



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CAMBIOS EN LOS NIVELES HORMONALES DE
EMBRIONES DE MAÍZ INDUCIDOS DURANTE
SU INTERACCIÓN CON *Fusarium verticillioides*
Y *Trichoderma asperellum*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JUAN MANUEL ARCINIEGA RUIZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
VOCAL: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
SECRETARIO: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
1er. SUPLENTE: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ
2° SUPLENTE: DRA. VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 114, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
ASESOR

JUAN MANUEL ARCINIEGA RUIZ
SUSTENTANTE



**Si piensas que no tienes nada que aprender,
es la forma más segura de garantizar que aprendes exactamente eso: nada**
(Chris Ferguson).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fausto Rivero Cruz y a la Dra. Blanca Rivero Cruz por la asesoría técnica y las facilidades otorgadas para la detección del nivel de hormonas en embriones mediante la técnica de HPLC.

Se agradece al Dr. Javier Plasencia por la donación de la cepa de *Fusarium verticillioides*.

También se agradece al Dr. José Luis Hernández Mendoza por la donación de la cepa de *Trichoderma asperellum*.

Se agradece a:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dr. José Pedraza Chaverri

Dr. Raúl Genaro Aguilar Caballero

Dr. José Fausto Rivero Cruz

por las observaciones y comentarios realizados al presente trabajo.

Este trabajo se realizó con apoyos:

- **PAPIIT IN220511, DGAPA, UNAM**
- **PAIP 4290-12, Facultad de Química UNAM.**
- **Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química, Beca otorgada para la realización de la Tesis de licenciatura.**

Primeramente agradezco la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que a través de la Facultad de Química forjó en mí un espíritu universal por medio de la preparación académica brindada en cada una de sus aulas y laboratorios, será para mí un honor desempeñarme como un profesional que tenga como prioridad el bien de la sociedad mexicana y el desarrollo sustentable del país.

Nada de esto hubiese sido posible sin el apoyo brindado por mi abuelo Manuel Ruiz Sánchez, a quien siempre le estaré agradecido porque éste, mi sueño, también fue suyo.

Mi mayor agradecimiento, admiración y respeto a quien es el pilar, no sólo de este trabajo, también de una estancia corta, un servicio social, un primer lugar y una beca laboral. A usted, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, mi más sincero reconocimiento por su labor como tutora, consejera y amiga. Gracias por su actitud de atención a cualquiera de mis dudas, gracias por tenerme paciencia cuando tenía mis proyectos alternos, gracias por alentarme a terminar esta etapa importante en mi vida. Palabras me faltan para decirle lo mucho que la aprecio y lo bendecido que me siento de haber llegado ese día de enero al Laboratorio 114 cuando todo dio comienzo.

Agradezco a mi madre Ana María Ruiz Nieto esas noches que estuvo a mi lado desde el día que nací, el apoyo en cada una de mis metas y por la paciencia que siempre me ha mostrado. Mamá te amo más que a nadie en este mundo, aunque a veces mis actos y mis palabras no lo digan.

A mi padre Arturo Arciniega Ramirez por la educación que me brindó y que creó en mí un ideal de lucha y de esfuerzo para alcanzar lo que más anhelo. Gracias por creer en mí.

Agradezco a Arturo y Sarai Arciniega Ruiz por esos buenos tiempos de alegrías, hermandad y unión que me permitieron sonreír en los momentos más difíciles. Haré lo posible para que puedan alcanzar lo que más deseen en su vida, si se lo proponen lo lograrán.

José Miguel Valenzuela Ladrón de Guevara, has sido más que un amigo para mí, cuando otros me rechazaron tú abriste la puerta de tu casa. Por ello te estaré eternamente agradecido y espero poder algún día devolverte toda la ayuda que me ofreciste.

A Cairo David Toledano Jaimes, agradezco, desde el fondo de mi corazón, todos los consejos y exhortaciones que me han permitido mejorar en los aspectos académicos y profesionales, pero también esos momentos entrañables que he disfrutado y que reponen mi contento al finalizar el día o mis energías al comenzar la semana.

A Fernando Guzmán Chávez por ser más allá del vínculo con el cual regresé al lugar que me vio nacer en la Bioquímica y la Investigación. A Viridiana Luna por ser la jefa más a todo dar. A Roberto Carvente por esos abrazos y consejos animadores. A Viridiana Zurita por su fiel confianza en mí. A Paulina Aguilera por sus lecciones. A Adriana Martínez, Sara Garza y Elpidio García por hacer de mi estancia en el laboratorio un tiempo muy agradable.

