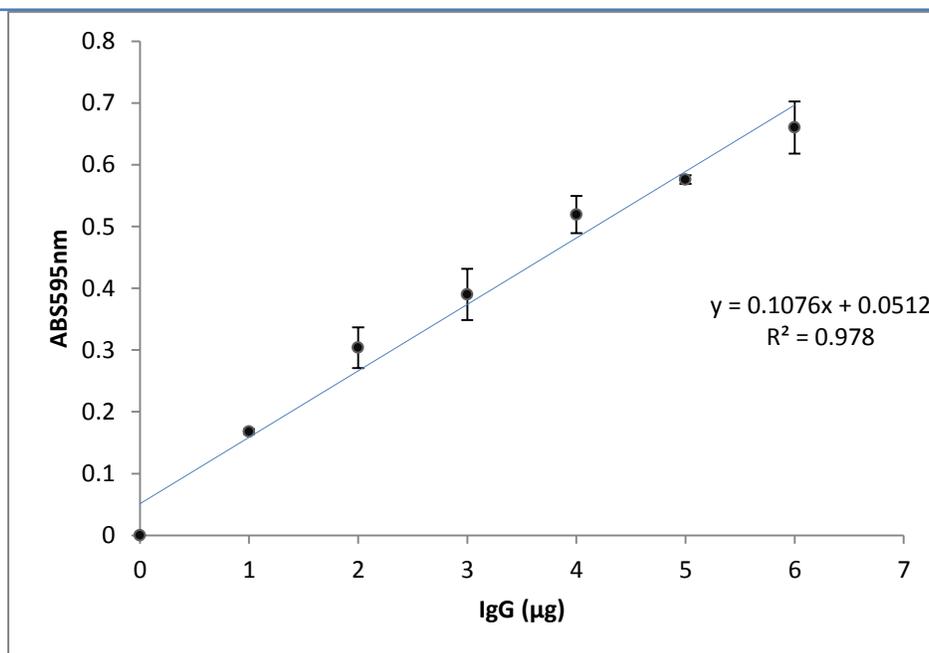
### **Obtención de fracción microsomal.**

Para la determinación de actividad y cantidad de la ATPasa se obtuvieron las fracciones microsomales de radículas de maíz de 72 h de germinación bajo los diferentes tratamientos con *T. asperellum* y AIA. Se pulverizaron 3 g de tejido en N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizó con un homogeneizador Tissue Tearor<sup>TM</sup> en el amortiguador H (50 mM HEPES/BTP pH 7.8; 250 mM sorbitol; 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1.5 mM benzamidina; 1 mM KCl, 4 mM DTT, 40  $\mu$ g/ml de coctel de inhibidores de proteasas Roche; estos dos últimos reactivos se añadieron justo antes de homogeneizar el tejido). El homogeneizado se centrifugó a 5,000 xg por 10 min para eliminar los residuos celulares y los núcleos, después el sobrenadante se

centrifugó a 13,000 xg por 10 min para eliminar los cloroplastos y mitocondrias, y por último se recuperó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 100,000 xg por 60 min para obtener la fracción microsomal. El botón se resuspendió en 150  $\mu$ L del amortiguador H adicionado con 10 % de glicerol (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998). Por último se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, utilizando IgG como estándar (Figura 16).

### **Actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.**

La medición de la actividad de ATPasa de las fracciones microsomales se realizó mediante la determinación de fosfato de acuerdo al procedimiento descrito por Sánchez-Nieto *et al.* (1998) y González-Romo *et al.* (1992). Se incubaron 10  $\mu$ g de proteína en 150  $\mu$ L de medio de hidrólisis (250 mM sacarosa, 50 mM MOPS/BTP pH 6.5, 10 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 7  $\mu$ M CCCP y 0.015 % Brij 58) durante 20 min a 30°C. Para determinar la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP se realizaron dos estrategias, en la primera se incluyó en el medio de hidrólisis 150  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, un inhibidor específico de la enzima, por lo que la actividad que se pierde al añadir el inhibidor corresponde al de la enzima de MP, para obtener este valor se midió la actividad en ausencia de inhibidores a la que llamamos actividad total de hidrólisis de ATP. En otro ensayo se incluyó en el medio de ensayo una mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP, 2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 2 mM NaN<sub>3</sub> y 50 mM KNO<sub>3</sub>, inhibidores de la fosfatasa ácida, la ATPasa mitocondrial y la ATPasa vacuolar, respectivamente, por lo que la actividad residual corresponde a la de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP. Los valores obtenidos con ambas estrategias fueron similares (6 % de diferencia  $\pm$ 1.99). Se determinó la actividad de ATPasa de la MP en fracciones microsomales de la parte aérea y de la radícula de semillas de los lotes control, biopriming y sin contacto con *T. asperellum* y también de los tres lotes en los que se adicionaron AIA. Adicionalmente, las fracciones microsomales de los tejidos del lote control se añadieron a medio de hidrólisis que fue suplementado con diferentes concentraciones de AIA o bien con diferentes alícuotas del extracto metabólico de *T. asperellum* obtenido del cultivo del hongo en medio líquido PD.



**Fig. 16. Curva de calibración de proteínas. Determinación por el método de Bradford (Bradford, 1976)**

### **Inmunorréplica tipo Western para detectar a la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática.**

Se realizaron ensayos de inmunorréplica tipo Western, técnica que fue descrita por Towbin *et al.* (1979) basada en tres elementos para identificar proteínas a partir de una mezcla compleja extraída de la célula: 1) separación de proteínas de acuerdo a sus pesos moleculares a través de electroforesis en gel; 2) transferencia a un soporte sólido; 3) identificación de la proteína blanco usando anticuerpos específicos para la proteína de interés (Mahmood y Yang, 2012).

Para determinar los niveles de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP de fracciones microsomales obtenidas de los tejidos de los lotes control, biopriming y sin contacto con *T. asperellum*, así como el lote de semillas embebidas en 10 µM de AIA. Para ello se corrieron geles de poliacrilamida-SDS al 8% (Laemmli, 1970). Se cargaron 30 µg de proteína de la fracción microsomal en el gel, se verificó que las cantidades de proteína que se separaron en cada

carril fueran similares. Después de su separación se transfirieron a 40 V durante 2.5 h a membranas PVDF activadas con metanol. La membrana se lavó dos veces con TTBS<sub>2</sub>, y una vez con TBS<sub>2</sub> 5 min por vez. Luego se bloqueó la membrana en 2% leche Svelty en TBS<sub>2</sub> y se lavó como se describió anteriormente. La detección de la enzima se realizó con el anticuerpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de *Arabidopsis* (Agrisera; dilución 1:1000) mediante la incubación de la membrana con agitación rotatoria durante la noche a 4 °C. Se procedió al lavado de la membrana y se incubó con el anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra (Millipore; dilución 1:4000) durante 2 h a temperatura ambiente con agitación rotatoria. Después se lavó la membrana y se reveló con la solución para desarrollar color (mezcla de NBT y BCIP). La reacción de color se detuvo con el lavado de la membrana con agua destilada.

### **Inmunorréplica tipo Western para detectar residuos fosfotreonina/fosfoserina.**

La ATPasa presenta mayor actividad al ser fosforilada y/o al presentar la unión de la proteína reguladora 14-3-3, por lo que se realizaron inmunorrélicas usando dos anticuerpos, el anticuerpo contra la proteína 14-3-3 de *Arabidopsis* (Santa Cruz Biotechnology; dilución 1:1000) y el que reacciona con los residuos fosfotreonina/fosfoserina (Abcam; dilución 1:1000). Las condiciones de inmunorréplica fueron similares a la de la detección de la ATPasa excepto que para detectar a las proteínas con el anticuerpo anti-fosfo-treonina/fosfoserina se utilizó 5 % Blot-QuickBloquer (Merk Millipore) en TBS<sub>2</sub> en lugar de leche Svelty para bloquear, lo anterior debido a que Blot-QuickBloquer tiene una mayor eficiencia de bloqueo que la leche además de producir menor fondo, lo anterior es necesario, ya que el primer anticuerpo anti-14-3-3 no es específico contra las proteínas de maíz y además el anti-fosfotreonina/fosfoserina se une a una cantidad grande de proteínas (Morales-Cedillo, 2014).

### **Determinación de efecto de la fosforilación en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática.**

Como ya se mencionó, la fosforilación en el carboxilo terminal de la enzima representa un mecanismo de regulación muy importante que incrementa la actividad de la ATPasa, por lo que para evaluar si este mecanismo ocurría en presencia del extracto metabólico del hongo, se procedió a desfosforilar a la enzima. La fracción microsomal de los tejidos del lote

control fue incubada con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma) unida a agarosa de acuerdo a Desbrosses *et al.* (1998). La fosfatasa alcalina fue ajustada a 100 U/ml en 50 mM MgCl<sub>2</sub> y 500 mM Tris, pH 8.0 (amortiguador de desfosforilación 10x) y lavada 4 veces en el amortiguador mediante centrifugación a 12,000 xg durante 2 min. Para la desfosforilación de la ATPasa se tomaron 6 µL de la fosfatasa 100 U / ml y se mezclaron con 30 µL de la fracción microsomal (5 µg de proteína) y 4 µL de agua estéril desionizada para completar 40 µL. Después de la incubación en un baño maría durante 20 min a 37 °C, la solución se centrifugó a 12,000 xg por 8 min a 4 °C para remover a la fosfatasa, que quedó en el botón. En el sobrenadante se determinó la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa de MP. Como control se realizó el mismo procedimiento a la fracción microsomal excepto que la fosfatasa fue desnaturalizada por calentamiento a 100 °C durante 10 min.

Además como control positivo en el medio de hidrólisis de ATP se añadió a una concentración final en el medio de hidrólisis 100 µM de L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina ( $\alpha$ -lectina) de soya (Sigma), lípido que se conoce aumenta la actividad de la enzima (Sánchez-Nieto *et al.*, 2011, 1998; Palmgren, *et al.*, 1989). También se determinó la actividad de ATPasa de fracciones microsomales tratadas con fosfatasa alcalina en medio de hidrólisis adicionado con 10 µM de AIA o con 8 µL del extracto metabólico de *T. asperellum* obtenido del cultivo en medio sólido.

## RESULTADOS

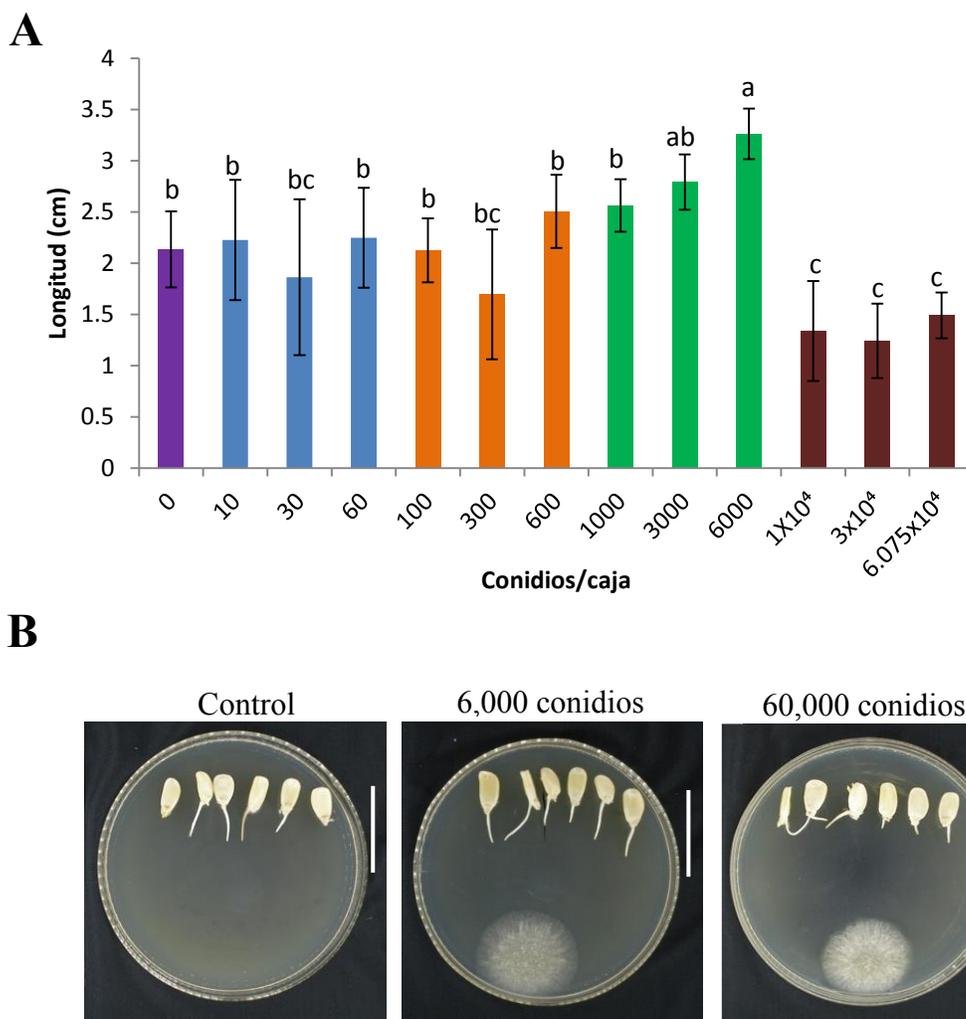
### **Cambios en la arquitectura radical de plántulas de maíz debidos a la cantidad de inóculo de *Trichoderma asperellum***

Se determinaron las condiciones adecuadas para el crecimiento de plántulas de maíz en el tratamiento denominado sin contacto. Para ello, se sembraron 6 semillas de maíz en cajas Petri de 20 cm de diámetro con 45 ml papa dextrosa agar (PDA) y en la parte opuesta de la misma caja, se inocularon diferentes cantidades de conidios suspendidas en 20  $\mu$ L de agua estéril destilada. Después de 48 h de germinación se midió la longitud de la radícula. Se midió la longitud de la raíz y se tomó registro fotográfico de los cambios en el crecimiento radicular. Previo a este estudio, ya se había observado en el laboratorio que a tiempos cortos de la vida de la planta, la apariencia de la radícula cambiaba bajo el tratamiento con biopriming (Guzmán-Chávez, 2013) pero se desconocía el efecto de la interacción con el hongo sin contacto directo con la semilla.

La cantidad de conidios que favoreció la longitud radical fue la de 6,000 conidios por caja (es decir, 1000 conidios por semilla), cantidad similar a la utilizada en experimentos con el tratamiento de biopriming en estudios anteriores. Por otra parte, cantidades superiores de conidios afectaron negativamente el crecimiento radicular (Figura 17).

Sin embargo a las 48 h de germinación no se observó la emergencia del tejido aéreo, y ya que uno de los objetivos fue evaluar si *T. asperellum* inducía la elongación de toda la plántula, se decidió germinar las semillas durante 72 h, tiempo en el que el desarrollo del tejido aéreo ya era evidente.

Para el tratamiento de sin contacto se usó la concentración de 6,000 conidios y 6 semillas de maíz por caja. En el caso del biopriming ya Guzmán-Chávez (2013) había demostrado que 1000 conidios en el agua de lavado por semilla era la cantidad adecuada para producir un efecto promotor del crecimiento de la planta.



**Fig. 17. Efecto de la densidad de conidios sobre la elongación y morfología radicular de semillas germinadas por 48 h. A)** Longitud de las radículas de las semillas de maíz que fueron sembradas con diferente densidad de conidios. Las barras representan el promedio de longitud de 10 radículas. Letras diferentes denotan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p=0.5$ . **B)** Aspecto de las plántulas de 48 h de germinación en ausencia (control) y presencia *T. asperellum* (sin contacto). Se muestra el desarrollo e presencia de 6,000 y 60,000 conidios inoculados por caja. Barra= 5 cm.

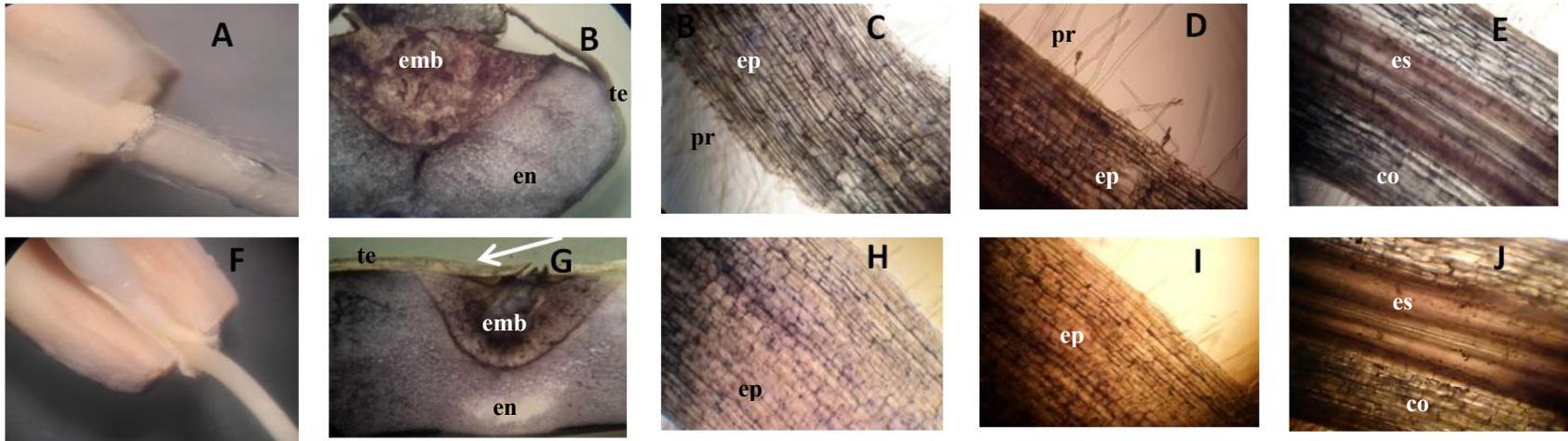
El efecto de crecimiento de la radícula primaria al exponerla a *T. asperellum* puede deberse a un proceso de elongación celular o por división celular, por ello se midió el peso fresco y seco de las raíces como indicadores indirectos para diferenciar entre ambos procesos. Se asume que durante la elongación celular ocurre principalmente la toma y acumulación de agua, mientras que si el crecimiento está dado por la división, el tejido acumularía peso

seco. En el tratamiento de biopriming se registró una ganancia significativa tanto en el peso fresco como en el seco, con valores cercanos al doble con respecto a las plántulas control. En el grupo control, el peso seco representó el 12.7 % del peso fresco, mientras que en el tratamiento con el hongo, el peso seco fue de 11.4 % por lo que se presume que el tratamiento con el hongo favorece la elongación del tejido más que la división, pero estos resultados deben ser confirmados con la medición de la zona meristemática de la radícula que indicaría si hay mayor división celular.

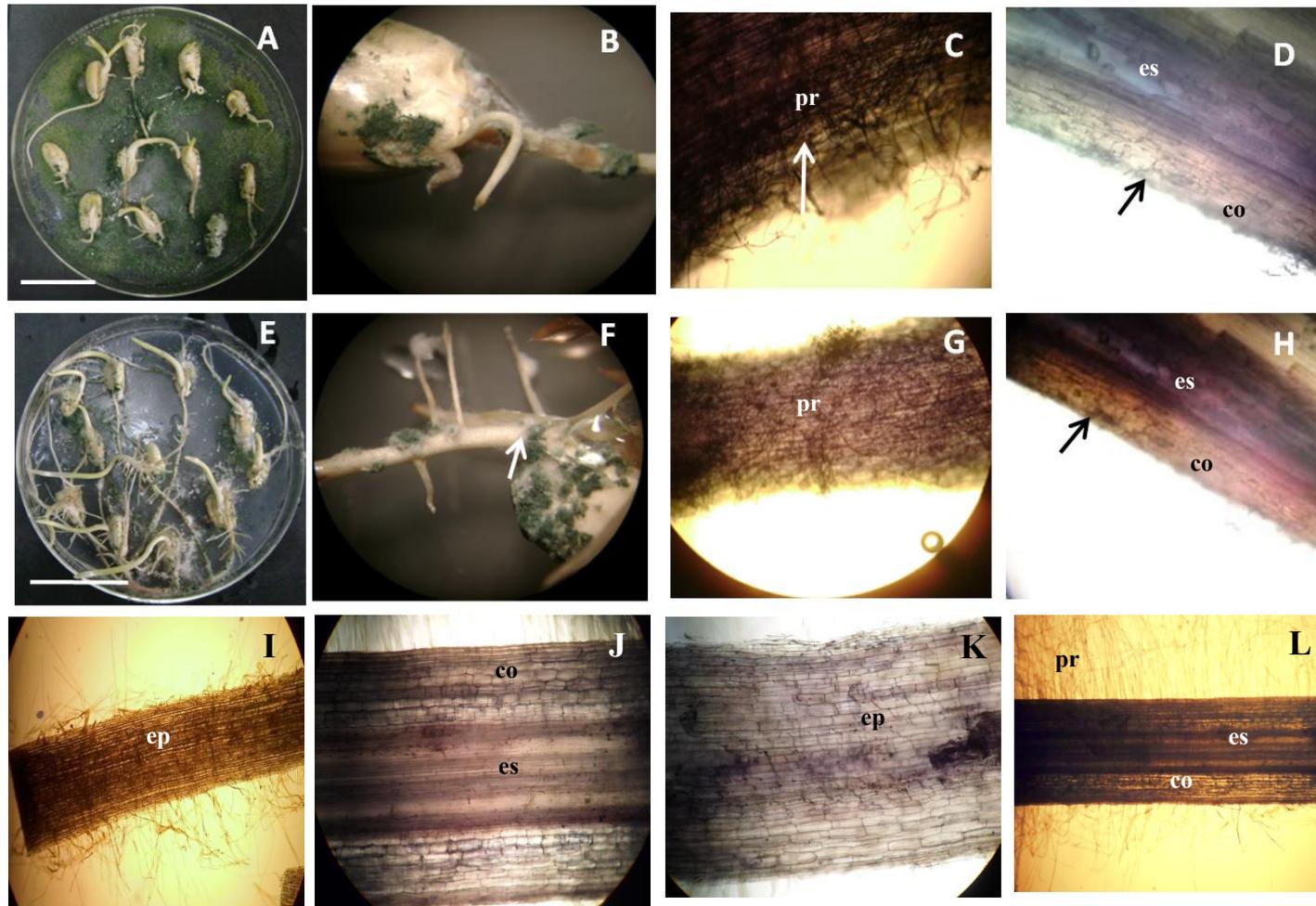
Para ello se implementaron metodologías histológicas con cortes hechos en criostato o incluidos en parafina de diferentes grosores (50, 30, 15, 10 y 5  $\mu\text{m}$ ). Los cortes fueron teñidos con colorantes como el verde rápido, azul de toluidina o yoduro de propidio. Desafortunadamente los cortes mostraban tejido muy dañado o grueso por lo que no se pudieron reconocer las células que conforman el meristemo, por lo que no se realizó la medición de la zona meristemática de la radícula.

### ***Trichoderma asperellum* no coloniza a las radículas de la semillas a tiempos cortos de germinación.**

Se ha reportado que los hongos del género *Trichoderma* invaden el tejido radicular (Yedida, 1999; Leroux *et al.*, 2001), por lo que se buscó el crecimiento de hifas de *T. asperellum* en las semillas y raíces de las plántulas del lote de plántulas del tratamiento con biopriming. Se localizó al hongo usando cortes manuales de las semillas de 72 h y teñidos con tinta Sheaffer negra, a este tiempo el hongo está únicamente en la superficie de la semilla, no se encontraron hifas dentro de las radículas (Figura 18). En cambio sí se observó la colonización interna de la radícula cuando las plántulas ya tenían 10 días de crecimiento, independientemente de si el tejido se germinó en un medio óptimo de crecimiento para el hongo como el papa dextrosa agar o en agar, medio que favorece el crecimiento de las plántulas (Figura 19).



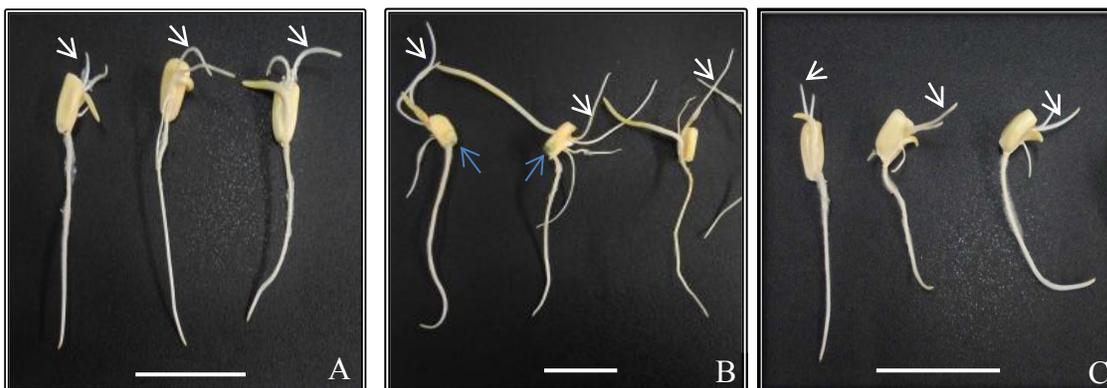
**Fig. 18. Cortes de tejido de semilla y radículas después de 72 h de incubación con el tratamiento de biopriming.** Las flechas señalan el crecimiento fúngico. Solo se detectó hongo en la cubierta de la semilla. A. Semilla germinada, aumento 2X; B. Semilla germinada corte transversal, aumento 2x. C, D y E raíces control cortes longitudinales aumento 4x. F semilla germinada con tratamiento de biopriming, aumento 2x. G semilla germinada con tratamiento de biopriming, corte transversal, aumento 4x. H, I y J raíces tratamiento con biopriming corte longitudinal, aumento 4x. Siglas: *emb* embrión; *en* endospermo; *te* testa; *pr* pelos radiculares; *ep* epidermis; *co* córtex; *es* estele.



**Fig. 19. Colonización de semillas a 10 días de incubación con biopriming.** Las flechas señalan el crecimiento de hifas dentro en las raíces 4x. Semillas germinadas en PDA **A, B, C** y **D**. Mientras que las semillas germinadas en Agar fueron **E, F, G** y **H**. En **A** y **E** plántulas de 10 días de crecimiento colonizadas por *Trichoderma* (barra= 5 cm); **B** y **F** acercamiento a una semilla de maíz. **C, D, G** y **H** muestran un acercamiento de cortes de la raíz en donde se encuentran las hifas. **I-J** grupo control. Siglas: *pr* pelos radiculares; *es* estele; *co* córtex.

### Cambios morfológicos debidos a la presencia de *Trichoderma asperellum*.

Debido a que se deseaba determinar los efectos benéficos del hongo sobre las plántulas de maíz, se utilizaron en adelante solo plántulas de 72 h de crecimiento, en donde el hongo todavía no invade el tejido pero sí induce cambios morfológicos. En las fotografías de la Figura 20B claramente se observa que el biopriming lleva a un alargamiento principalmente de la parte aérea, mientras que las plántulas que interaccionaron con los productos del hongo, el tratamiento sin contacto, no se observó un efecto notable en la elongación. Cabe aclarar que el medio que se usó para germinar el tratamiento sin contacto fue PDA, un medio sólido en el cual el hongo crece más rápido, sin embargo el desarrollo de la planta es más lento.



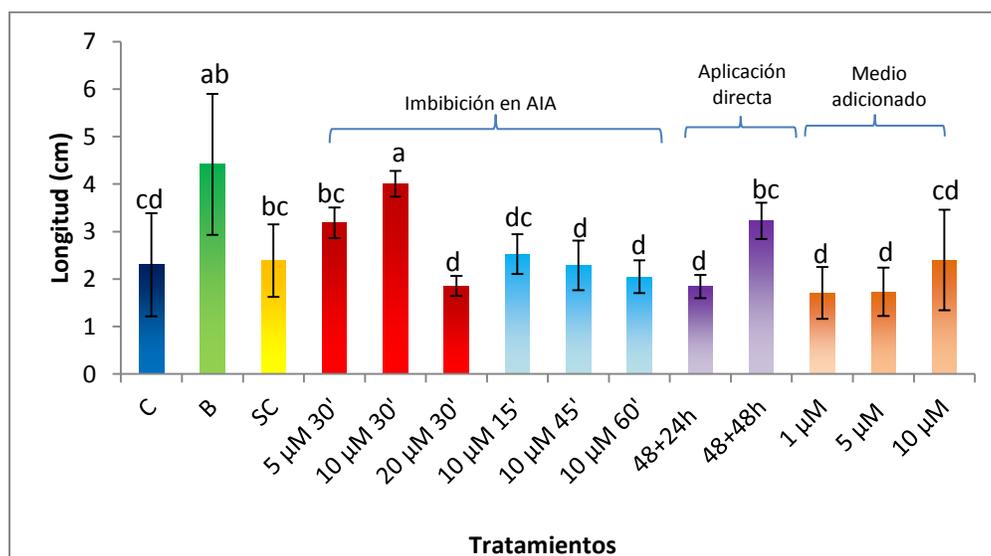
**Fig. 20. Cambios morfológicos de las plántulas de maíz de 72 h de germinación en presencia de *Trichoderma asperellum*.** A. Semillas control crecidas en Agar B. Las semillas pasaron por el tratamiento de biopriming crecidas en Agar. C. Semillas que pasaron por la interacción con *T. asperellum* pero *sin contacto* crecidas en PDA. Las flechas azules señalan el crecimiento de *T. asperellum* en el biopriming, nótese en este tratamiento la elongación de la parte aérea y la mayor longitud de las raíces seminales señaladas con flechas blancas. Barra=5 cm.

### Comparación del efecto de las auxinas y los tratamientos con *T. asperellum* en la elongación del tejido.

Las auxinas son una de las señales para la división celular, la elongación o diferenciación, dependiendo del tipo celular, y juega un papel importante en la formación de raíces, la dominancia apical y las respuestas de tropismo (Overvoorde *et al.*, 2010). Para confirmar que las auxinas afectan la longitud de la plántula de maíz, se midió la longitud de la parte

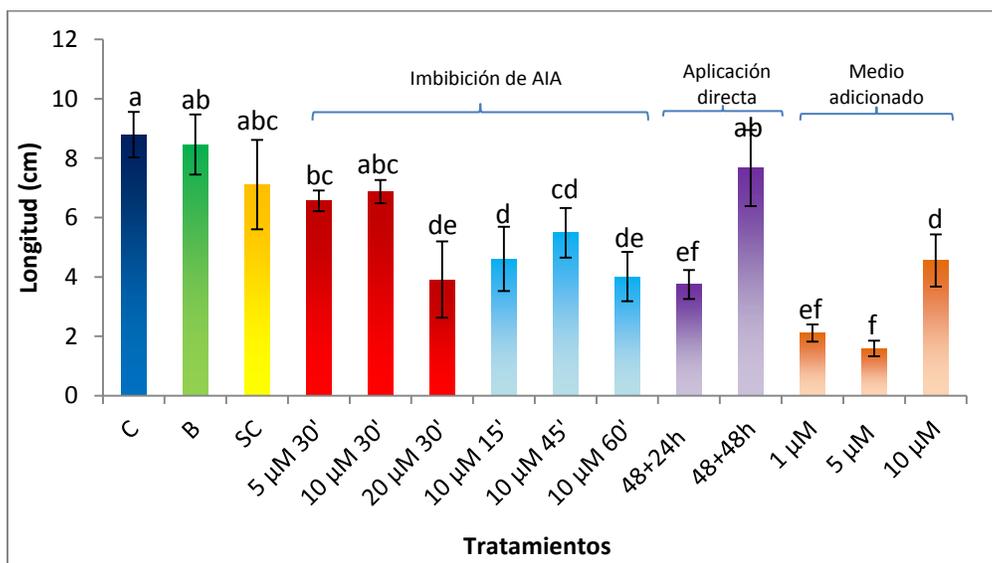
aérea y de las radículas de las plántulas que fueron germinadas con auxina. Además, debido a que AIA puede degradarse en presencia de luz y que era necesario encontrar una forma en que la aplicación de la hormona produjera elongación. El AIA se aplicó de maneras diferentes: 1) imbibición de semillas en AIA por diferentes tiempos y posteriormente colocadas en el agar, 2) aplicación de AIA directa sobre el tejido después de 48 h de germinación y 3) semillas germinadas en agar adicionado con AIA.

En cuanto a la parte aérea, los tratamientos con biopriming y *sin contacto* aumentaron la elongación de la parte aérea, se encontró un incremento similar en magnitud al de los tratamientos con los hongos cuando las semillas fueron sumergidas en una solución de 10  $\mu\text{M}$  AIA por 30 min y posteriormente germinadas en agar, tiempos mayores o concentraciones mayores no incrementó el crecimiento de la parte aérea. Los otros tratamientos probados no modificaron el crecimiento de la parte aérea (Figura 21).



**Fig. 21. Elongación de la parte aérea producida por los diferentes tratamientos de las semillas o plántulas con *T. asperellum* o AIA a 72 h de germinación.** C grupo control; B biopriming; SC sin contacto; Barras rojas representan la imbibición de semillas durante 30 min a diferentes concentraciones de AIA anterior a su germinación en agar. Barras azules representan la imbibición de semillas en 10  $\mu\text{M}$  de AIA a diferentes tiempos antes de ser germinadas en agar. Barras moradas representan plántulas de 48 h de germinación a las que se les agregó 10  $\mu\text{M}$  de AIA directamente sobre el tejido, la longitud del tejido fue medida a 24 y 48 h después de la aplicación. Barras naranjas representan semillas germinadas en agar a diferentes concentraciones finales de AIA. n=30. Letras diferentes señalan diferencias significativas. Tukey p=0.05

En cuanto a la elongación de la radícula, los tratamientos con el hongo, biopriming y *sin contacto*, redujeron ligeramente el crecimiento de la radícula, aunque con valores no significativos. Todos las formas de aplicación de AIA redujeron el crecimiento de la radícula, aunque los tratamientos que llevaron a que la radícula se desarrolle a longitudes similares a los tratamientos con *T. asperellum* fueron la aplicación de AIA a las plántulas crecidas por 48 h e incubadas 48 h con el AIA (96 h totales de incubación) y el remojo de las semillas con 5 y 10  $\mu\text{M}$  AIA durante 30 min y la posterior germinación por 72 h (Figura 22).

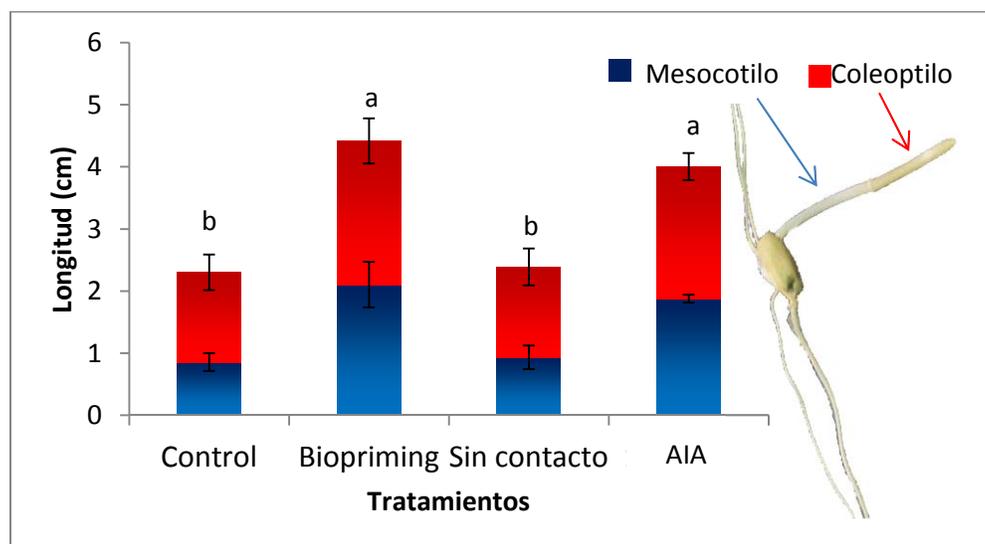


**Fig. 22. Longitud de la radícula primaria de plántulas que pasaron por diferentes tratamientos con el hongo o diferentes concentraciones o formas de aplicación de AIA.** C grupo control; B biopriming; SC sin contacto; Barras rojas representan la imbibición de semillas durante 30 min a diferentes concentraciones de AIA anterior a su germinación en agar. Barras azules representan la imbibición de semillas en 10  $\mu\text{M}$  de AIA a diferentes tiempos antes de ser germinadas en agar. Barras moradas representan plántulas de 48 h de germinación a las que se les agregó 10  $\mu\text{M}$  de AIA directamente sobre el tejido, la longitud del tejido fue medida a 24 y 48 h después de la aplicación. Barras naranjas representan semillas germinadas en agar a diferentes concentraciones finales de AIA.  $n=30$ . Letras diferentes señalan diferencias significativas. Tukey  $p=0.05$ . Letras diferentes señalan diferencias significativas.

Por lo anterior la aplicación de AIA que se utilizó para los subsecuentes experimentos fue la imbibición de las semillas en 10  $\mu\text{M}$  AIA durante 30 min y su posterior germinación en agar por 72 h.

Se cuantificó la elongación de la parte aérea, para hacerlo se dividió el tejido en los dos tejidos que lo forman, el mesocotilo que es la parte que está inmediatamente después de la semilla y que termina en un nodo con el que inicia la sección del coleoptilo, este tejido contiene encerradas las primeras hojas de la plántula (Figura 23).

Se observó que la parte aérea de las semillas sometidas al tratamiento de biopriming se elongó más que el control y el tratamiento *sin contacto*. Tanto la longitud del coleoptilo como del mesocotilo cambiaron. El mesocotilo fue el que se elongó más en las plántulas con biopriming, representando el 53 % de la longitud total de la parte aérea, un aumento similar al que se registró en el tratamiento con auxinas (AIA). Mientras que en los grupos control y *sin contacto*, la variación fue debida principalmente a la elongación del coleoptilo, con una aportación del 60 % de la longitud total (Figura 23).



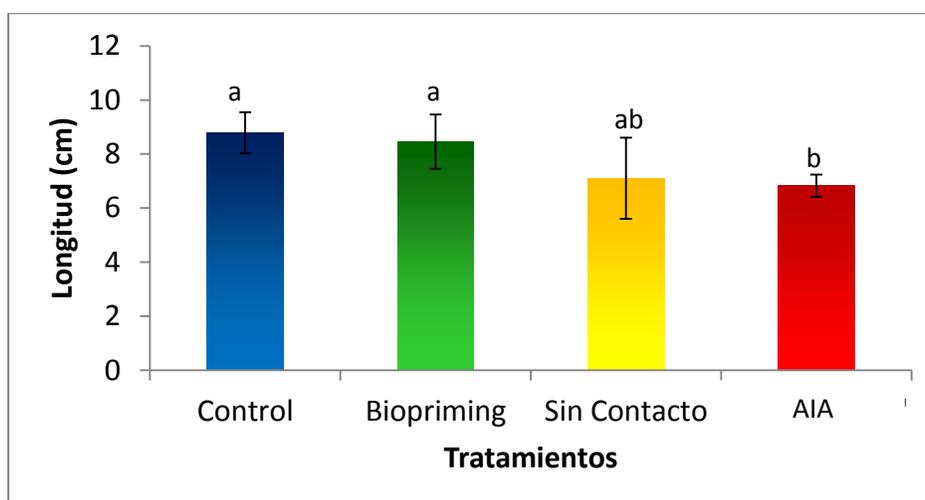
**Fig. 23. Elongación de la parte aérea de las plántulas provenientes de semillas de maíz germinadas a 72 h bajo diferentes tratamientos con *T. asperellum* o de semillas embebidas en 10  $\mu$ M de AIA. Las barras representan el promedio de longitud del tejido de 3 lotes independientes de 30 plántulas, letras diferentes señalan diferencias significativas de la longitud total del tejido aéreo, de acuerdo a la prueba de Dunns,  $p= 0.05$ .**

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el peso fresco o seco de la parte aérea de los tres lotes (Tabla 3) por lo que se sugiere que el incremento en el tamaño se debió principalmente a la absorción de agua, es decir al proceso de elongación.