A Carlos Zepeda (mein Brüder en las buenas, en las malas y en esas que no pueden mencionarse), Carlos Bernal, Emanuel Luna, Oscar Arroyo, Omar de la O y Marco Trinidad por esos buenos recuerdos compartidos en la Facultad y fuera de ella.

A Luis Galindo, Laura Matias, Nancy Viridiana Sánchez, Alberto Becerril, Miguel Ángel Rubiol, Oscar Linares, Gonzalo Fernández, Oscar Aguilar, Gerardo Padierna, Juan Manuel Martínez, Gilberto Sánchez, Miguel Juárez, Alejandro Ortega, Alejandro Barragán y Katia Bustamante, Leticia Reyes, Oscar Rosales y Ayulia Beltrán, Salvador Rosas, Wilber Reyna, David Escobedo, Eric Santiago Martínez, Eduardo Alvarado, Grisel Lugo, Noemi Reyes, Susana Mateos, Francisco Calleja, Ana Mateos, Sandra y Erika Fitz, Yoab Yael Hernández, Noé Andrade, Rodrigo Pérez, Oscar Hernández, Pedro Lira y a todos y cada uno de mis amigos y amigas que han compartido conmigo momentos inolvidables escritos con la mejor tinta del mundo: el amor. Gracias por contribuir con lo que he sido, con lo que soy y con lo que llegaré a ser.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi aprecio y cariño a:

Jacinta Nieto Plata (†)

y

Manuel Ruiz Sánchez.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	12
I. RESUMEN	13
II. INTRODUCCIÓN	14
II.1 Maíz	14
II. 2 Germinación	17
II.3 Hormonas y germinación	19
II.3.1 Ácido abscísico	20
II.3.2 Papel fisiológico del ABA.....	20
II.3.3 Giberelinas (GA)	22
II.3.4 Papel fisiológico de las GA	23
II.3.5 Auxinas.....	26
II.3.6 Papel fisiológico de las auxinas	27
II.3.7 Hormonas en la defensa de las plantas	28
II.4 <i>Fusarium</i> principal patógeno en maíz	31
II.5 <i>Trichoderma asperellum</i> hongo benéfico para plantas.	34
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. HIPÓTESIS	39
V. OBJETIVO GENERAL.....	40
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	41
VII.1 Esquema general de trabajo	41
VII.2 Material biológico	42
VII.2.1 Preparación y calibración de la solución concentrada de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	42
VII.2.2 Crecimiento individual o en cultivo dual de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	43
VII.2.3 Germinación de los embriones de maíz en presencia o ausencia de patógeno.....	43
VII.3 Métodos.....	44
VII.3.1 Tinción azul algodón lactofenol.....	44
VII.3.2 Porcentaje de germinación.....	44
VII.3.3 Acumulación de peso húmedo.	44
VII.3.4 Extracción de GA, auxinas y ABA	45
VII.3.5 Determinación de la concentración de GA ₃ e IAA por medio de HPLC.	45
VII.3.6 Determinación de la concentración de ABA por un ensayo de ELISA competitivo.	47
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
VIII.1 Crecimiento e interacción entre <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	48
VIII.2 Efectos fisiológicos de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i> sobre los embriones de maíz.	52
VIII.3 Detección de los cambios hormonales producidos por la interacción de <i>Fusarium</i> o <i>Trichoderma</i> y los embriones de maíz.....	59