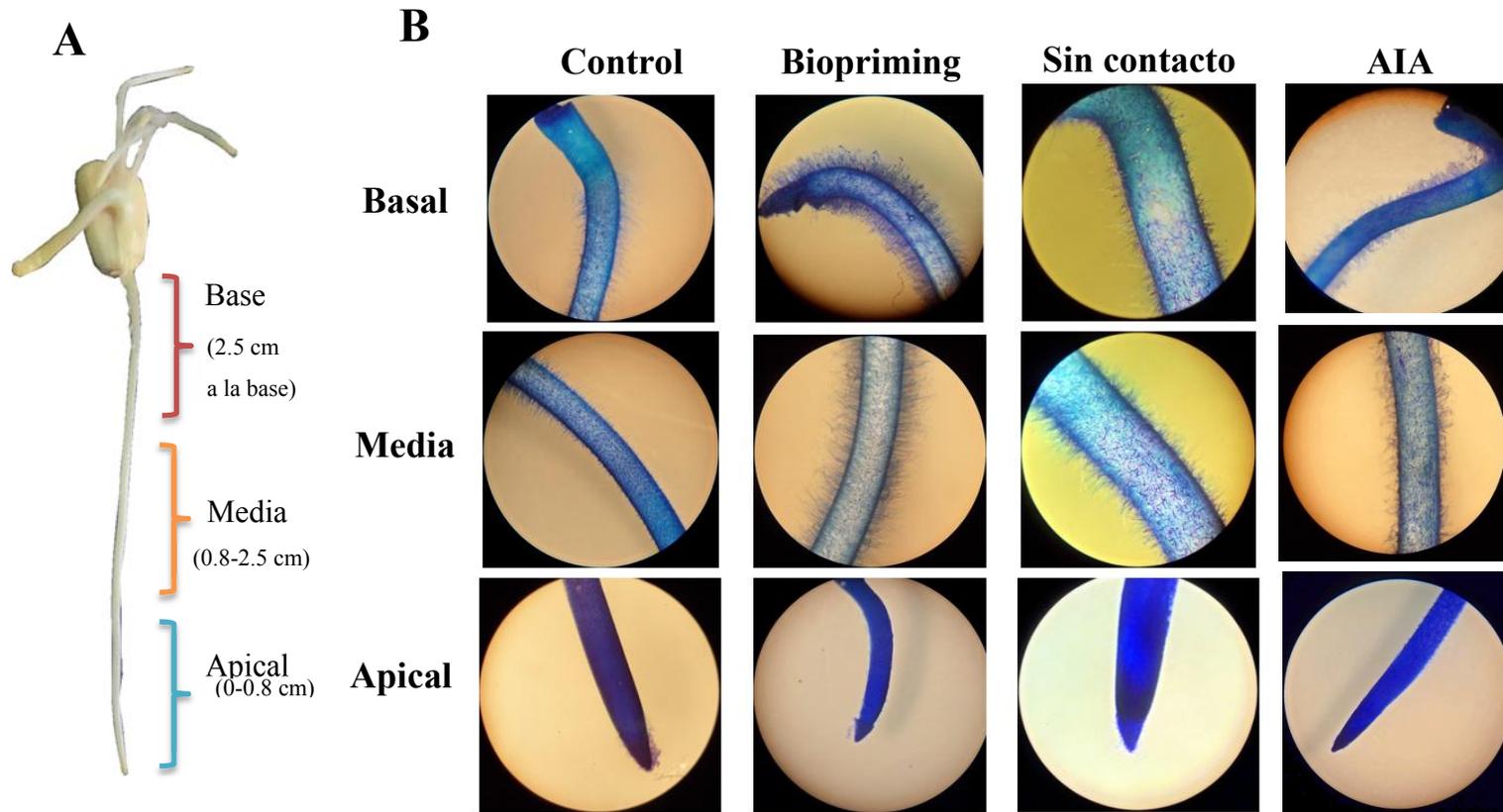
**Tabla 3. Peso fresco y seco de la parte aérea de semillas incubadas 72 h en presencia de *T. asperellum* o auxina.** Valores indican el promedio  $\pm$  desviación estándar, del peso del tejido de 10 plántulas de tres experimentos independientes.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	1.043 $\pm$ 0.056	0.101 $\pm$ 0.003
Biopriming	1.144 $\pm$ 0.066	0.097 $\pm$ 0.012
Sin Contacto	1.170 $\pm$ 0.070	0.111 $\pm$ 0.014
AIA	1.095 $\pm$ 0.048	0.100 $\pm$ 0.022

Respecto a la longitud de la radícula primaria, como se había mencionado en las plántulas de 48 h, era mayor en los tratamientos con el hongo, sin embargo a las 72 h no se observaron cambios significativos entre el grupo control y las semillas tratadas con biopriming. Mientras que en el tratamiento *sin contacto*, se registró una disminución discreta respecto al control similar a la registrada en semillas incubadas en AIA antes de su germinación (Figura 24). Al igual que en el tejido aéreo, no se encontraron cambios en el peso fresco o seco de los tejidos con respecto al control (Tabla 4). La diferencia más notable entre las raíces de los tratamientos fue la longitud de los pelos radiculares (PR). Para cuantificar tanto la longitud como la densidad de PR se disectaron las radículas en tres partes y se tiñeron con azul de toluidina (Figura 25). Las fotografías de estos cortes se analizaron con un programa disponible en línea (Colleague of Agricultural Science, 2014).



**Fig. 24. Longitud de la radícula a 72 h de incubación bajo los diferentes tratamientos con *T. asperellum*.** Los valores representan el promedio de longitud de 30 radículas provenientes de 3 experimentos independientes. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p=0.5$

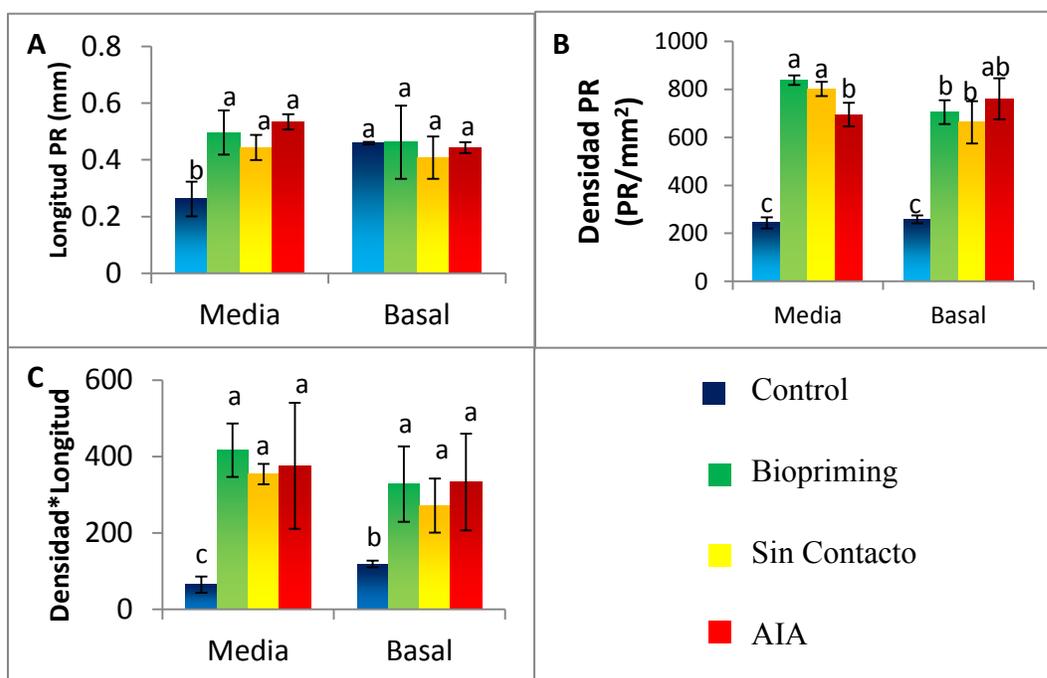


**Fig. 25. Pelos radiculares en diferentes zonas de las radículas de maíz de plántulas con 72 h de crecimiento en diferentes condiciones de exposición a *T. asperellum*. A) Secciones de la raíz que se usaron en este estudio. B) Tinción de PR. Se observa en tres zonas diferentes de la raíz cambios en la longitud y densidad de los pelos radiculares. Tinción con azul de toluidina. Aumento 2x.**

**Tabla 4. Peso fresco y seco de la radícula primaria de semillas germinadas a 72 h en presencia de *T. asperellum*.** Valores indican el promedio  $\pm$  desviación estándar, del peso del tejido de 10 plántulas de tres experimentos independientes.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	1.321 $\pm$ 0.152	0.137 $\pm$ 0.013
Biopriming	1.395 $\pm$ 0.189	0.156 $\pm$ 0.055
Sin Contacto	1.511 $\pm$ 0.250	0.143 $\pm$ 0.020
AIA	1.457 $\pm$ 0.141	0.152 $\pm$ 0.098

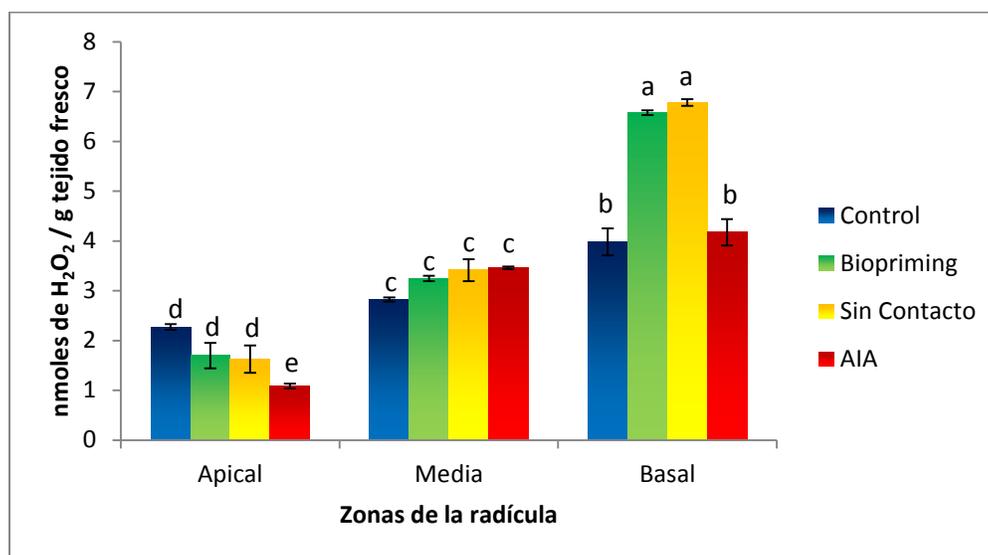
Tanto la zona media como la base de las radículas de las plántulas que interactuaron de alguna manera con *T. asperellum* presentó una mayor longitud y densidad de pelos radiculares (Figura 25, 26A y B). El factor densidad\*longitud, importante por ser un valor que indica la capacidad de absorción de las raíces (College of Agricultural Science, 2014), aumentó alrededor de seis veces en la zona media y dos veces en la parte basal de las raíces de plántulas crecidas en presencia de auxinas o del hongo, independientemente de si la interacción del hongo con la semilla fue directa o *sin contacto* (Figura 26C).



**Fig. 26. Longitud y distribución de PR en diferentes zonas de la radícula.** A) Los valores representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de la longitud de 100 PR en 5 raíces y. C) Densidad de PR por mm<sup>2</sup>, se midieron tres áreas de cada zona de 5 raíces de tres lotes independientes. D) Producto de densidad\*longitud n=3. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey, p=0.05.

### Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Durante la germinación se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que se ha sugerido que pueden estar involucradas en regular el proceso de elongación de la raíz (Carol *et al.*, 2006), por ello se determinó el contenido de peróxido de hidrógeno en las tres zonas de la raíz: ápice, media y basal (Figura 27). En el ápice o punta de la raíz se obtuvo el menor contenido del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en todos los tratamientos. En la zona media de la raíz se incrementó significativamente la cantidad de peróxido en comparación a la punta. El mayor contenido del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encontró en la zona basal de la radícula, y aumentó alrededor de 1.5 veces en los dos tratamientos con *T. asperellum*, no así con las auxinas, tratamiento donde se obtuvo un contenido de peróxido muy similar al control.



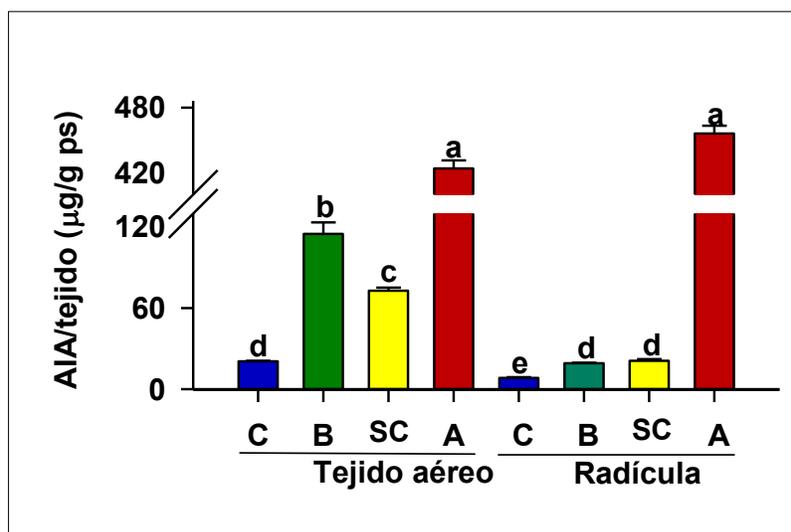
**Fig. 27. Cambios en los niveles de peróxido de hidrógeno en las tres zonas de las radículas de las plántulas que fueron sometidas a los tratamientos con el hongo *Trichoderma asperellum* y auxinas.** Los valores representan los promedios  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes con 5 repeticiones. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p=0.05$ .

### Cuantificación del contenido de AIA

El efecto promotor del crecimiento vegetal de algunos miembros del género *Trichoderma* se ha sugerido que se debe a que el hongo produce AIA (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). En consecuencia se determinó mediante HPLC la concentración de AIA del crecimiento

fúngico sobre PDA del hongo *T. asperellum* HK703. Se encontró que la cepa es capaz de producir AIA, 72.52  $\mu\text{g}$  AIA por gramo de peso seco de tejido de hongo (hifas).

Ya que se determinó que la cepa es capaz de producir auxinas, se midió la cantidad de la hormona presente en los tejidos de plántulas de maíz de los diferentes tratamientos. Durante el biopriming la parte aérea de la plántula de maíz contiene 462 % más AIA que la parte aérea del lote de plántulas control (Figura 28). Las raíces de plántulas con biopriming y del tratamiento sin contacto presentaron más AIA, 129 y 319 % más que las radículas de las plántulas control, sin embargo, la concentración de auxinas en las raíces es menor que en el vástago (tejido aéreo) en todos los casos. De manera notable, la imbibición de las semillas con 10  $\mu\text{M}$  AIA por 30 min lleva a que los tejidos acumulen cantidades altas de AIA. En el tejido aéreo se incrementó 20 veces y en la radícula 54 veces respecto a sus controles. El contenido de AIA es similar en ambos tejidos (barras rojas en la figura 28). Los cromatogramas se muestran en el Anexo 2.



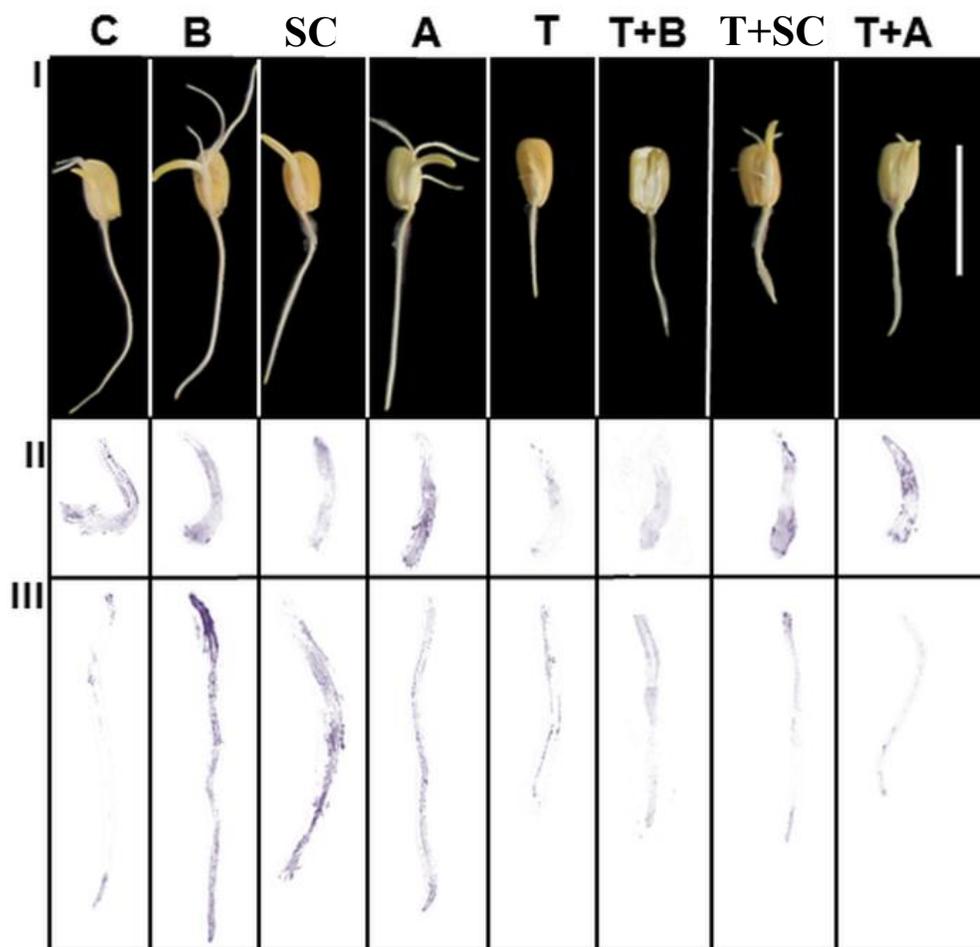
**Fig. 28.** Contenido de AIA en parte aérea y la radícula de plántulas que pasaron por el biopriming o sin contacto con el hongo o por la imbibición en AIA. Las barras indican valores promedio  $\pm$  desviación estándar de tres mediciones en HPLC. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p=0.05$ . C: Control, B: Biopriming, SC: Sin Contacto, A: semillas preincubadas en 10  $\mu\text{M}$  AIA. Letras diferentes señalan diferencias significativas, Tukey,  $p=0.05$ .

## **Detección y localización de AIA en la parte aérea y radicular de plántulas de 72 h de germinación.**

Se localizó el AIA mediante improntas de la parte aérea y radicular de las plántulas que fueron sometidas a diferentes tratamientos con la finalidad de determinar si los hongos cambiaban el patrón de distribución de las auxinas. Para detectar a la auxina se utilizó un anticuerpo que reconoce específicamente al AIA (Figura 29). En el lote control, el AIA se detectó en toda la parte aérea y en zonas discretas de la radícula, principalmente en el ápice. En los tratamientos con *T. asperellum* (B y SC) y en presencia de AIA (A) la auxina se detectó en la parte aérea y en la radícula en ambos tejidos con una distribución homogénea, aunque en el tratamiento de biopriming la intensidad de la reacción con el anticuerpo fue mayor en la base de la radícula, lo anterior fue distinto a la distribución de la auxina en las plántula control en la que se detectó más auxina en la parte aérea y muy poco en la radícula.

La incubación con el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA), un inhibidor conocido del transporte de auxinas, reduce el crecimiento de la planta. Tanto la radícula como la parte aérea crecieron menos, además se detectó un menor contenido de auxinas en ambos tejidos en comparación con la planta control. El tratamiento con TIBA a las plántulas que tuvieron interacción con *T. asperellum* (T+SC) permitió que las raíces seminales aparecieran y que hubiera más pelos radiculares en las raíces, además de una cantidad alta de auxinas en la parte aérea, sin embargo en T+B hubo menor señal de AIA en ambos tejidos y el desarrollo de raíces seminales y pelos radiculares fue escaso, aunque la raíz creció más que la raíz de la semilla que germinó solo con TIBA. En cuanto a los niveles de auxinas en la parte aérea y radicular fueron similares a los de las plántulas control y ligeramente mayores al del tratamiento con solo TIBA.

En resumen, la interacción de las semillas con *T. asperellum* aumenta los niveles de auxinas en las plántulas y también mantiene un nivel alto y homogéneo de auxinas en los tejidos, lo cual podría explicar los efectos en el alargamiento de la parte aérea y la aparición de pelos radiculares en las plántulas que se produjeron de la interacción de las semillas con el hongo.

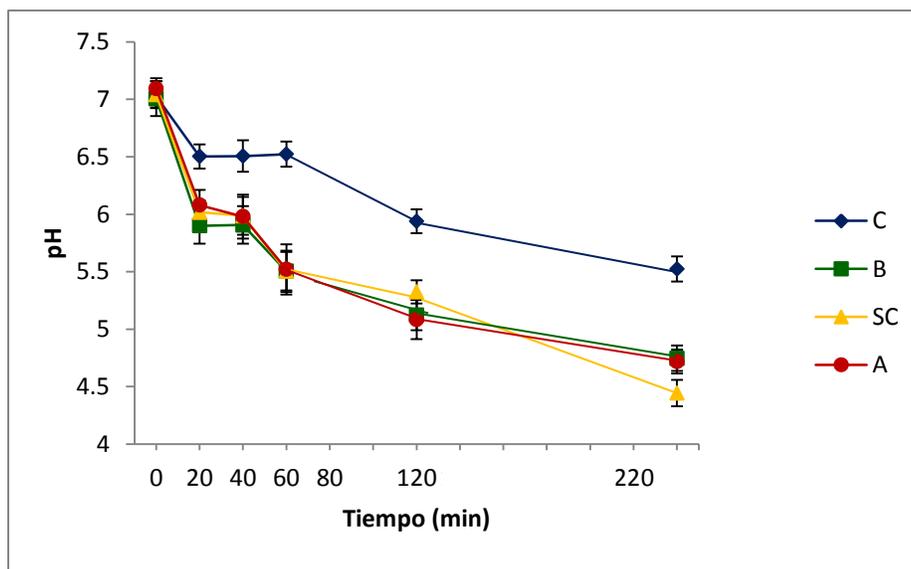


**Fig. 29. Detección de AIA en de plántulas de 72 h.** Se muestran imágenes representativas de los experimentos. **I)** Cambios en la morfología de las plántulas de 72 h debidos a la presencia de *T. asperellum*, AIA o el inhibidor del transporte de auxinas TIBA. **II)** Impronta de la parte aérea. **III)** Impronta de la radícula. Lote control (C), con biopriming (B), tratamiento sin contacto (SC), incubación durante 30 min con 10  $\mu$ M AIA (A), semillas incubadas en 10  $\mu$ M TIBA durante 30 min (T), semillas incubadas con TIBA y germinadas como en el tratamiento de biopriming (T+B), sin contacto (T+SC) y germinadas en agar 1x adicionado con 10  $\mu$ M AIA (T+A). Barra= 5 cm.

### Detección de acidez extracelular durante la interacción de la planta con *T. asperellum*.

De acuerdo a la teoría de crecimiento ácido, la acidificación extracelular es un prerequisite para la elongación de tejidos (Takahashi *et al.*, 2012).

Para determinar si debido al tratamiento con los hongos se producía mayor acidez en el medio, las radículas de plántulas de 72 h de germinación se trasplantaron a agar 0.5x (Anexo 3) o se sumergieron en agua a pH 7 adicionada con 0.003% de púrpura de bromocresol y se midió el cambio de pH (Figura 30). Se observa que durante los primeros 20 min de haber sido sumerjidas las raíces en agua, hay una disminución de 1 unidad de pH tanto en las raíces que proceden del tratamiento con auxinas (A) así como con el hongo (B y SC). En el grupo control se redujo en 0.5 unidades el pH, pasó de 7 a 6.5, manteniéndose en ese valor hasta los 60 min. En contraste, los tratamientos continuaron acidificando el medio llegando a los 60 min a 5.5 de pH, valor que la planta control alcanzo hasta las 4 h.



**Fig. 30. Prueba fisiológica de acidez.** Se registró el valor de pH de diferentes tiempos en medio líquido. Los valores representan el pH medido de 3 muestras independientes  $\pm$  desviación estándar.

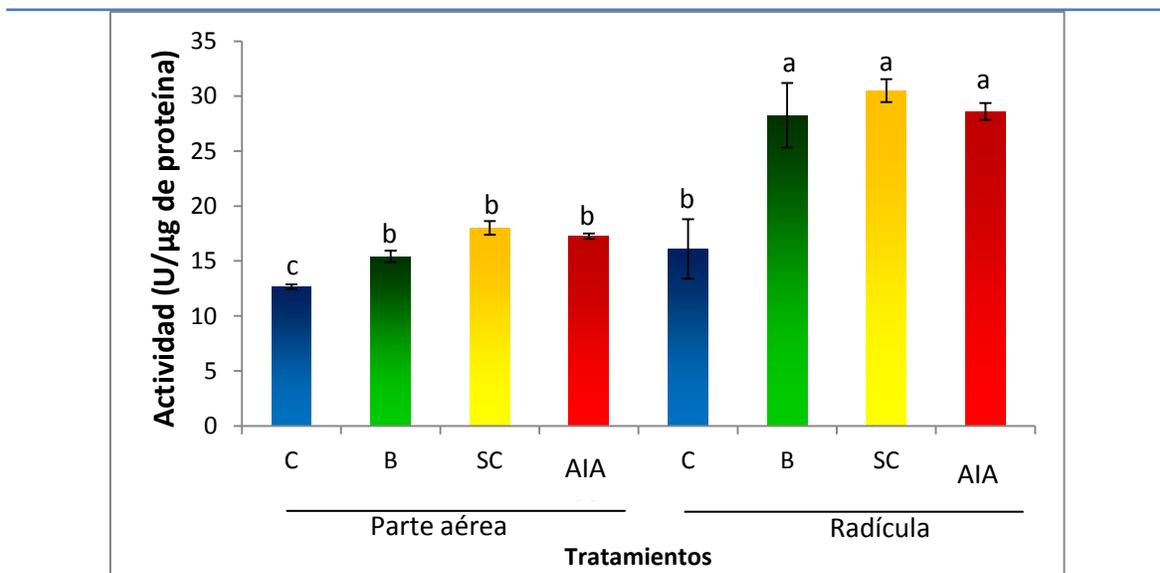
---

## Actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP

La H<sup>+</sup>-ATPasa de MP es importante en varios procesos fisiológicos de las plantas, como la elongación celular, la nutrición, la apertura estomatal y la regulación del pH (Bobik *et al.*, 2009). Una explicación al aumento en la elongación del coleoptilo y los pelos radiculares, así como el incremento en la acidez extracelular durante la interacción de la planta con *T. asperellum* sería un aumento en la actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa de MP. Con el objetivo de comparar las actividades de ATPasa que se alcanzan en interacción con el hongo o en presencia de AIA, se midió la actividad de ATPasa en fracciones microsomales obtenidas de la parte aérea (coleoptilo y mesocotilo) y de las radículas de plántulas provenientes de semillas germinadas 72 h con los tratamientos con *T. asperellum* y de plántulas cuyas semillas fueron preincubadas durante 30 min en 10 μM de AIA (Figura 31).

La actividad de ATPasa de la MP aumentó significativamente tanto en la parte aérea como en la raíz de las plántulas crecidas en presencia del hongo. En la parte aérea el aumento fue 21 y 42 %, con biopriming y sin contacto, respectivamente. En la radícula fue de 75 % con biopriming y 89 % sin contacto. Como era esperado, en el tratamiento de preincubación con auxinas observamos un aumento en la actividad del 36 % en tejido aéreo y del 77 % en la radícula.

Uno de los responsables en el incremento de la actividad de ATPasa de la MP en los tratamientos puede ser el AIA, ya que *T. asperellum* sintetiza la hormona y también porque la plántula acumula AIA cuando el hongo interacciona con la semilla o bien cuando la semilla es preincubada con la hormona (Figura 28).

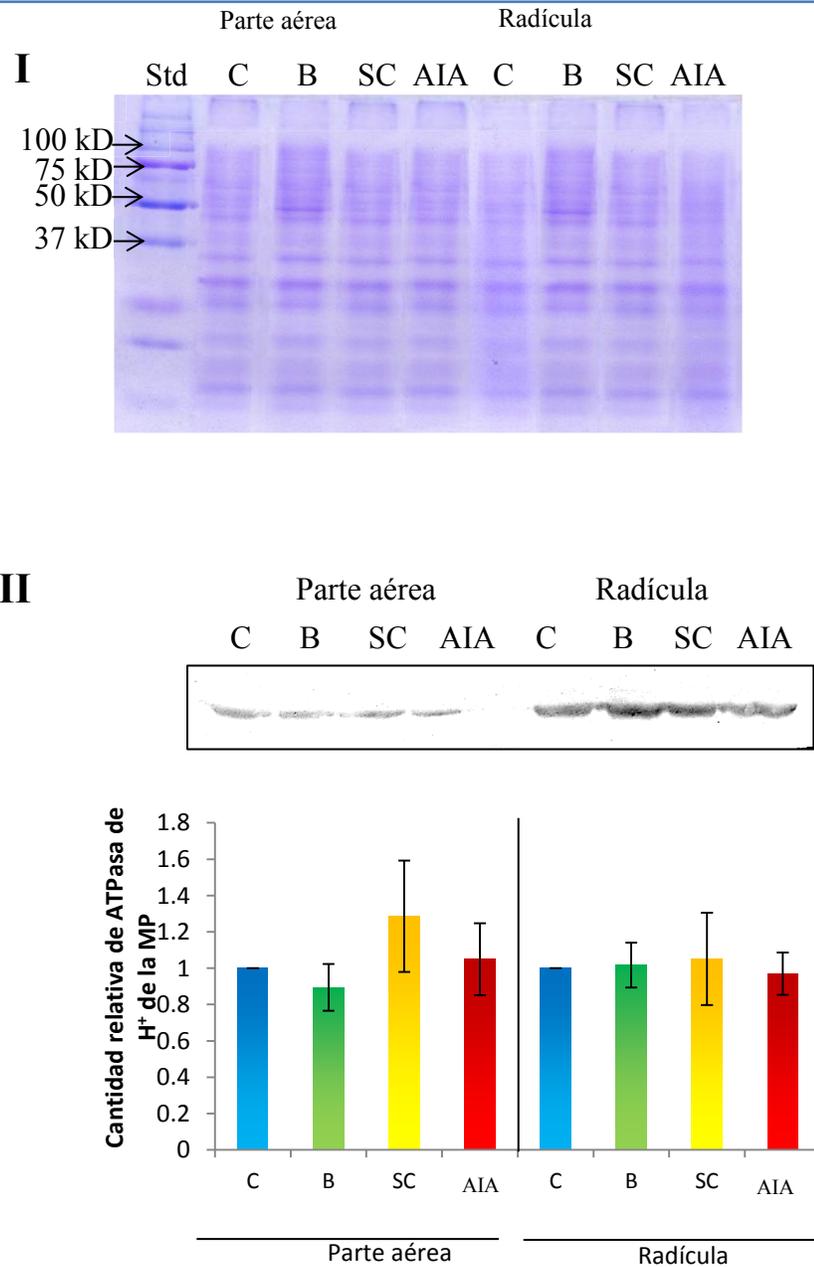


**Fig. 31. Actividad de H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP en presencia de *T. asperellum* y AIA.** Para el ensayo de actividad se utilizaron 10 μg de proteína de la fracción microsomal y se determinó la actividad en presencia de vanadato de sodio o con la mezcla de inhibidores de enzimas que hidrolizan ATP, teniendo como control para la actividad total de hidrólisis de ATP una mezcla de reacción sin inhibidores. Ver materiales y métodos. **C** lote de plantas control, **B** plántulas que pasaron por el bioprimer y **SC** plántulas que crecieron en presencia del hongo en la misma caja pero sin contacto. **AIA** tratamiento de preincubación de semillas en AIA. Los valores representan el promedio ± desviación estándar de la actividad medida en 3 experimentos independientes con 6 repeticiones. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey  $p=0.05$ .

El incremento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP, podría deberse a la activación de la enzima ya presente en las membranas, o bien a la producción de más enzima en la membrana, ambas posibilidades ya han sido planteadas anteriormente (Frias *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2012) y las dos fueron analizadas en este trabajo.

Para determinar si los tratamientos inducían el aumento en la cantidad de enzima en las membranas, se realizaron inmunorréplicas tipo Western de las fracciones microsomales de la parte aérea y las radículas del control, bioprimer, sin contacto y de los tejidos de las semillas preincubadas en 10 μM de AIA. Se usó para la detección de la enzima un anticuerpo que reconoce a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de *A. thaliana* (Figura 32).

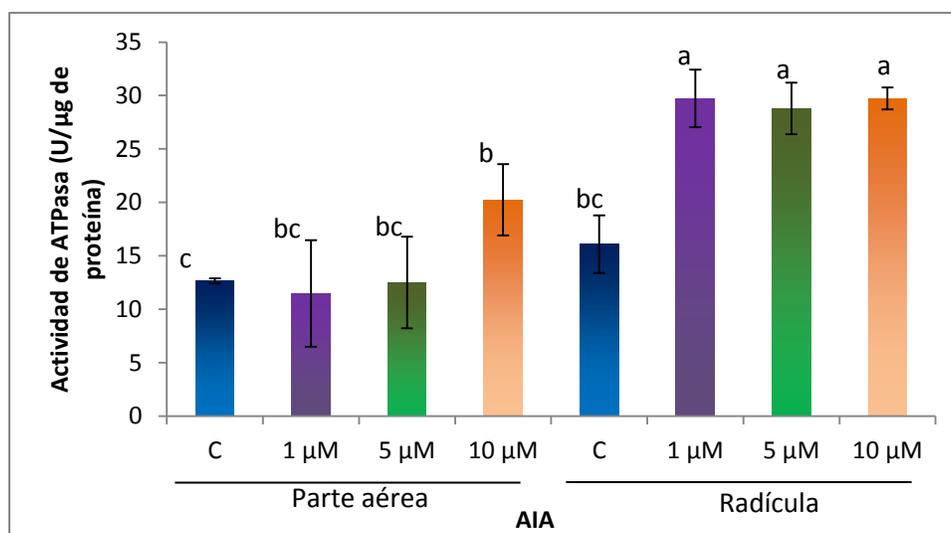
No se encontraron diferencias significativas en los niveles de enzima en la parte aérea o la raíz bajo ningún tratamiento, aunque si se encontró que en las raíces hay más enzima, cerca de  $1.84 \pm 0.50$  veces más en la raíz con respecto a la fracción microsomal de la parte aérea.



**Fig. 32. Cantidad relativa de H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP en fracciones microsomas de la parte aérea y de la radícula (30µg proteína) de las plántulas que fueron sometidas a diferentes tratamientos. I) Tinción de electroforesis SDS-PAGE Coomasie II) Detección de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP. III) Densitometría de las bandas detectadas de la la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP. C: Control, B: Biopriming, SC: Sin contacto, AIA: Semillas embebidas en 10 µM de AIA durante 30 min. Std= marcador de peso molecular. La cantidad de enzima fue determinada en 3 experimentos independientes.**

Debido a lo anterior, se evaluó si el incremento observado se debía a la inducción en la actividad de la ATPasa ya presente en las membranas. Para ello se adicionaron diferentes concentraciones de AIA (1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  AIA concentración final) al medio de hidrólisis donde se determinó la actividad de la enzima de fracciones microsomales del grupo control de tejido aéreo y radícula.

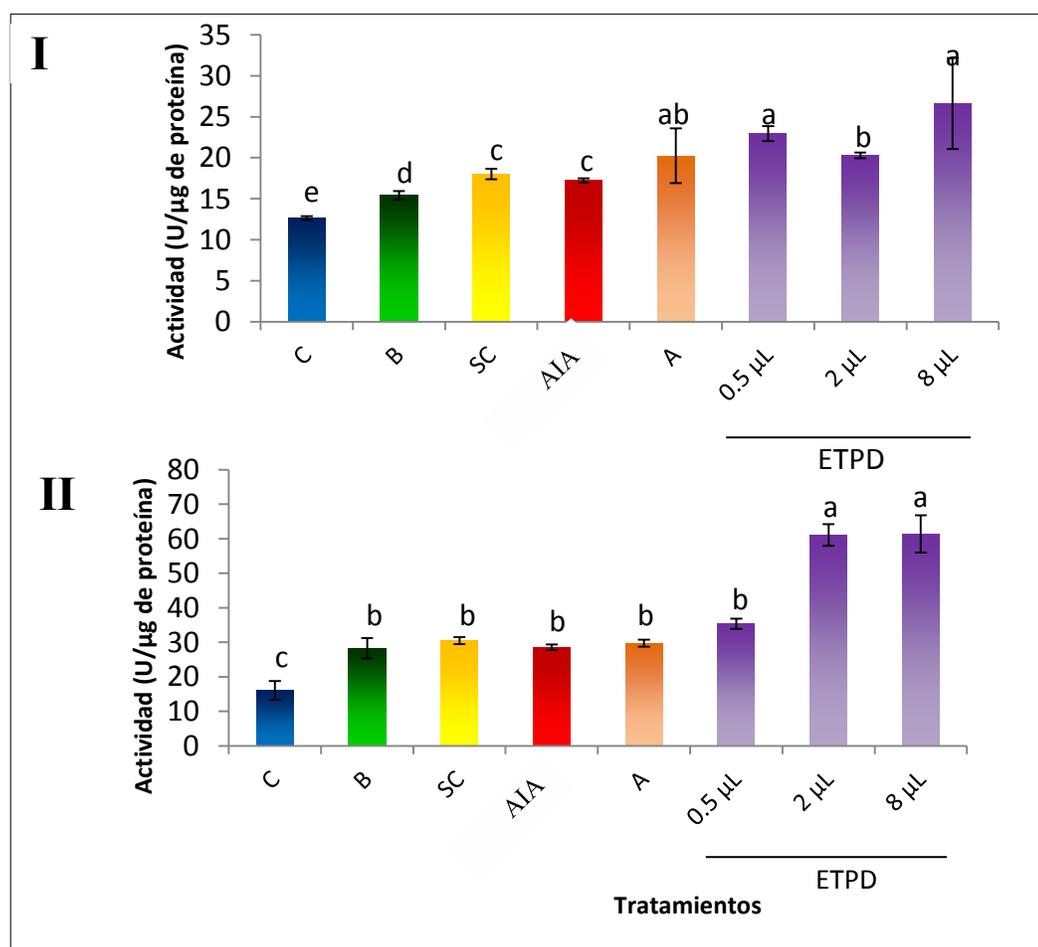
El resultado se observa en la Figura 33, en donde se comprueba que la adición de 10  $\mu\text{M}$  de AIA auxinas lleva aumentó significativamente la actividad en ambos tejidos comparándolos con su respectivo control. Se observa que en las fracciones microsomales de radícula el incremento es mayor y no hay una relación dosis dependiente.



**Fig. 33. Actividad de  $\text{H}^+$ -MP ATPasa inducida por AIA.** Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar, de la actividad de la enzima de fracciones microsomales del grupo control a las que se les añadieron diferentes concentraciones de AIA al medio de hidólisis. C control, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  concentraciones finales de AIA en el medio de hidrólisis. La actividad fue medida en 3 experimentos independientes con 6 repeticiones. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey  $p=0.05$ .

De la misma manera, al medio de hidrólisis se le adicionaron diferentes alícuotas del extracto metabólico de *T. asperellum* (0.5, 2 y 8  $\mu\text{L}$  de ETPD), extraídos de un cultivo del hongo en medio líquido PD (Figura 34). Los niveles de actividad se compararon con los niveles registrados en los tratamientos con el hongo, preincubación en auxinas y adición de 10  $\mu\text{M}$  de AIA al medio de hidrólisis. Observamos que el extracto metabólico de *T. asperellum* sí aumentó la actividad de ATPasa, pero no fue dosis dependiente. El

incremento fue muy notable en el tejido radicular. Interesantemente, el contenido de AIA en las alícuotas fue del orden nanomolar por lo que no se esperaba un aumento en la actividad tan acusado. Con la adición de 8  $\mu\text{L}$  del ETPD, equivalentes a 0.3 nM de AIA, se registraron 26.62 y 61.3 U/ $\mu\text{g}$  proteína en el tejido aéreo y en la radícula respectivamente. Los niveles de actividad fueron superiores a los registrados con la adición de la concentración más alta de AIA evaluada (10  $\mu\text{M}$ ). El aumento fue superior particularmente en la radícula. (Ver Fig 33).



**Fig. 34. Actividad de  $\text{H}^+$  ATPasa-MP en presencia de *T. asperellum* y AIA. I)** Actividad en la fracción microsomal de la parte aérea. **II)** Actividad en la fracción microsomal de la radícula. Tratamientos: **C** control, **B** biopriming, **SC** sin contacto, **AIA** semillas preincubadas en AIA antes de la germinación, **A** 10 $\mu\text{M}$  de AIA adicionado en el medio de hidrólisis donde se midió la actividad de la enzima de fracciones microsomales del grupo control. El **extracto metabólico (ETPD)** se obtuvo de un cultivo líquido en PD del hongo, se añadieron alícuotas del extracto metabólico al medio de ensayo, **0.5, 2 y 8  $\mu\text{L}$**  cuyos contenidos de AIA fueron de **0.02, 0.08 y 0.3 nM** de AIA respectivamente. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de la actividad medida en 3 experimentos independientes con 6 repeticiones. Letras diferentes señalan diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey  $p=0.05$ .

### **Determinación de la cantidad de proteína 14-3-3 y Thr<sup>P</sup>.**

Algunas de las modificaciones post-traduccionales que llevan a activar a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP son la fosforilación del carboxilo terminal en el residuo de Thr<sup>947</sup> y la subsecuente unión de la proteína 14-3-3 (Duby y Boutry, 2009; Elmore *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2012). Para determinar la presencia de ambos factores se realizaron ensayos de inmunorréplica tipo Western.

Para detectar a la proteína 14-3-3 se usaron anticuerpos que son específicos para esta proteína en *Arabidopsis*. No hubo reacción con el anticuerpo hasta después de 24 h de incubación en la solución para el desarrollo de color, lo que llevó a la aparición de una abundante cantidad de bandas que pueden ser producto de una reacción inespecífica. Se esperaba una banda cercana a los 30 kDa.

También se usó un anticuerpo para detectar a las proteínas fosforiladas en Thr y Ser en las fracciones microsomales. No se encontraron muchas proteínas fosforiladas en cualquiera de las fracciones microsomales usadas. Además, en la zona en donde se encontraría la ATPasa, con una masa molecular cercana a los 100 kDa, se observó una banda muy tenue y de similar intensidad en todos los tratamientos realizados.

### **Determinación de efecto de la defosforilación en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP inducida por los extractos de hongo o AIA**

Otra estrategia experimental para explorar la participación de la fosforilación en la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP debido al extracto del hongo, fue defosforilar a la enzima mediante la incubación durante 20 min a 37 °C de las fracciones microsomales con 100 U de fosfatasa alcalina-agarosa activa (+). Se usó como control la incubación con fosfatasa desnaturalizada (-). Posteriormente se midió la actividad de la ATPasa con la adición de AIA o la adición de los extractos metabólicos del hongo en el medio de hidrólisis.