VIII.4 Concentración de GA ₃	61
VIII.5 Concentración de IAA	63
VIII.6 La modificación en los niveles hormonales de ABA, GA e IAA indican si los embriones están frente al ataque de un patógeno o bien alertas para una nueva infección.	64
IX. CONCLUSIONES	68
X. PERSPECTIVAS.....	69
XI. REFERENCIAS.....	70
XII. APÉNDICES	77
Apéndice 1. Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de las hormonas GA3 y ácido indolacético.	78
Apéndice 2. Cálculo del contenido de hormona por g tejido.....	89
Apéndice 3. Curva estándar de ABA y cálculos para determinar el contenido de hormona/ g tejido.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la planta y semilla de maíz.	15
Figura 2. Estructura de (+)-ABA y sus enantiómeros.	20
Figura 3. Metabolismo de ABA.	22
Figura 4. Principales vías del metabolismo de las GA.	24
Figura 5. Interacciones hormonales durante la liberación de la dormancia y germinación y sus efectos en la ruptura de la testa y el endospermo de la semilla de tabaco.	25
Figura 6. Estructura química del ácido 3-indolacético y otras auxinas presentes naturalmente.	26
Figura 7. Modelo simplificado mostrando como las diferentes hormonas producen una regulación positiva o negativa en la resistencia de la planta ante patógenos biotróficos o necrotróficos.	29
Figura 8. <i>Fusarium</i> y la enfermedad que produce en el maíz.	32
Figura 9. Estructura química de las fumonisinas.	34
Figura 10. Fiálides de <i>Trichoderma asperellum</i>	35
Figura 11. Respuestas de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> reguladas por <i>T. virens</i>	36
Figura 12. Esquema general de trabajo realizado.	41
Figura 13. Crecimiento individual o en cultivo dual de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	49
Figura 14. Fotografías microscópicas de los hongos <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i> teñidos con azul algodón lactofenol (100X).	51
Figura 15. Efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> en la germinación y crecimiento radicular de embriones de maíz.	53
Figura 16. Embriones de maíz inoculados a diferentes concentraciones de <i>Trichoderma asperellum</i>	55
Figura 17. Efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> en la germinación de embriones de maíz.	56
Figura 18. Porcentaje de germinación de embriones de maíz tratados con <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	57
Figura 19. Acumulación de peso húmedo de los embriones de maíz germinados en presencia de <i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	58
Figura 20. Comparación en el contenido de ABA de embriones de maíz inoculados con <i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Fusarium verticillioides</i>	60
Figura 21. Niveles de GA ₃ en embriones de maíz germinados en ausencia y presencia de <i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i> y <i>Trichoderma asperellum</i>	62
Figura 22. Curva de concentración de IAA.	64
Figura 23. Efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> en los niveles de ABA, IAA y GA ₃	65
Figura 24. Efecto de <i>Trichoderma asperellum</i> en los niveles de ABA, IAA y GA ₃	66
Figura 25. Curva patrón de GA ₃	93
Figura 26. Curva patrón de IAA.	93
Figura 27. Curva patrón de ABA.	95



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz. -----	14
Tabla 2. Efectos de mutaciones en la síntesis, percepción o componentes de la señalización de ABA, auxinas y GA en la sensibilidad a patógenos por diferentes plantas.-----	30
Tabla 3. Tiempos de retención (t_R) de GA, IAA y ABA. -----	46
Tabla 4. Resumen de resultados. -----	67



ABREVIATURAS

AAO-MoCo	Aldehído abscísico oxidasa o Sulfatasa cofactor del molibdeno	GGPP	Geranilgeranil difosfato
ABA	Ácido abscísico	GGPS	Geranilgeranil difosfato
ABC	Área bajo la curva	IAA	sintasa
ABP-1	Proteína de unión a auxinas-1	IPP	Ácido 3-indolacético
ATP	Adenosin trifosfato	JA	Isopentenil difosfato
AUX	Auxinas	KS	Jasmonatos
βCH	Hidroxilasa β-caroteno	MoCo	<i>ent</i> -kaureno sintasa
βCRTR	Hidroxilasa anillo β-carotenoide	MVA	Cofactor de molibdeno
βLCY	Licopeno β-ciclasa	PA	Ácido mevalónico
βGlu I	β-1,3-glucanasa		Ácido faséico
CPS	<i>ent</i> -copalil difosfato sintasa	PBST	Amortiguador fosfato salino con detergente Tween- 20
CoA	Coenzima A	PDA	Agar papa dextrosa
DMAPP	Dimetilalil difosfato	PNP	Purina nucleósido
DNA	Ácido desoxirribonucleico	RNA	Ácido ribonucleico
DPA	Ácido dihidrofaséico	SA SDR	Ácido salicílico
EREP	Elemento de unión de proteínas en respuesta a etileno		Miembro de la familia de las deshidrogenasas/ reductasas de cadena corta
ET	Etileno	UDP	Urocin difosfato
EKAox	<i>ent</i> -ácido kaurénico 7β-hidroxilasa	ZEP	Epoxidasa zeaxantina
EKO	<i>ent</i> -kaureno 19-oxidasa		
GA	Giberelinas		
GA₃	Ácido giberélico		
GA₂ox	GA 2 oxidasa		
GA₃ox	GA 3β-hidroxilasa		
GA₇ox	GA ₇ oxidasa		
GA₁₂S	GA ₁₂ aldehído sintasa		
GA₁₃ox	GA ₁₃ oxidasa		
GA₂₀ox	GA ₂₀ oxidasa		

I. RESUMEN

Durante la interacción planta-microorganismo se suceden una serie de eventos metabólicos y fisiológicos en la planta para evitar la enfermedad. Como parte de estas respuestas se modifica el contenido de hormonas en la célula vegetal. Se conoce que principalmente se acumulan el ácido salicílico (SA) y el jasmonato (JA) para activar las defensas de la planta, si el microorganismo es biótrofo o necrótrofo, respectivamente. Sin embargo, el nivel de otras hormonas presentes en ese momento fisiológico de la célula vegetal también cambia y altera la respuesta final de defensa.