Se encontró que el tratamiento con la fosfatasa alcalina desnaturalizada no afectó la actividad de la ATPasa ni su respuesta a los compuestos que ya se habían probado anteriormente (Tabla 5). La actividad de ATPasa de las fracciones microsomales de la parte aérea fue menor que la de las radículas, el extracto metabólico de *T. asperellum* (ETPD) indujo un aumento en la actividad de ATPasa de la MP tanto de las fracciones microsomales de coleoptilos como de las radículas, aunque la activación fue mayor en las radículas, también el AIA aumentó la actividad de la enzima a niveles similares que los del ETPD, y en menor porcentaje en los coleoptilos que en las radículas.

La adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -lisofostatidilcolina (LPC), un activador conocido de la enzima (Morsomme *et al.*, 2000), produjo un aumento en la actividad de la ATPasa, pero solo en la enzima de las fracciones microsomales del coleoptilo. Es posible que la ATPasa de la MP de los coleoptilos sea diferente a la que hay en las radículas y/o que la membrana tenga una composición lipídica distinta entre los coleoptilos y las radículas, por lo que la adición de LPC no llevó a aumentos similares en la actividad. También es probable que su sensibilidad sea distinta a los componentes del extracto metabólico de *T. asperellum*.

Como se esperaba, el tratamiento de las fracciones microsomales con fosfatasa disminuyó la actividad de  $\text{H}^+$ -ATPasa de MP cerca del 45 % (Tabla 5). Mientras que con la adición de ETPD, se reistró un aumento en la actividad de la ATPasa desforforilada, llegando a niveles comparables a los de la enzima sin desfosforilar, sin embargo la activación es pobre si la comparamos con el 458 % de actividad que produce cuando la enzima no ha pasado por el tratamiento de desfosforilación.

Por otra parte, la adición de AIA indujo la actividad de la ATPasa en porcentajes de 161 a 193 independientemente si la ATPasa fue o no sometida a desfosforilación o si se tomaba de la parte aérea o radicular.

Estas diferencias en la magnitud del aumento en la actividad de la enzima, especialmente cuando la enzima no fue desfosforilada, sugiere que AIA y el ETPD tienen mecanismos distintos para activar a la enzima, probablemente debido a la presencia en el ETPD de otro u otros compuestos que también afecten la actividad de la ATPasa. Cabe recordar que el contenido de AIA en la alícuota del extracto es de orden nanomolar. La adición de LPC a la

fracción microsomal desfosforilada aumentó la actividad de la enzima, aún más que el ETPD y AIA, principalmente cuando la enzima no fue desfosforilada, por lo que LPC podría establecer contactos distintos con la enzima cuando la enzima esta desfosforilada y que le permitan activar más a la enzima.

Al comparar los niveles de actividad ente tejidos, observamos que sólomente cuando la enzima estuvo fosforilada, el aumento en la actividad fue significativamente mayor en las raíces que en el tejido aéreo. Este efecto no se conservó cuando la enzima fue desfosforilada, ya que no hubo diferencias significativas entre los nivles de actividad registrados en ambos tejidos.

Con lo anterior comprobamos que la  $H^+$ -ATPasa de MP presente en las fracciones microsomales obtenidas de todos los tratamientos responden a los mecanismos de regulación reportados en la literatura: la desfosforilación redujo la actividad, la LPC la activa, así como también la presencia de AIA. Adicionalmente encontramos que el ETPD puede activar en niveles distintos a la enzima dependiendo de su grado de fosforilación, ya que desfosforilada tuvo una baja activación, y al estar fosforilada la activación fue mayor. Por lo que para esclarecer el mecanismo de activación de la enzima por ETPD es necesario conocer sus componentes y determinar cuál es el que influye en la actividad de la enzima.

**Tabla 5. Actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP de membranas microsomales incubadas con fosfatasa alcalina.** Se marca como (-) los tratamientos en los que la fosfatasa alcalina se desnaturalizó. Al medio de hidrólisis se le añadieron 100  $\mu$ M de  $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC), 8  $\mu$ L del extracto metabólico de *T. asperellum* cultivado en medio líquido PD (ETPD) ó 10  $\mu$ M AIA. Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes con seis repeticiones. Entre paréntesis se señala el porcentaje de actividad tomando como 100% el valor de actividad encontrado en las membranas microsomales sin el tratamiento de desfosforilación y sin adición de moduladores, el cual corresponde a la actividad nativa de la enzima. Letras diferentes señalan diferencias significativas debido a los tratamientos por tejido (comparación por columna), de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p= 0.05$ . Números diferentes indican diferencias significativas entre los tejidos de cada tratamiento (comparación por fila), de acuerdo a la prueba de Tukey,  $p= 0.05$ .

Tratamiento con Fosfatasa	Modulador añadido al ensayo de actividad	Actividad (U/ $\mu$ g de proteína)	
		Parte aérea	Radícula
-	Ninguno	12.54 $\pm$ 2.34 <sup>c2</sup> (100 %)	17.15 $\pm$ 0.7 <sup>d1</sup> (100 %)
-	ETPD	26.62 $\pm$ 4.43 <sup>b2</sup> (212.28%)	61.37 $\pm$ 5.62 <sup>a1</sup> (357.84 %)
-	AIA	20.24 $\pm$ 3.02 <sup>b2</sup> (161.4 %)	33.17 $\pm$ 0.46 <sup>c1</sup> (193.41 %)
-	LPC	24.71 $\pm$ 3.44 <sup>b2</sup> (197.05 %)	16.17 $\pm$ 0.87 <sup>d1</sup> (94.29 %)
+	Ninguno	7.21 $\pm$ 1.23 <sup>d1</sup> (57.50 %)	9.18 $\pm$ 1.95 <sup>d1</sup> (53.53 %)
+	ETPD	13.38 $\pm$ 2.06 <sup>c1</sup> (106.70 %)	13.8 $\pm$ 2.06 <sup>d1</sup> (80.47 %)
+	AIA	24.06 $\pm$ 3.22 <sup>b1</sup> (191.87 %)	29.73 $\pm$ 7.62 <sup>c1</sup> (173.35 %)
+	LPC	39.80 $\pm$ 5.46 <sup>a1</sup> (317.38 %)	47.97 $\pm$ 6.22 <sup>b1</sup> (279.71 %)

## DISCUSIÓN

### ***T. asperellum* y la elongación de plántulas de maíz.**

Existen múltiples reportes sobre el efecto benéfico en el crecimiento que ejercen hongos del género *Trichoderma* sobre plantas pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos (Harman *et al.*, 2000; Doni *et al.*, 2014). Los efectos más notorios de la interacción de *Trichoderma* con las plantas son el aumento en biomasa de la parte aérea, el desarrollo de un mayor número de hojas y el incremento en la tasa fotosintética de plántulas cuyas raíces estuvieron en contacto con el micelio de *Trichoderma*, o bien con los metabolitos presentes en el sobrenadante del cultivo del hongo en medio líquido (Akladious *et al.*, 2001; Guzmán-Chávez, 2013; Doni *et al.*, 2014). El efecto benéfico se mantiene durante toda la vida de la planta.

Debido a que en el tratamiento de biopriming los tejidos de las plántulas no fueron colonizados a las 72 h (Fig 18) y que observamos respuestas similares de desarrollo en el tratamiento sin contacto, se propone que los efectos observados en presencia de *T. asperellum* fueron inducidos por los metabolitos exudados por el hongo y no por la colonización del tejido. El extracto metabólico del hongo contiene una cantidad muy diversa de moléculas (Adav y Sze, 2014), y es posible que alguna o varias puedan inducir modificaciones en la fisiología de la planta.

Se sabe que la longitud del mesocotilo y del coleoptilo están determinados genéticamente, pero su crecimiento está influenciado por factores ambientales. Se ha reportado que el mesocotilo solo se elonga en la oscuridad (Mgonja, 1988) y en arroz, se ha observado que influyen las condiciones de cultivo (Alibu, 2011). Durante la germinación, una vez que el coleoptilo emerge de la semilla, comienza el crecimiento del mesocotilo y empuja la base del coleoptilo lo que permite que (en condiciones de campo) el coleoptilo emerja del suelo, cuando esto sucede, el coleoptilo queda expuesto a la luz, señal que inhibe la elongación del mesocotilo. La inhibición en la elongación del mesocotilo puede revertirse si se añaden auxinas y giberelinas, por lo que se ha propuesto que estas fitohormonas están relacionadas

a la elongación del mesocotilo (Vanderhoef y Briggs, 1978). Observamos un aumento significativo en el mesocotilo de los tratamientos de biopriming y preincubación de semillas en AIA Fig. 23, Sin embargo, en el tratamiento sin contacto, no se observó el mismo aumento en la elongación. Probablemente se deba a que el medio donde se germinaron las semillas de este tratamiento (PDA) retrasa la elongación debido a los solutos y nutrimentos que contiene.

Mientras que en las raíces, *T. asperellum* redujo la longitud de la radícula primaria en el tratamiento sin contacto y mínimamente en el tratamiento de biopriming de las semillas de maíz. Sin embargo, los efectos más notorios sobre las raíces del maíz fueron el mayor número de primordios de raíces laterales y el aumento en el desarrollo de los pelos radiculares, los cuales fueron más abundantes y largos. Estos resultados concuerdan con lo reportado en *Arabidopsis*, donde *T. virens* y *T. atroviride* promovieron el desarrollo y crecimiento de raíces laterales así como la longitud y densidad de pelos radiculares (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014). Además, bajo condiciones de salinidad las plantas de *Arabidopsis* desarrollaron menor cantidad de raíces laterales, y la posterior incubación en presencia de *Trichoderma* normalizó la formación de raíces laterales en esas plantas.

Los pelos radiculares son extensiones citoplasmáticas de las células de la epidermis de la raíz, y facilitan la absorción de agua y nutrimentos, son el punto de mayor contacto entre la planta y el suelo y constituyen más del 70% de la superficie de contacto (Richardson *et al.*, 2009). La longitud y la densidad de los pelos son factores determinantes en la interacción planta-suelo, ya que mediante estas estructuras se aumenta el área de contacto de la raíz sin una inversión grande de energía lo que facilita la absorción de nutrimentos como el fósforo. Ambas características actúan de forma sinérgica, esto es que la combinación de más pelos radiculares con la mayor densidad, tiene un mayor valor aditivo que cada una por separado (Zhong *et al.*, 2001) y se ha encontrado que el área de contacto de la raíz así como la absorción de nutrimentos se incrementa por una relación longitud x densidad (College of Agricultural Science, 2014b). Este valor se encontró que fue alto en dos zonas de la raíz primaria de las plántulas que estuvieron sometidas a los tratamientos de la interacción con

el hongo, biopriming o *sin contacto*. Se esperaría que estas plantas tuvieran una mejor absorción de nutrimentos en el suelo (Brown *et al.*, 2013).

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) son requeridas para la expansión durante la morfogénesis de órganos como hojas y raíces, su síntesis está relacionada al desarrollo y crecimiento de los pelos radiculares (PR) (Carol *et al.*, 2006). Dentro de las ERO, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es clave en muchos procesos fisiológicos incluyendo senescencia, fotorrespiración, fotosíntesis, movimiento estomatal, ciclo celular, desarrollo, crecimiento, adaptación al medio (Tognetti *et al.*, 2012) y es la principal especie oxidante que se produce dentro y fuera de la célula durante el estrés biótico y abiótico (Voothuluru y Sharp, 2013). Observamos bajo los tratamientos con *T. asperellum* que hubo acumulación de peróxido de hidrógeno en las zonas de la raíz que presentaron más PR, aunque su mayor acumulación ocurrió en la zona basal.

En los PR las ERO se concentran en el ápice y controlan la actividad de canales de calcio requeridos para el crecimiento polar (Carol *et al.*, 2006) mecanismo que también se ha observado en maíz (Liskay *et al.*, 2004). En este proceso participa la NADPH oxidasa de la membrana plasmática que produce aniones superóxido, los cuales son convertidos en radicales hidroxilo por la actividad de la peroxidasa en la pared celular, estos radicales son los responsables del relajamiento de la pared, siendo el 50 % del incremento de longitud en los tejidos/h (Carol *et al.*, 2006), la inhibición de la actividad de la peroxidasa con difenil iodonio (DPI) provoca la inhibición de la producción de ERO y del crecimiento de PR (Carol *et al.*, 2006). Las células de la raíz son capaces de producir ERO de manera transitoria mientras están en la zona de crecimiento (Liskay *et al.*, 2004).

Las ERO también tienen influencia en la biosíntesis, transporte, metabolismo y señalización de auxinas (Tognetti *et al.*, 2012), así como las auxinas pueden inducir la producción de superóxido, este ion al igual que la acidificación del apoplasto se ha reportado que facilita el relajamiento de la pared durante la elongación celular (Schopfer *et al.*, 2001; citado por Tognetti *et al.*, 2012).

## **El papel de las auxinas en el efecto de elongación inducido por *T. asperellum*.**

En esta tesis se utilizó la cepa HK703 de *T. asperellum* de la cual se determinó que sintetiza AIA. Como era esperado, se observó que en el tratamiento de biopriming el crecimiento de la parte aérea aumentó (Fig 23), mientras que en las raíces se modificó la longitud y densidad de los pelos radiculares (Fig 26). Estos efectos en el desarrollo están relacionados a la presencia de auxinas (Lodish *et al.*, 2000; Thomas y Hedden, 2006; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), además corroboramos que las plántulas desarrolladas de las semillas preincubadas con AIA tuvieron estos efectos fisiológicos. En *Arabidopsis* se ha demostrado que la expresión del gen marcador responsivo a auxinas DR5:uidA, se incrementa en presencia de *Trichoderma* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014), por lo que podría sugerirse que la exposición a los exudados del hongo activan la vía de señalización dependiente de auxinas. Al analizar los tejidos de las plántulas de maíz que se desarrollaron en presencia del hongo, se encontró que acumularon mayor cantidad de AIA (Fig. 28).

El aumento en el contenido de AIA en los tejidos puede ser debido a la inducción de la síntesis de auxinas en la planta o bien, a que la auxina producida por el hongo constituya una fuente de auxina exógena para la planta o una mezcla de ambos procesos. Sin embargo en plántulas de semillas incubadas con TIBA (Fig 29) se redujo la acumulación de AIA, lo que posiblemente sugiere que no se induce la síntesis de AIA en el tejido, sino que la auxina proviene del hongo y es distribuida a través de los transportadores PIN difusionales de auxinas que se inhiben con TIBA.

Variaciones en los contenidos hormonales de las plantas han sido reportadas en presencia de *Trichoderma*. La acumulación de ácido salicílico, jasmónico, etileno, así como de giberelinas y auxinas (Martínez-Medina *et al.*, 2011; Sofó *et al.*, 2011; Chowdappa *et al.*, 2013), por lo que es probable que algunas de estas hormonas estén implicadas en la regulación del crecimiento celular.

Se ha demostrado que la disminución de producción de etileno (ET) debido al decremento del precursor 1-ácido carboxilo-1-aminociclopropano (ACC) en la rizósfera durante la

interacción *T. atroviride* y tomate lleva al aumento en la longitud de la raíz (Gravel *et al.*, 2007 citado por Hermosa *et al.*, 2012). El silenciamiento de la ACC deaminasa de *T. asperellum* disminuye la capacidad del hongo para promover el crecimiento vegetal (Viterbo *et al.*, 2007; Hermosa 2012).

Cornejo y colaboradores (2009) demostraron que *T. virens* secreta tanto AIA, como indol-3- acetaldehído e indol-3 etanol y que mutantes de *Arabidopsis* para el transporte de auxinas o la señalización, AUX1, BIG, EIR1, y AXR1, reducen los efectos de la inoculación con *T. virens* en la promoción del crecimiento y los efectos del desarrollo de las raíces. Lo anterior coloca a las auxinas como una de las moléculas importantes en la promoción del crecimiento vegetal inducido por *Trichoderma*. Sin embargo se ha reportado que cepas del género *Trichoderma* no productoras de AIA, también estimulan el desarrollo de las plantas con las que interacciona (Hoyos *et al.*, 2009). La promoción del crecimiento debido a *Trichoderma* es probablemente un fenómeno multifactorial.

Respecto a las auxinas, los transportadores canalizan a esta a las células blanco responsivas a la hormona, lo que desencadena diferentes respuestas como la elongación celular (da Costa *et al.*, 2013). La elongación ocurre en las plantas por una ganancia de volumen en el citosol. Se ha propuesto que cuando las auxinas inducen la acidificación y el relajamiento localizado de la pared celular primaria de la planta, se permite que la célula se expanda en una dirección particular modificando el tamaño y forma de la planta (Lodish *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la adición de auxinas a los tejidos induce la acidificación del apoplasto debido a una mayor actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP (Hager, 2003; Kazan, 2013).

Otra propuesta del efecto de las auxinas en el crecimiento celular asociado a la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP, ocurre con la unión de la auxina a la proteína ABP1 en el apoplasto, la posterior unión de esta proteína a un componente membranal aún no identificado lleva al aumento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP (Tromas *et al.*, 2010). En etapas tempranas de la elongación, las auxinas inducen la activación de la

ATPasa mediante la fosforilación de una Thr, penúltimo residuo de la enzima (Takahashi *et al.*, 2012).

Encontramos mayor actividad de la enzima en las fracciones microsomales de la parte aérea y de las raíces de las plántulas independientemente del tipo de interacción que las semillas tuvieron con el hongo, aunque la mayor activación se encontró en las raíces. La H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP bombea protones al apoplasto a expensas de la hidrólisis de ATP. La acidificación del apoplasto se ha propuesto como necesaria para permitir la expansión celular (Tomas *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2012). A pH cercano a 4.5, la actividad de enzimas que remodelan la pared celular como las expansinas aumenta. Estas enzimas rompen los puentes de hidrógeno entre las fibras de celulosa, causando que la pared celular se ablande, por lo tanto la menor rigidez de la pared permite que la célula se elongue (Lodish *et al.*, 2000).

Se observó mayor acidificación del medio en donde se incubaron las semillas que tuvieron los tratamientos con el hongo (Fig 30 y Anexo 3), y que coincide con incremento en la actividad de hidrólisis de ATP por la ATPasa registrada en los mismos tratamientos. Esta relación ha sido descrita en mutantes de *Arabidopsis* con actividad aumentada de la H<sup>+</sup>-ATPasa como *ost-2* (*Open Stomata2*) que expresan constitutivamente un alelo activo de la ATPasa codificado por AHA1, y en plantas de *Arabidopsis* sobre-expresoras de SAUR19 que presentan actividad aumentada en el bombeo de protones. Se sugiere que el incremento de la expansión celular en las mutantes puede ser resultado de la actividad elevada de la enzima y que se relaciona con la acidificación del medio (Spartz *et al.*, 2014). En el estudio de Lei *et al.* (2015) comprobaron que la acidificación del medio incrementó la absorción de nutrimentos como el fosfato, la mayor acidificación se registró en la zona de elongación y de diferenciación de las raíces, zonas en que las células se expanden y hay presencia de pelos radiculares. Hojas de cebada incubadas en agarosa adicionada con púrpura de bromocresol y vanadato que es un inhibidor de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP, no acidifican el medio, sin embargo si a la agarosa se adicionaba fusicoccina, molécula que aumenta la actividad de la enzima, la respuesta de acidificación se incrementó (Visnovitz *et al.*, 2011).

Es factible que el hongo secrete otras moléculas que modifiquen la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa sin embargo, no hay reportes sobre qué otras moléculas que secreta *Trichoderma* puedan inducir esta respuesta, ya que los estudios se han centrado en el mecanismo de activación mediante la señalización de la hormona AIA (Stewart y Hill, 2014) y en los análisis de secretoma el enfoque está en la identificación de celulasas y lignanasas debido a que son de gran interés industrial (Adav y Sze, 2014). Existen evidencias de moléculas secretadas por hongos que se asocian a diferentes plantas y que tienen efecto en la actividad de la enzima.

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos más estudiados en la activación de la ATPasa es la fosforilación en el penúltimo residuo del carboxilo terminal, lo que lleva a la unión de la proteína 14-3-3. La desfosforilación en ciertos residuos de la ATPasa puede activar a la enzima en presencia de moléculas señalizadoras secretadas por el hongo (Ramos *et al.*, 2008). Además, cambios en la composición lipídica de la membrana también pueden afectar la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa (Morales-Cedillo *et al.*, 2015). Por lo que se hace necesario llevar a cabo el fraccionamiento de los exudados del hongo para determinar cuáles componentes pueden modificar la actividad de la enzima.

La activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa por auxinas no es único el mecanismo conocido. En el estudio de Frias *et al.* (1996), los RNAm de la isoforma 2 de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP de maíz se enriquecieron en tejidos no vasculares de los coleoptilos incubados con 20 μM de AIA durante 40 min. Sin embargo, el incremento registrado en la actividad de la enzima bajo los tratamientos con *T. asperellum*, no se debió a un cambio en la cantidad de ATPasa en las fracciones microsomales (Fig. 32), por lo que el aumento podría deberse a cambios post-transcripcionales como lo observado en el estudio de Takahashi *et al.* (2012) en el que se reporta que la adición de auxina no modificó la cantidad de la enzima en coleoptilos. Otro resultado que confirma que no hay un aumento en los mensajeros para la proteína es que la adición del extracto metabólico del hongo a fracciones microsomales de las plántulas control provocó que la actividad de la ATPasa aumentara.

Se ha demostrado que el carboxilo terminal de la H<sup>+</sup>-ATPasa de plantas es autoinhibitorio esto es, la actividad de la enzima es moderada por la regulación ejercida por su carboxilo terminal, presente en la porción hidrofílica de la enzima (Morsomme y Boutry *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2007; Piette *et al.*, 2011; Okumura *et al.*, 2012). Una de las modificaciones que lleva a un aumento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP es la fosforilación del carboxilo terminal en su penúltimo residuo, la treonina 948 en *A. thaliana* (Svennelid *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2012), aunque se conoce que hay otros posibles sitios de fosforilación en la región del carboxilo y que de estos no todos ellos llevan a un incremento en la actividad de la ATPasa (Takahashi *et al.*, 2009; Spartz *et al.*, 2014). No fue posible mediante el uso de anticuerpos que reconocen treoninas y serinas fosforiladas determinar si hubo un cambio en la fosforilación de la enzima, posiblemente se necesitaban probar una menor dilución del anticuerpo o tiempos más prolongados de exposición con el primer anticuerpo, aunque esto llevaría a tener una cantidad importante de proteínas fosforiladas que para el caso de la raíz se ha documentado podrían ser cerca de 2,852 y en el coleoptilo de alrededor de 3557 (Facette *et al.*, 2013; Marcon *et al.*, 2015).

Tampoco fue posible detectar a la proteína 14-3-3 que se sabe se une a la enzima fosforilada (Morsomme y Boutry *et al.*, 2000; Pedersen *et al.*, 2007), esto último posiblemente debido a que el anticuerpo que se usó reconoce a la 14-3-3 de *A. thaliana* y no a la de maíz. El proveedor del anticuerpo menciona que ha confirmado la reactividad del anticuerpo contra la 14-3-3 en *Arabidopsis thaliana*, *Lilium longiflorum*, *Mesembryanthemum crystallinum* y el alga *Neochloris oloabundans* y predice que podría reaccionar con *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Gossypium hirsutum*, *Brassica sp*, *Physcomitrella patens* y *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://www.agrisera.com/en/artiklar/14-3-3-family-general-regulatory-factor-family.html>). Sin embargo, la reacción del anticuerpo no fue la esperada: no hubo presencia de ninguna banda a tiempos cortos de revelado y a tiempos prolongados (12 h de revelado) se detectaron demasiadas bandas de reacción.

---

**La activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa inducida por *T. asperellum* es mediante un mecanismo distinto al de la auxina.**

Otra estrategia que se ha usado para demostrar el papel de la fosforilación en la activación de la enzima es promover su desfosforilación (Hayashi *et al.*, 2010), por lo que se incubaron fracciones microsomales provenientes de tejido que no fue expuesto al hongo con fosfatasa alcalina (Desbrosses *et al.*, 1998). Se comprobó que el tratamiento de desfosforilación con fosfatasa alcalina disminuye la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa en las membranas nativas (Tabla 5). También se corroboró que la ATPasa preserva su capacidad de activación utilizando LPC, activador conocido de la enzima. Interesantemente la actividad inducida por LPC fue mayor cuando la ATPasa estaba desfosforilada. Si bien el mecanismo por el cual la LPC induce el aumento en la actividad de la ATPasa no es completamente conocido, se ha propuesto que la activación se da mediante el desplazamiento del carboxilo terminal de la enzima, sea por la unión directa del LPC al carboxilo o bien, por cambios conformacionales en la enzima en donde el carboxilo se desplace, provocados por la LPC (Morales-Cedillo *et al.*, 2015). El tratamiento de desfosforilación de las fracciones microsomales, puede ocasionar cambios conformacionales en la ATPasa por lo cual, la LPC podría tener diferentes sitios de contacto con la enzima, lo que explicaría el porqué de la diferencia de activación entre el estado nativo y el estado desfosforilado.

La actividad de la ATPasa en presencia de LPC también fue diferente entre el tejido aéreo y la radícula. Se ha demostrado en *Nicotiana tabacum* que la LPC disminuye la K<sub>M</sub> del ATP de la H<sup>+</sup>-ATPasa en raíces, pero no en hojas y las diferencias en la activación son debidas a que hay isoformas diferentes en los tejidos (Olsson *et al.*, 1995; citado por Morales-Cedillo *et al.*, 2015).

La adición de auxinas a membranas microsomales aisladas indujo la activación de la enzima, lo que sugiere que todos los componentes que llevan a la activación de la enzima y que responden al AIA se encuentran en las membranas aisladas. Además y contrario a lo que se observó con el extracto metabólico del hongo, el AIA induce niveles de activación

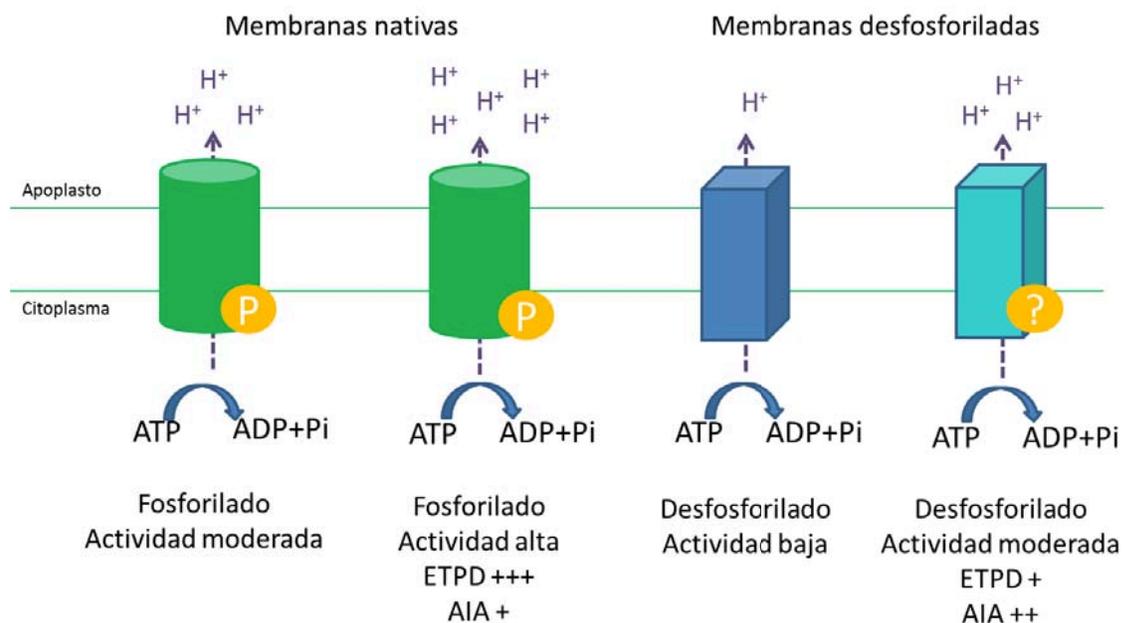
similares entre la enzima en estado nativo y la desfosforilada, por lo que es posible que el AIA active a una cinasa que se encuentre en la membrana. Esto explicaría el que se llegue a un nivel similar de actividad de la enzima aun cuando la enzima haya sido sometida al tratamiento con fosfatasa. Estos resultados concuerdan con lo reportado en *Arabidopsis* en donde la activación de la ATPasa inducida por AIA depende de la fosforilación de la enzima (Takahashi *et al.*, 2012).

En el caso del ETPD, la activación de la ATPasa es mayor cuando está fosforilada, por lo que la activación podría deberse a un mecanismo diferente al de la auxina. En la mezcla de compuestos presentes en el ETPD puede haber moléculas inductoras la actividad de la ATPasa. Debido a que el incremento en la actividad se registró cuando la enzima estaba en su estado nativo, es posible que estas moléculas sean activas en una conformación determinada de la ATPasa.

La activación encontrada entre la fracción microsomal del tejido aéreo y la radicular es diferente, lo que también sugiere que hay isoformas diferentes de la ATPasa en ambos tejidos, o bien que se encuentran en estados de fosforilación distintos. Según la base de datos “Plant Membrane Protein Data Base”, Aramemnon ([http://aramemnon.uni-koeln.de/seq\\_view.ep? ClusterID=3138&OrgID=4&cat=15](http://aramemnon.uni-koeln.de/seq_view.ep? ClusterID=3138&OrgID=4&cat=15)) se propone que en maíz hay catorce isoformas para la H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP (Anexo 1). Frias y colaboradores (1996) describieron a MHA2 (número de acceso GRMZM2G019404) como la isoforma más abundante H<sup>+</sup>-ATPasa de la MP, se encuentra tanto en coleoptilos como en raíces, aunque mayormente en las raíces. Mientras que MHA2 y GRMZM2G104325 (ATPasa tipo P3A putativa) se encuentra expresada en todas las zonas de la raíz (Marcon *et al.*, 2015).

En resumen, los resultados anteriores se esquematizan en la figura 35. Se representa a la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP presente en las fracciones microsomales (cilindros verdes) y la ATPasa de fracciones microsomales que fueron desfosforiladas (prismas azules) de manera distinta ya que presentan un grado de fosforilación distinto lo que puede afectar la conformación de la enzima.

En condiciones nativas, la ATPasa tuvo una actividad moderada, la cual aumentó cuando se añadió el extracto metabólico del hongo (ETPD) o AIA, el aumento es mayor con la adición del ETPD. El incremento en la actividad supone mayor cantidad de protones bombeados al apoplasto que llevará a la acidificación del mismo. Por el contrario, en las membranas desfosforiladas la actividad basal disminuyó, pero cuando se le agregó AIA la actividad aumentó más en comparación a cuando se le añadió ETPD. Lo anterior sugiere que el AIA y el ETPD tienen diferentes mecanismos de activación.



**Fig. 35. Modelo que resume la activación de la  $H^+$ -ATPasa de MP debido a la presencia del extracto metabólico de *T. asperellum* (ETPD) y auxina (AIA). P indica si la enzima está fosforilada, es decir en estado nativo.**

---

## **Otros mecanismos inducidos por *T. asperellum* que tienen efecto positivo en el crecimiento.**

### **Incremento en la absorción de nutrimentos.**

El incremento en la cantidad y elongación de los pelos radiculares en las raíces que fueron expuestas al hongo, hacen suponer que hay un mayor intercambio de nutrimentos entre el hongo y la planta como se ha explicado anteriormente (Harman, 2006; Lorito *et al.*, 2010). Lo anterior es posible que ocurra en condiciones de campo, como se ha observado en arroz (Sharma *et al.*, 2012). Sin embargo, en esta tesis no sometimos a las plántulas a regímenes distintos de nutrición por lo que desconocemos si las plantas producto del biopriming o *sin contacto* absorben con mayor velocidad o eficiencia los nutrimentos del suelo. Las plántulas fueron crecidas en agar, por lo que la mayor absorción de nutrimentos no explica el aumento en el crecimiento de la parte aérea y los cambios en la radícula de las plantas de maíz. Sin embargo es posible que la planta y el hongo intercambien carbono y otras moléculas que promuevan el desarrollo radicular, como la auxina de la cual se conoce que tiene efecto en el desarrollo radicular (Overvoorde *et al.*, 2010).

### **Aumento en el crecimiento debido al control de patógenos en la rizósfera.**

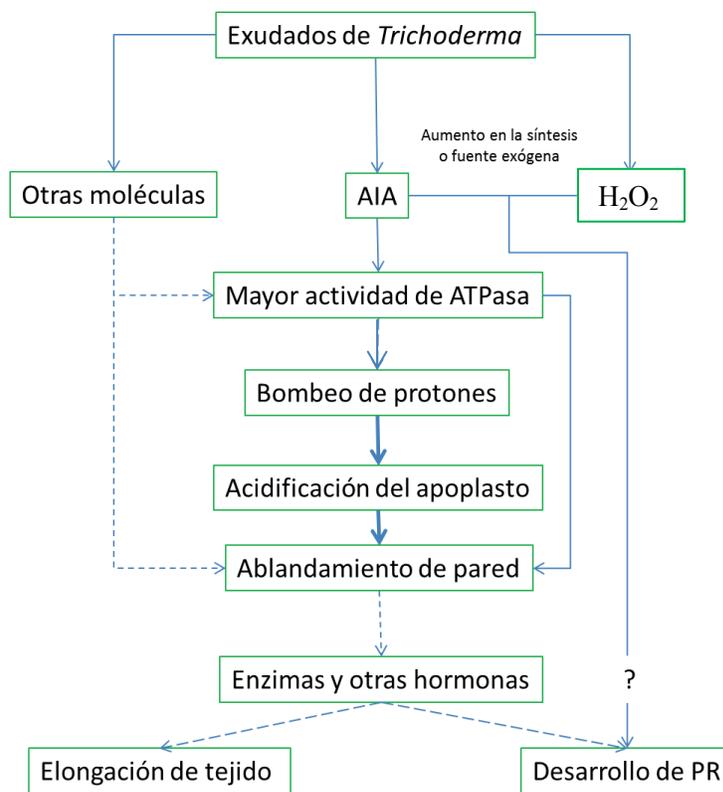
En la rizósfera se establece un complejo intercambio de señales químicas, en donde se encuentra una amplia variedad de moléculas tanto en composición como en función. Quimioattractores, antibióticos, antifúngicos, nutrimentos (sacarosa y rafinosa entre otros), proteasas e incluso fitohormonas, son exudados tanto por la planta como por los organismos que viven en el suelo (Berendsen *et al.*, 2012). Algunas de estas moléculas pueden ser señalizadoras y desencadenan la respuesta de defensa de la planta para que comience la síntesis de fitohormonas, proteínas u otros componentes que inducirán respuestas específicas ante la presencia de algún organismo potencialmente patógeno o invasor (Jung y McCouch, 2013).

A pesar que en esta tesis no se retó a la plántula contra un patógeno posterior a la infección con *Trichoderma*, es importante mencionar que otro de los efectos benéficos descritos para *Trichoderma* es la reducción en la infección causada por patógenos en plantas. De forma directa, *Trichoderma* puede micoparasitar otros hongos y secretar antibióticos o enzimas que degradan la pared celular, como quitinasas y glucanasas (Lorito *et al.*, 1998; Ceasar y Ignacimuthu, 2012). A pesar de que estas enzimas pueden degradar a su propia pared, la alta tasa de crecimiento de *Trichoderma* y su capacidad de secretar proteínas que protegen su pared celular le permiten sobrevivir (Gruber y Seidl-Seiboth, 2012). De manera indirecta el género *Trichoderma* induce los mecanismos de defensa de la planta y que llevan a la resistencia contra una posterior infección (Harman *et al.*, 2004; Shores y Harman, 2010).

Experimentos en el grupo de trabajo han demostrado que tanto la expresión de las vías de respuesta inmune como la de SA y la del JA, así como la expresión de las proteínas relacionadas a la defensa, aumentó en las hojas de las plántulas con biopriming a 72 h de germinación (Ramírez-Alejandri comunicación personal). Por lo que a pesar de que el hongo no se encuentra internalizado en las raíces, la planta percibe los exudados del hongo y esto tiene efectos en la morfología de la planta y en su fisiología aun cuando no se presente un atacante adicional. Se desconoce como el aumento en las defensas de la planta tiene relación con el incremento en el crecimiento de la planta (McConville, 2014), pero es posible que el aumento en la demanda de carbono para la síntesis de moléculas implicadas en la señalización y defensa lleven a que el reparto de carbono se vea alterado para ser más eficiente, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar si lo anterior ocurre durante la interacción de *Trichoderma* y las plántulas de maíz.

Observamos en este estudio que *T. asperellum* puede promover el crecimiento de la planta y cambiar la arquitectura radical debido a diferentes factores. El hongo sintetiza una gran batería de moléculas que pueden ser señalizadores para la planta huésped (Chacón, 2007), en particular en este estudio encontramos que durante la interacción del hongo con maíz se acumula AIA tanto en la parte aérea como en la raíz, además el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta en la parte basal y de elongación de la raíz, sin embargo no se ha determinado si el aumento tanto de AIA como del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se debe a la absorción de los compuestos o bien a que la planta

aumente la síntesis de ellos o a una pobre o deficiente degradación. En el caso del AIA es posible que los transportadores difusionales PIN estén llevando a cabo la distribución de la auxina exógena. Además, los componentes del exudado del hongo así como las auxinas, inducen el aumento en la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de MP, lo que supone el incremento en el bombeo de protones y por lo tanto la acidificación del apoplasto. La acidificación que puede promover el relajamiento de la pared celular, dicho fenómeno, junto con la actividad de otras enzimas en la pared como las expansinas o peroxidasas (Tromas *et al.*, 2010) o bien en la membrana plasmática como la ACC deaminasa (Hermosa *et al.*, 2012) y un cambio en el nivel de hormonas como el ácido giberélico o el etileno (Chowdappa, *et al.*, 2013), pueden en conjunto ocasionar el aumento en la elongación del tejido y del desarrollo de pelos radiculares (Fig. 36).



**Fig. 36. Procesos que llevan a la elongación de tejidos o desarrollo de pelos radiculares en maíz en respuesta a la presencia de *T. asperellum*.** Las líneas continuas representan relaciones comprobadas y las discontinuas señalan relaciones no conocidas completamente.

## CONCLUSIÓN

La elongación de la parte aérea y el cambio en la arquitectura radicular inducidos por *Trichoderma asperellum* se relacionó con el incremento de la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP y la acidificación extracelular, sin embargo tanto el proceso fisiológico de elongación como la actividad de la enzima, no se debieron exclusivamente a la auxina que secreta el hongo y que se acumula en los tejidos.

## PERSPECTIVAS

Comprobar si el aumento en la actividad de la ATPasa corresponde con un aumento en el bombeo de protones.

Indagar el papel que tienen las giberelinas y el etileno en la promoción del crecimiento de radículas inducido por *T. asperellum* como mecanismos relacionados a la respuesta a auxinas.

Estudiar la respuesta en el crecimiento y la activación de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP en presencia de extractos metabólicos de cepas de *T. asperellum* no productoras de AIA.

Debido a que el extracto metabólico del hongo indujo la activación de la enzima, se propone indagar sobre la composición del extracto y determinar si algún compuesto o una fracción del extracto tienen efecto en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa de MP.

Ya que el estado de fosforilación de la ATPasa presente en las fracciones microsomales parece tener un papel determinante en la respuesta al aumento en la actividad inducido por *T. asperellum*, es necesario explorar cuáles residuos de la enzima están fosforilados en la enzima y si una desfosforilación parcial de la enzima también responde a la presencia de los exudados del hongo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adav, S. S., Sze, S. K. 2014. *Trichoderma* secretome: an overview. En: Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., Tuohy, M. G. Elsevier B.V. 103-114 p.
- Aducci, P., Camoni, L., Marra, M., Visconti, S. 2002. From cytosol to organelles: 14-3-3 proteins as multifunctional regulators of plant cell. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 53: 49-55.
- Akladios, S. A. y Abbas, S. M. 2014. Application of *Trichoderma harzianum* T22 as a biofertilizer potential in maize growths. *Journal of Plant Nutrition* 37: 30-49.
- Alibu, S., Saito, Y., Shiwachi, H., Irie, K. 2011. Relationship between coleoptile and mesocotyl elongation of upland rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under submergence and soil-sand culture. *African Journal of Agricultural Research* 6: 6463-6472.
- Arango, M., Gévaudant, F., Oufattole, M., Boutry, M. 2003. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 216: 355-365.
- Axelsen, K. B., Venema, K., Jahn, T., Baunsgaard, L., Palmgren, M. G. 1999. Molecular dissection of the C-terminal regulatory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase AHA2: Mapping of residues that when altered give rise to an activated enzyme. *Biochemistry* 38: 7227-7234.
- Azcon-Bieto, J. 2008. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2ª edición. Mc Graw-Hill/Interamericana de España S. A. Madrid, España. 656 p.
- Balzán, S., Johal, G. S., Carraro, N. 2014. The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00393
- Bennet, T. y Scheres, B. 2010. Root development- Two meristem for the price of one? *Current Topics in Developmental Biology* 91: 67-102.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17: 478-486.
- Bobik, K., Boutry, M., Duby, G. 2009. Activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by acid stress. Antibodies as a tool to follow the phosphorylation status of the penultimate activating Thr. *Plant Signaling and Behavior* 5: 681-683.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., Willmitzer, L. 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1003221.
- Brown, L. K., Geroge, T. S., Dupuy, L. X., White, P. J. 2013. A conceptual model of root hair ideotypes for future agricultural environments: what combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? *Annals of Botany* 112: 317-330.
- Buch-Pedersen, M. J., Palmgren, M. G. 2003. Conserved Asp684 in transmembrane segment M6 of the plant plasma membrane P-type proton pump AHA2 is a molecular determinant of proton translocation. *Journal of Biological Chemistry* 278: 17845-17851.
- Campos, F., Pérez-Castiñeira, J. R., Villalba, J. M., Culiáñez-Marcía, F. A., Sánchez, F., Serrano, R. 1996. Localization of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Molecular Biology*. 32: 1043-1053.
- Canales, J., Moyano, T. C., Villaroel, E., Gutierrez, R. A. 2014. Systems analysis of transcriptome data provides new hypothesis about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00022.
- Carol, R. J. y Dolan, L. 2006. The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Botany* 57: 1829-1834.

- Carrillo, L. 2003. Estructuras de los hongos. Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 151 p.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sanchez-Bravo, J., Acosta, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.
- Cesar, S. A., Ignacimuthu, S. 2012. Genetic engineering of crop plants for fungal resistance: role of antifungal genes. *Biotechnology Letters* 34: 995-1002.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., Delgado-Jarana, J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology* 10: 19-27.
- Chowdapa, P., Mohan, K. S. P., Jyothi, L. M., Upreti, K. K. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control* 65: 109-117.
- College of Agricultural Science. 2014. Procedimiento para la medida de la longitud de pelos radicales. <http://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/metodologia-de-investigacion/pelos-radicales/protocolos-para-la-visualizacion-de-pelosradicales/procedimiento-para-la-medida-de-la-longitud-del-pelos-radicales>
- College of Agricultural Science. 2014b. Root hair density. [plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/computer/simroot/root-trait-demo/roothair-density](http://plantscience.psu.edu/research/labs/roots/methods/computer/simroot/root-trait-demo/roothair-density)
- CONABIO. 2012. Maíces y razas de maíces. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. <http://www.biodiversidad.gob.mx/usuarios/maices/razas2012.html>
- CONABIO. 2011. Base de datos del proyecto global “Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México”. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/proyectoMaices.html>
- CONABIO 2010. Argumentación para conservar las razas de maíces nativos de México. Taller con especialistas en maíces nativos, realizado los días 17 y 18 de marzo de 2010 en las instalaciones de la CONABIO. México, D. F. [http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo6\\_ReunionesTalleres/Tabla%20razas\\_marzo%202010.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo6_ReunionesTalleres/Tabla%20razas_marzo%202010.pdf)
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R., Lopez-Bucio, J. 2014. *Trichoderma* improves growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* doi: 10.1094/MPMI-09-13-0265-R.
- Contreras, C. H. A., Macías, R. L., Cortés, P. C., Bucio, L. 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.
- Cunnings, B. 2005. Pearson Education. [http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch39/auxin\\_response.html](http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch39/auxin_response.html)
- da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S., Fett-Neto, A. G. 2013. When the stress and developmen go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Sciences*. doi: 10.3389/fpls.2013.00133.
- de Smet, I., Tetsumura, T., de Rybel, B., Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarum, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennet, M. J., *et al.* 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134: 681–690.
- Denison, F. C., Paul, A. L., Zupanska, A. K., Ferl, R. J. 2011. 14–3–3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 22: 720–727.

- Desbrosses, G., Stelling, J., Renaudin, J. P. 1998. Dephosphorylation activates the purified plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase possible function of phosphothreonine residues in a mechanism not involving the regulatory C-terminal domain of the enzyme. *European Journal of Biochemistry* 251: 496-503.
- Doni, F., Isahak, A., Radziah, C., Zain, C. H., Yusoff, W. M. W. 2014. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *AMB Express*. doi:10.1186/s13568-014-0045-8.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M., Penel, C. 2000. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* 174: 332–341.
- Elmore, J., Coaker, G. 2011. The role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in plant–microbe interactions. *Molecular Plant* 4: 416-427.
- Ender, T. A., Strader, L. C. 2015. Auxin activity: Past, present, and future. *American Journal of Botany* 102: 180-196.
- Facette, M. R., Shen, Z., Björnsdóttir, F. R., Briggs, S. P., Smith, L. G. 2013. Parallel proteomic and phosphoproteomic analyses of successive stages of maize leaf development. *The Plant Cell* 25: 2798-2812.
- FAO. 2001. El maíz en los trópicos. FAO Plant production and Protection Series. <http://www.fao.org/DOCREP/003/X7650S/X7650S00.HTM>
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/T0395S/T0395S00.htm>
- Ferrigo, D., Raiola, A., Rasera, R., Causin, R. 2014 *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection* 65: 51-56.
- Frias, I., Caldeira, M. T., Pérez-Castiñeira, J. R., Navarro-Aviño, J. P., Culiañez-Macia, F. A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pagés, M., Hager, A., Serrano, R. 1996. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles. *The Plant Cell* 8: 1533-1544.
- Fuglsang, A. T., Guo, Y., Culin, T. A., Song, C., Kristiansen, K. A., Bych, K., Schulz, A., Shabala, S., Schumaker, K. S. 2007. *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19: 1617-1634.
- Gange, A. C. y Ayres, R. L. 1999. On the relation between arbuscular mycorrhizal colonization and plant 'benefit'. *Oikos*: 615-621.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M., Gianinazzi, S., 2000. Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* 211: 609-613.
- Glenn, A. E., Zitomer, N. C., Zimeri, A. M., Williams, L. D., Riley, R. T., Proctor, R. H. 2008. Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 87-97.
- González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., Gavilanes-Ruíz, S. 1992. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Analytical Biochemistry* 200: 235-238.
- Goodman, M. M. y Bird, R. M. 1977. The races of maize IV: Tentative grouping of 219 Latin American races. *Economic Botany* 31: 204-221.
- Goudet, C., Milat, M. L., Sentenac, H., and Thibaud, J. B. 2000. Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 203–209.
- Gray, C., Collins, J., Gebicki, J. 1999. Hydroperoxide assay with the reffix-xilenol orange complex. *Analytical Biochemistry* 273: 149-155.

- Gruber, S. y Seidl-Seiboth, S. 2012. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology* 158: 26-34.
- Guo, Y., Chen, F., Zhang, F., Mi, G. 2005. Auxin transport from shoots to root is involved in the response of lateral root growth to localized supply of nitrate in maize. *Plant Science* 169: 894-900.
- Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R.A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J., Gavilanes-Ruiz, M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H<sup>+</sup>-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 para obtener el título de Maestro en Ciencias Bioquímicas. UNAM. DF, México. 111 p.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H., Stransky, H., and Serrano, R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta* 185: 527-537.
- Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Harman, G. E. Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. 2004. Interaction between *Trichoderma harzianum* Strain T22 in maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Phytophthora ultimum* and *Collectotrichum graminicola*. 2004. *The American Phytopathological Society* 94: 147-153.
- Harman, G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease* 84: 377–393.
- Hayashi, Y., Nakamura, S., Takemiya, A., Takahashi, Y., Shimazaki, K., Kinoshita, T. 2010. Biochemical characterization of *in vitro* phosphorylation and dephosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant and Cell Physiology* 51: 1186-1196.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
- Hoyos, C. L., Orduz, S., Bisset, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control* 51: 409-416.
- Husakova, E., Hochholdinger, F., Soukup, A. 2013. Lateral root development in the maize (*Zea mays*) lateral rootless1 mutant. *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aob/mct043.
- Ivanchenko, M. G., den Os, D., Monshausen, G. B., Dubrovsky, J. G., Bennářová, A., Krishnan, N. 2013. Auxin increases the hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of Botany* 112: 1107-1116.
- Janicka-Russak, M. 2011. InTech. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. En: *Abiotic stress response in plants- physiological, biochemical and genetic perspectives*. Shanker, A. 197-218 p. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/18472.pdf>
- Jansen, L., Roberts, I., Beeckman, T. 2012. Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1525-1533.
- Jiang, K., Ling-Meng, Y., Feldman, L. J. 2003. Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* 130: 1429-1438.
- Johansson, F., Sommarin, M., Larsson, C. 1993. Fusicocin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by a mechanism involving the C-terminal inhibitory domain. *The Plant Cell*. 5: 321-327.
- Jones, A. R., Kramer, E. M. Knox, K., Swaruo, R., Bennet, M. J., Lazarus, C. M., Leyser, H. M. O., Grierson, C. S. 2009. Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nature Cell Biology* 11: 78-84
- Jung, J. H. K., McCouch, S. 2013. Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00186.

- Kanczewska, J., Marco, S., Vandermeeren, C., Maudoux, O., Rigaud, J., Boutry, M. 2005. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins convert a dimer into a hexamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11675-11680.
- Kazan, K. 2013. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of Botany* 112: 1655-1665.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zažímalová, E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*. doi:10.1186/gb-2009-10-12-249.
- Kühlbrandt, W. 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 282-295.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.
- Lei, K. J., Xie, J. Y., Zhu, Y. Y., Song, P. C., An, G. Y. 2015. Screening and analysis of rhizosphere acidification deficiency mutants in *Arabidopsis thaliana* under low phosphorus. *Soil Science and Plant Nutrition* 14:37-41.
- Leroux, O., Leroux, F., Bagniewska-Zadworna, A., Knox, J. P., Claeys, M., Bals, S., Viane, R. L. L. 2011. Ultrastructure and composition of cell wall appositions in the roots of *Asplenium* (Polypodiales). *Micron* 42: 863-870.
- Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., Petrini, O. 1999. A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Applied Environmental Microbiology* 65: 2418–2428.
- Liskay, A., van der Zalm, E., Schopfer, P. 2014. Production of reactive oxygen intermediates (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and <sup>•</sup>OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology* 136: 3114-3123.
- Löbler, M. y Klämbt, D. 1985. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). I. Purification by immunological methods and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 260: 9848–9853.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., *et al.* 2000. *The dynamic plant cell wall*. *Molecular Cell Biology*. 4th edition.: W. H. Freeman New York. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21709/>
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey R.A., Bartel B., Herrera-Estrella, L. 2005. An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of *BIG* as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137: 681-691.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14):7860-7865.
- Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E., Monte, E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from ‘omics to the field. *Annual Review of Phytopathology* 48: 19.1–19.23
- Mahmood, T. y Yang, P. C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 4: 429–434.
- Marcon, C., Malik, W. A., Walley, J. W., Shen, Z., Paschold, A., Smith, L. G., Piepho, H. P., Briggs, S. P., Hoccholdinger, F. 2015. A high-resolution tissue-specific proteome and phosphoproteome atlas of maize primary roots reveals functional gradients along the root axes. *Plant Physiology* 168: 233-246.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzman, M. J. Jung, S. C., Pascual, J. A., Pozo, M. J. 2013. Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced

- by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00206
- McCully, M. 1995. How do real roots work? *Plant Physiology* 109: 1-6.
- Moloney, M. M., Elliott, M. C., Cleland, R. E. 1981. Acid growth effects in maize roots: Evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta* 152: 285-291.
- Morales-Cedillo, F. 2014. Interacción estructural esfingolípidos-ATPasa de H<sup>+</sup> y su relevancia funcional en *Arabidopsis*. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencias. UNAM. DF, México. 117 p.
- Morales-Cedillo, F., González-Solís, A., Gutiérrez-Angoa, L., Cano-Ramírez, D. L., Gavilanes-Ruiz, M. 2015. Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell Reports*. doi: 10.1007/s00299-014-1735-z.
- Morsomme, P. y Boutry, M. 2000. The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 1-16.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Andersen, J. P., Vilsen, B., Palmgren, M. G., Nissen, P. 2011. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 60-70.
- Nemose. 2008. *Zea mays*, corn, maize, mealie. [http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/#chitika\\_close\\_button](http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/#chitika_close_button)
- Okumura, M., Inoue, S., Takahashi, K., Ishizaki, K., Kohchi, T., Kinoshita, T. 2012. Characterization of the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology* 15: 826-834.
- Orman, L. B., Parizot, B., Gantet, P. P., Beeckman, T., Bennet, M. J., Draye, X. 2013. Post-embryonic root organogenesis in cereals: branching out from model plants. *Trends in Plant Science* 18: 459-467.
- Osorio, H. E., Rodríguez, H. R., Hernández C. F. D. 2009. *Trichoderma* spp., una alternativa para el control de hongos fitopatógenos. *Ciencia cierta* 17. <http://www.postgradoinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC17/cc17trichoderma.html>.
- Ostrec, G. y Štampar, F. 2011. Differences in endo/exogenous auxin profile in cuttings of different physiological ages. *Journal of Plant Physiology* 168: 2088-2092.
- Ouyang, J., Shao, X., Li, J. 2000. Indole-3-glycerol phosphatase, a branchpoint on indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 24: 327-333.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T. 2010. Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 2:a001537.
- Palmgren, M. G. 2001. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 817-845.
- Palmgren, M. G., Sommarin, M. 1989. Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiology* 90: 1009-1014.
- Pan, X., Welti, R., Wang, X. 2008. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69: 1773-1781.
- Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Morth, J. P., Palmgren, M. G., Nissen, P. 2007. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450: 1111-1114.
- Péret, B., de Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., Bennet, H. J. M. 2009. *Arabidopsis* lateral root development and emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399-408.
- Piette, A. S., Derua, R., Walkens, E., Boutry, M., Duby, G. 2011. A phosphorylation in the C-terminal auto-inhibitory domain of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activates the

- enzyme with no requirement for regulatory 14-3-3 proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 18474-18482.
- Pilet, P. E. 1989. Differential growth and hormone redistribution in gravireacting maize root. *Environmental and Experimental Botany* 29: 37-45.
- Ramos, A. C., Façanha, A. R., Feijó, J. A. 2008. Ion dynamics during the polarized growth of arbuscular mycorrhizal fungi: from presymbiosis to symbiosis. En: *Mycorrhiza. State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics*. Varma, A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 281-306 p.
- Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L., Herrera-Estrella, A. 2011. Identification of Mycoparasitism-Related Genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4361-4370.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeil, A. M., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321: 305-339.
- Robert-Kleber, N., Albrechtová, J. T. P., Fleig, S., Huck, N., Michalke, W., Wagner, E., Speth, V., Neuhaus, G., Fischer-Iglesias, C. 2003. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiology* 131: 1302-1312.
- Rubery P. H. y Sheldrake, A. R. 1973. Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature New Biology* 244: 285-288.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B. 1999. An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99: 463-472.
- Samuels, G. J., Lieckfeldt, E., Nirenberg, I. 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51 (1): 71-88.
- Sánchez, G., J. J. 2011. Diversidad del maíz y teocintle. Informe preparado para el proyecto global "Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México" de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 98 p. [http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo9\\_Analisis\\_Especialistas/Jesus\\_Sanchez\\_2011.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo9_Analisis_Especialistas/Jesus_Sanchez_2011.pdf)
- Sánchez, J. J., Goodman, M. M., Stuber, C. W. 2000. Isozymatic and morphological diversity in the Races of maize of México. *Economic Botany* 54: 43-59.
- Sánchez-Nieto, S., Enríquez-Arredondo, C., Guzmán-Chávez, F., Hernández-Muñoz R., Ramírez, J., Gavilanes-Ruiz, M. 2011. Kinetics of the H<sup>+</sup>-ATPase from dry and 5-hours-imbibed maize embryos in its native, solubilized, and reconstituted forms. *Molecular Plant*. 4: 505-515.
- Sánchez-Nieto, S., Tuena, G. P. M., Rodríguez-Sotres, R., Carballo, A., Gavilanes-Ruiz, M. 1998. Comparison of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrate maize embryos. *Biochimica et Biophysica Acta* 141: 175-187.
- Sandoval, Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos del Instituto de Biología 38. Instituto de Biología. UNAM. DF, México. 270 p.
- Schenck, D., Christian, M., Jones, A., Lüthen, H. 2010. Rapid auxin-induced cell expansion and gene expression: a four-decade-old question revisited. *Plant Physiology* 152: 1183-1185.
- Schwechheimer C. 2008. Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Current Opinion in Plant Biology* 11: 9-15.
- Senyuva, H. Z. 2007. Rapid analysis of crude fungal extracts for secondary metabolites by LC/TOF-MS – A new approach to fungal characterization. Agilent Technologies. <http://www.metabolomics.uwa.edu.au/Protocols/LCMS/Rapid%20Analysis%20of%20Crude%20Fungal%20Extracts%20for%20Secondary%20Metabolites%20by%20LC-TOF-MS%20-%20A%20New%20Approach%20to%20Fungal%20Characterization.pdf>

- Sharma, P., Patel, A. N., Saini, M. K., Deep, S. 2012. Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L). *Journal of Agricultural Science* 4: 65-73.
- Shoresh, M. y Harman, G. E. 2010. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biology*. doi:[10.1186/1471-2229-10-136](https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-136)
- Sofa, A., Scopa, A., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Troisi, J., Di Fiori, R., Novellino, E. 2011. *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* x *P. canescens*). *Plant Growth Regulation* 65: 421-425.
- Solomon, S. y Crawford. 2010. Soil and Health Library.<http://www.soilandhealth.org/01aglibrary/010139fieldcroproots/010139ch2.html>
- Spartz, A. K., Ren, H., Park, M. Y., Grandt, K. N., Lee, S. H., Murphy, A. S., Sussman, M. R., Overvoorde, P. J., Gray, W. M. 2014. SAUR Inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26: 2129-2142.
- Speth, C., Jaspert, N., Marcon, C., Oecking, C. 2010. Regulation of the plant plasmamembrane H<sup>+</sup>-ATPase by its C-terminal domain: what do we know for sure? *European Journal of Cell Biology* 89: 145–151.
- Stewart, A. y Hill, R. 2014. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. En: *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A. *et al.* Elsevier. Massachusetts, USA. 415-428 p.
- Svennelid, F., Olsson, A., Piotrowki, M., Rosenquist, M., Ottman, C., Larsson, C., Oeking, C., Sommarin, M. 1999. Phosphorylation of Thr-948 and the C terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell* 11: 2379-2391.
- Takahashi, K., Hayashi, K., Kinoshita, T. 2012. Auxin activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *arabidopsis*. *Plant Physiology* 159: 632-641.
- Tapia-Aquino C. 2012. Cuantificación y efecto en la ultraestructura del cloroplasto de especies reactivas de oxígeno inducidos por un aumento de bases esfingoideas en plantas. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. UNAM. D.F. México. 86 p.
- Thomas, S.G. y Hedden, P. 2006. Gibberellin metabolism and signal transduction. En: *Plant Hormone Signaling*. Hedden, P. y Thomas, S. G. Blackwell. Oxford, UK. 147–184.
- Tognetti, V. B., Mühlenbock, P., Van Breusegem, F. 2012. Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant Cell and Environmental* 35: 321-333.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some application. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- Tromas A., Paponov, I., Perrot-Rechnmann C. 2010. Auxin binding protein 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Sciences* 15: 436–446.
- van't Slot, K. A. E., Gierlich, A., Knogge, W. 2007. A single binding site mediates resistance- and disease-associated activities of the effector protein NIP1 from the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiology* 144: 1654–1666.
- Vanderhoef, L. N. y Briggs, W. R. Red light- inhibited mesocotyl elongation in maize seedlings. I. The auxin hypothesis. *Plant Physiology* 61: 534-537.
- Vázquez-Vázquez, C. A. 2015. Interacción de la ATPasa de H<sup>+</sup> con la región lipídica de la membrana plasmática. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. UNAM. DF, México. 89 p.

- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., Piché, Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 5004-5007.
- Visnovitz, T., Solti, A., Touati, M., Csikós, G., Miller, A. J., Fricke, W. 2011. Cell wall acidification in growing barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 183-187.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L., Chet, I. 2007. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 305: 42-48.
- Voothuluru, P y Sharp. R. E. 2013. Apoplastic hydrogen peroxide in the growth zone of the maize primary root under water stress. I. Increased levels are specific to the apical region of growth maintenance. *Journal of Experimental Botany* 64: 1223-1233.
- Wang, B., Chu, J., Yu, T., Xu, Q., Sun, X., Yuan, J., Xiong, G., Wang, G., Wang, Y., Li., J. 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 4821-4826.
- Wang, E. Yu, N., Asma-Bano, S., Liu, C., Miller, A. J., Zhang, X., Ratet, P., Tadege, M., Mysore, K. S., Downie, J. A., Murray, J. D., Oldroyd, G. E. D., Schultze, M. 2014. A H<sup>+</sup>-ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 26:1818-1830.
- Yedida, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.
- Zazimalová E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyeravá, K., Hosek, P. 2010. Auxin transporters- Why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* doi: 10.1101/cshperspect.a001552.
- Zhong, M., Thomas, C. W., Andrew, M., Lynch, J. P. 2001. Morphological synergism in root hair length, density, initiation and geometry for phosphorus acquisition in *Arabidopsis thaliana*: A modeling approach. *Plant and Soil* 236: 221-235.