En el presente trabajo se evaluó como 2 hongos con diferente capacidad de interaccionar con el maíz modificaron la producción de 3 hormonas importantes para su proceso germinativo, el ácido giberélico (GA_3), el ácido abscísico (ABA) y la auxina ácido 3-indolacético (IAA). Los hongos estudiados fueron *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Las hormonas GA_3 y IAA se cuantificaron mediante cromatografía de líquidos (HPLC), mientras que ABA se cuantificó mediante un método que usa anticuerpos monoclonales en un ensayo de ELISA competitivo.

La síntesis de hormonas se afectó de manera diferente en presencia de los 2 hongos. Para *Fusarium*, patógeno que tiende a producir necrosis en el tejido vegetal para consumir el carbono y nitrógeno de ésta, reduce la capacidad del tejido de catabolizar el contenido de ABA, aumenta aproximadamente el triple el contenido de GA_3 y retrasa la aparición de auxinas. Es probable que el sostenido contenido de ABA y el retraso en la elevación de IAA reduzcan la capacidad del embrión de maíz de seguir creciendo, ayudando al hongo a continuar con la invasión para llevar a la muerte del tejido embrionario.

Por su parte, *Trichoderma asperellum* es un hongo que se ha planteado como benéfico en el crecimiento de las plantas e inductor de la respuesta de defensa contra microorganismos patógenos. Respecto a esto último, se encontró que *Trichoderma asperellum* antagoniza con *Fusarium verticillioides*. En los embriones de maíz *Trichoderma asperellum* permitió la reducción de ABA, evento normal durante el proceso de germinación, aunque aumentó la cantidad de giberelinas (GA) al doble y mantuvo alto el contenido de IAA durante todos los tiempos de germinación estudiados. Las auxinas pueden inducir la expresión de enzimas que remodelan la pared celular y al hacerlo promueven su crecimiento. Es factible que IAA sea la hormona que mejore las respuestas de defensa de la planta y que una combinación de alto contenido de ABA con otras hormonas las reduzca.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Maíz

El maíz o *Zea mays* pertenece a la familia de las poáceas (Tabla 1), familia rica en especies de alta importancia económica, baste decir que en esta se encuentran los cereales.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del maíz (Tomado y adaptado de Catalogue of Life, 2012 y Kato, 2009).

Categoría	Clasificación	Carácter distintivo
Reino	Plantae	Planta
Phylum	Magnoliophyta	Semilla cubierta (Angiospermas)
Clase	Liliopsida	Monocotiledónea
Orden	Poales	Zacates
Familia	Poaceae	Cereales
Género	<i>Zea</i>	Maíz
Especie	<i>mays</i>	Maíz

La planta del maíz alcanza en promedio entre 0.5 a 6 m de alto. Las hojas forman una larga vaina enrollada al tallo. El tallo es segmentado similar al del bamboo, presenta nodos de los cuales sale una sola hoja. Las hojas se encuentran en posición opuesta a la siguiente hoja, es decir alternadas, llevando a que del tallo se observen dos líneas de hojas verticales. Del tallo nacen dos o tres inflorescencias (las femeninas) muy densas o mazorcas envueltas en un tipo especial de hoja gruesa como cáscara. Las mazorcas emergen a partir de la mitad de la longitud del tallo. En cada mazorca hay filas de granos cuyo número puede variar de ocho a treinta. A cada grano le corresponde un largo hilo, estos son los estilos que sobresalen por el extremo de la mazorca. En el extremo del tallo de la planta tiene las inflorescencias masculinas, que cuando el polen ha caído, se secan y se tornan parduscas (Figura 1A) (Leszek y Vincent, 2002; SIAP, 2007).

En cuanto al fruto es llamado botánicamente cariósido, comercialmente se le conoce como grano y agrícolamente se le conoce como semilla, y puede presentarse en tamaños, formas, colores y composición distinta (Reyes, 1990).