## ANEXO 1. H<sup>+</sup>-ATPASAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Número de ATPasas de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática que se presume se encuentran en plántulas de maíz de 24 a 6 días después de la germinación. Datos tomados de [http://aramemnon.uni-koeln.de/seq\\_view.ep?ClusterID=3138&OrgID=4&cat=15](http://aramemnon.uni-koeln.de/seq_view.ep?ClusterID=3138&OrgID=4&cat=15)).

Número	Nombre	Número de acceso	Localización (datos tomados del MaizeGDB)
1.	putative P3A type proton translocating ATPase	AC209050.3_FGP001	ND
2.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G000264	Poca en radícula primaria y parte aérea.
3.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G006894	Principalmente en la radícula primaria.
4.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G008122	Expresión baja, excepto en la inflorescencia masculina de la planta madura.
5.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G019404 o MHA2 descrita por Frías	Zona de elongación y meristemática, en el cortex y estele de la raíz
6.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G035520	Principalmente en el tejido aéreo.
7.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G068259	Expresión muy baja, excepto en el embrión maduro.
8.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G104325	Zona de elongación y meristemática, en el cortex y estele de la raíz
9.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G131309	Expresión muy baja, excepto en las anteras de la planta madura.
10.	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G144821	Principalmente en hojas de plántulas y poco en raíces

<b>11.</b>	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G148374	Expresión muy baja, excepto en las anteras de la planta madura.
<b>12.</b>	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G172183	Niveles similares de expresión en la radícula primaria y en el tejido aéreo.
<b>13.</b>	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G341058	ND
<b>14.</b>	putative P3A type proton translocating ATPase	GRMZM2G455557	Expresión en anteras de planta madura.

## ANEXO 2. CROMATOGRAMAS DE HPLC

### Cromatogramas de HPLC de la determinación del contenido de AIA en los tejidos.

#### Condiciones

HPLC Waters. Bomba Modelo 515.

Detector de Fluorescencia Modelo 474,  $\lambda_{ex}$  280 nm y  $\lambda_{em}$  340nm.

Fase móvil: metanol:ácido acético 0.5%. Flujo 0.7 mL/min, isocrático.

Columna C18 (ACE 5, 250 x 4.6mm id) No. catálogo: ACE-121-2546.

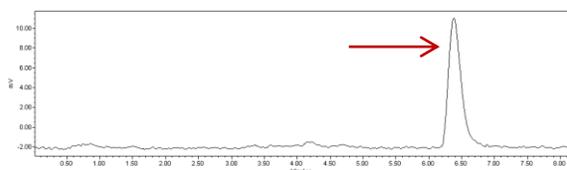
Volumen de inyección 20  $\mu$ L

Tiempo de retención: 6.41m.

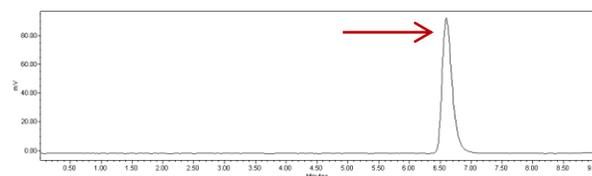
Las flechas en los cromatogramas indican la señal correspondiente a AIA.

#### Estándar de AIA.

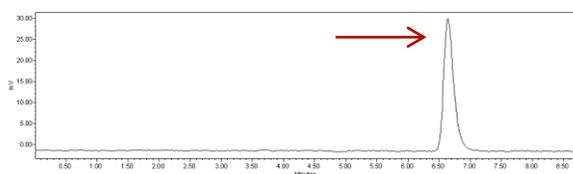
##### 0.1 $\mu$ g/mL



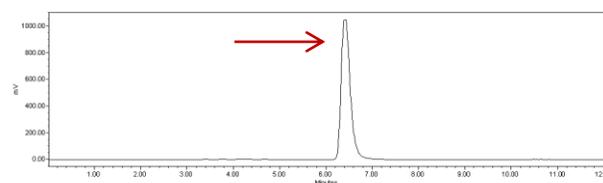
##### 0.7 $\mu$ g/mL



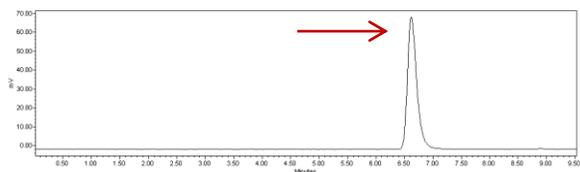
##### 0.3 $\mu$ g/mL



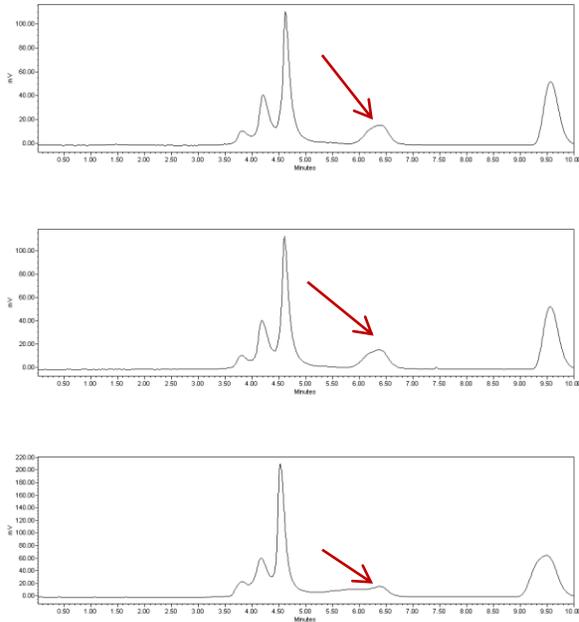
##### 1 $\mu$ g/mL



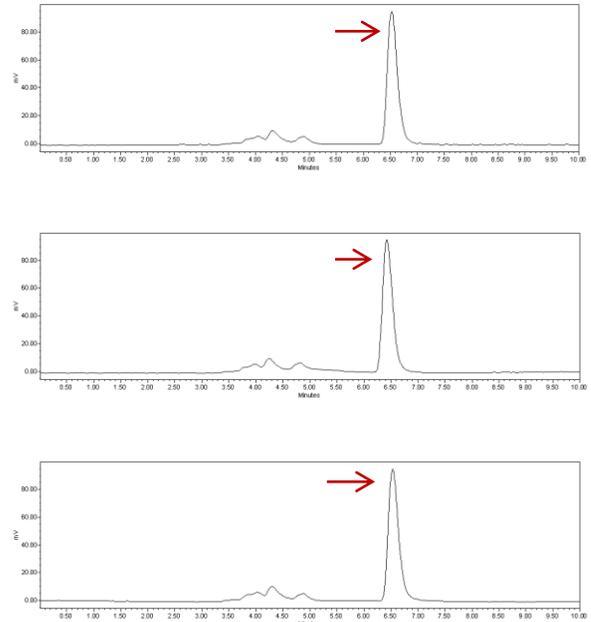
##### 0.5 $\mu$ g/mL



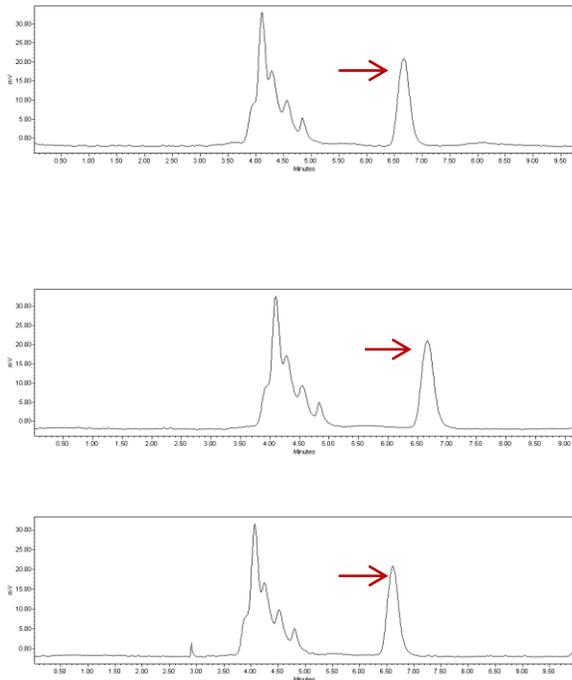
**Muestra: *Trichoderma asperellum***  
extracto acuoso. Factor de dilución 0.05.



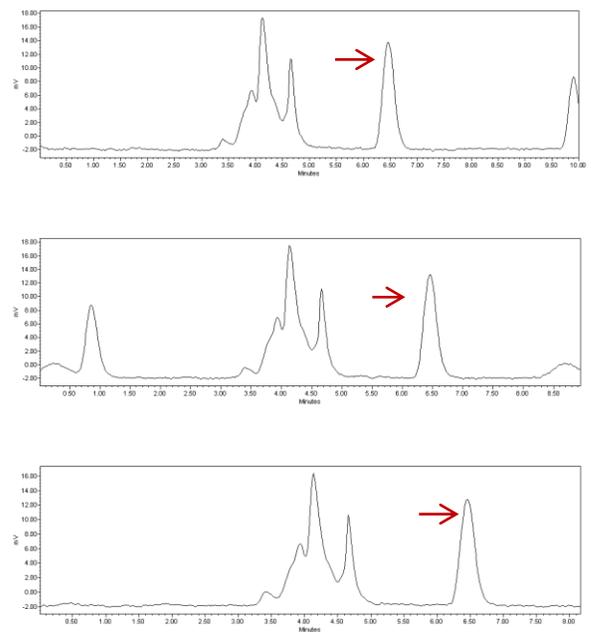
**Muestra: Tejido aéreo del tratamiento**  
**Biopriming.** Factor de dilución: 0.2.



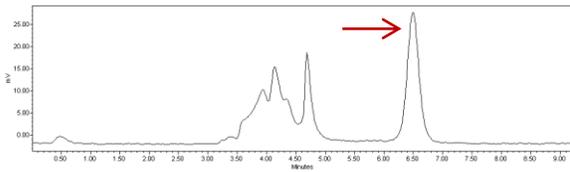
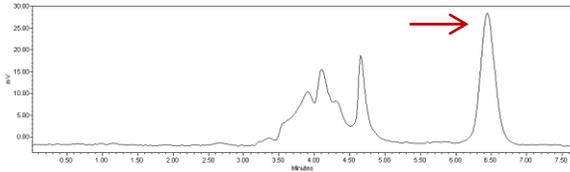
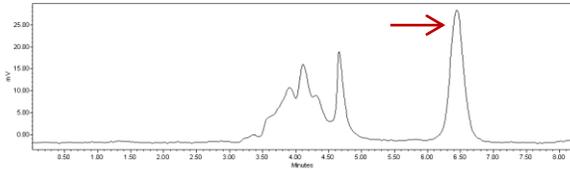
**Muestra: Tejido aéreo Control.** Factor de dilución: 0.25.



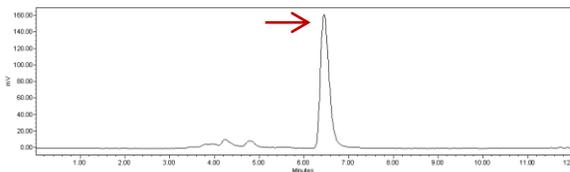
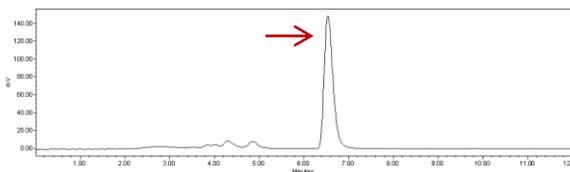
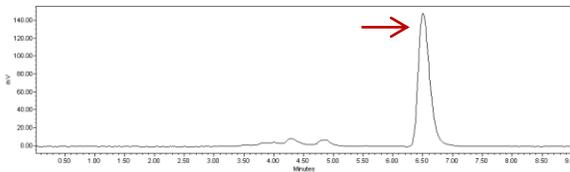
**Muestra: Radícula Control.** Factor de dilución: 0.25.



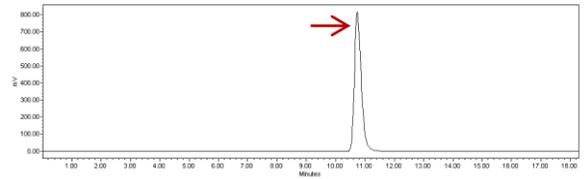
**Muestra: Radícula del tratamiento de Biopriming. Factor de dilución: 0.25.**



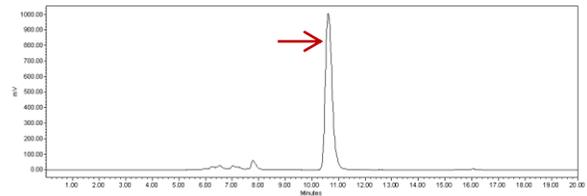
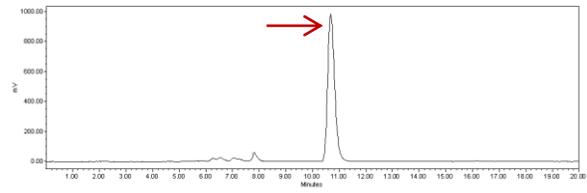
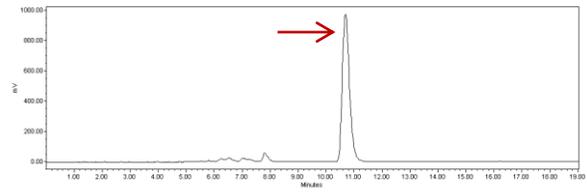
**Muestra: Radícula del tratamiento Sin Contacto. Factor de dilución: 0.6.**



**Estándar**



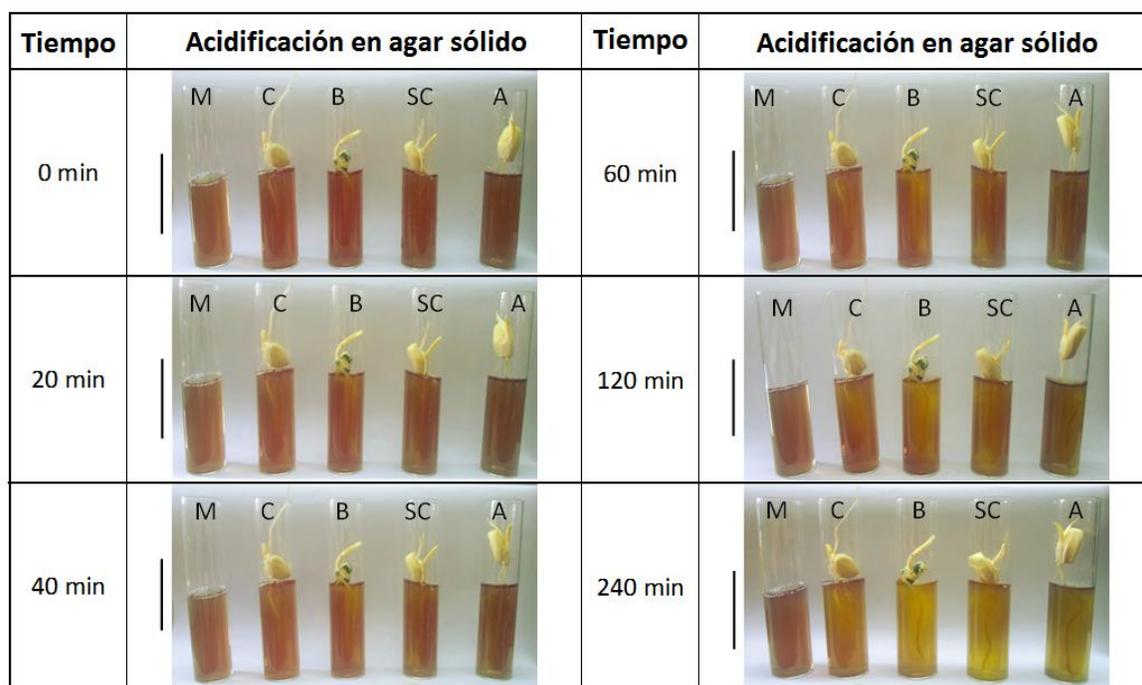
**Muestra: Tejido aéreo del tratamiento Sin Contacto. Factor de dilución 0.1**



### ANEXO 3. ACIDIFICACIÓN DEL AGAR

#### Registro fotográfico de la acidificación del agar por las plántulas de maíz sometidas a diferentes tratamientos.

Para evidenciar la acidificación paulatina del medio en donde estaban creciendo las plantas, a las plántulas de maíz de 72 h de germinación se trasladaron a agar 0.5x adicionado con 0.003% de púrpura de bromocresol (Figura 37). El colorante vira del púrpura a amarillo conforme se acidifica el medio. A 20 min de haber trasplantado las plántulas, hubo cambio de coloración del agar. Sin embargo, es más evidente la tonalidad amarilla en la vecindad de las raíces de plántulas que pasaron por los tratamientos con el hongo. Después de 240 min haber sido trasladadas las plántulas al medio con el colorante, todavía continuaron acidificando el medio. Los tratamientos con *T. asperellum* fueron los que viraron el color del medio de manera más evidente.



**Fig. 37. Evidencia fisiológica de la salida de protones.** Imágenes representativas de plántulas germinadas 72 h en las condiciones de C) Control, B) Biopriming, SC) Sin contacto; A) Embebidas en 10  $\mu$ M de AIA 30' que fueron trasplantadas a agar adicionado con púrpura de bromocresol, a diferentes tiempos de incubación. El color amarillo en el medio corresponde a un pH menor a 5.2. Barra=5cm.

## ANEXO 4. GLOSARIO

**Acropétalo:** Con desarrollo desde la base hacia el ápice. Antónimo de basipétalo.

**Arquitectura radical:** Arreglo espacial de los diferentes tipos de raíz que componen el sistema radicular de una planta.

**Basipétalo:** Con desarrollo o movimiento desde el ápice hacia la base. Antónimo de acropetalo.

**Célula fiálide:** Célula conidiógena que produce conidios de manera basipétala.

**Clamidóspora:** Conidio tálico de pared gruesa que actúa como espora de resistencia.

**Coleoptilo:** Órgano protector de las hojas más jóvenes. Es una vaina que encierra el meristemo apical y los primordios foliares de los embriones de las gramíneas; frecuentemente se consideran como la primera hoja (Raven *et al.*, 1992)

**Conidio:** Espora asexual que se produce de forma externa en la hifa aérea, a diferencia de las esporas que se producen dentro de las hifas aéreas.

**Conidio tálico:** Conidio formado por la transformación de la totalidad de una célula conidiógena, sinónimo de artroconidio.

**Conidióforo:** Hifa que porta células conidiógenas, es decir productoras de conidios.

**Córtex:** Región comprendida entre la dermis y el cilindro vascular. Frecuentemente las células del córtex contienen almidón.

**Crecimiento indeterminado de raíces:** El crecimiento vegetativo no se limita al periodo embrionario o juvenil, en todo momento, las plantas poseen órganos embrionarios, órganos en desarrollo y órganos maduros (Campbell y Reece, 2007). En angiospermas, el crecimiento de la raíz y el vástago es mantenido y regulado a través de la actividad de los meristemas apicales. El balance entre la generación de nuevas células meristemáticas y su transición a la diferenciación, permite el mantenimiento del meristemo y regulación de su actividad.

**Hifas:** Filamento tubuloso que es la unidad estructural del micelio de los hongos. Puede presentar septos o puede ser cenocítico (sin paredes que separen a los núcleos en células) generalmente multinucleadas. Se reconocen dos tipos de hifas: *las vegetativas*, las cuales se desarrollan dentro o sobre el sustrato y que absorben los nutrientes, y las *hifas aéreas* las cuales generalmente constituyen la porción más visible de la colonia y en las que se diferencian hifas fértiles, que son reproductivas y formadoras de esporas. (Urribarren y Castañón, 2013).

**Mesocotilo:** En algunas monocotiledóneas, la parte del tallo de la plántula que se prolonga por debajo del brote.

**Periciclo:** Porción del cilindro vascular entre los tejidos vasculares y la endodermis. Capa formadora de raíces laterales.

**Protofloema:** Los elementos del floema primario los cuales se desarrollan primero.

**Rizósfera:** Zona del suelo que es influenciada por las raíces, en la cual, los exudados radiculares afectan procesos del suelo y a microorganismos que se encuentran en él (SAP 2014).

**Vástago:** Conjunto formado por el tallo o eje caulinar y las hojas, de manera que se contraponen al concepto de raíz. Brote o tallo nuevo que surge de la semilla de una planta.

**Verticilios:** Conjunto de tres o más órganos que están en un mismo plano alrededor de un eje caulinar.

---

## Referencias

- Campbell, N. A., Reece, J. B. 2007. Biología. Panamericana. Madrid, España. 720 pp.
- Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 1992. Biología de las plantas. Volumen 2. Barcelona, España. 728 pp.
- SAP Laboratorio de Relación Suelo-Agua-Planta. 2014. Rizósfera y absorción de nutrientes. [http://www.sap.uchile.cl/descargas/Sistemas\\_agricolas/Rizosfera.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/Sistemas_agricolas/Rizosfera.pdf)
- Urribarren, B. T., Castañón, O. L. R. 2003. Generalidades de micología. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>