La semilla es la unidad de dispersión de la planta, y es capaz de sobrevivir el periodo entre la maduración de la semilla y el establecimiento de la nueva generación. La semilla contiene los tejidos necesarios para formar una nueva planta (Figura 1B), entre los que se encuentran (Leszek y Vincent, 2002):

- **Pericarpio.** Cubierta del fruto, de origen materno. Es la cubierta dura y transparente de la semilla.
- **Aleurona.** Células parte del endospermo. Se presenta en una monocapa de células, las más externas del endospermo, encargada de la síntesis de ácido giberélico, de sacarosa, de la liberación de proteasas y la movilización de lípidos durante la germinación de la semilla.

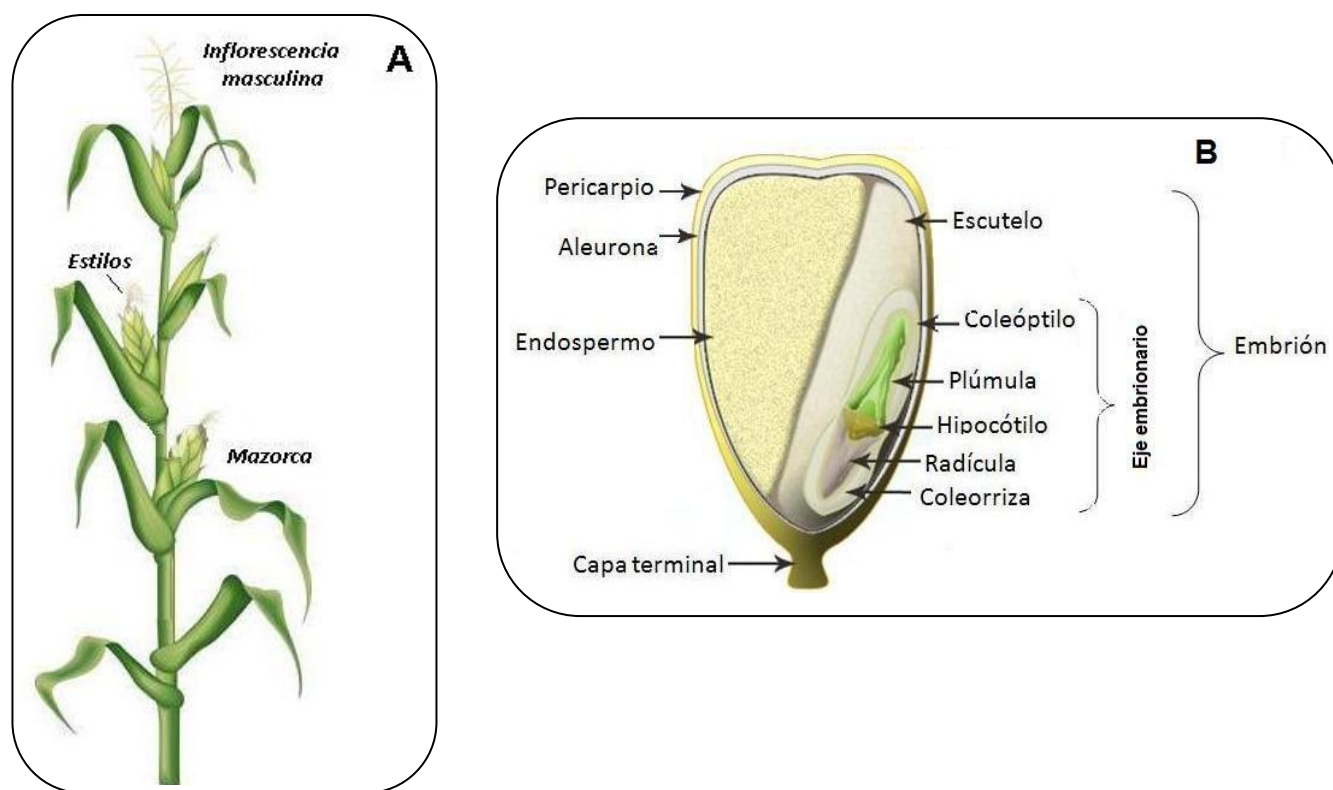


Figura 1. Partes de la planta y semilla de maíz. A) Planta de maíz, B) semilla (tomado y adaptado de GeoChembio, 2012).

- **Endospermo.** Tejido de reserva de nutrientes de la semilla que puede nutrir al embrión varios días después de la germinación. Tejido que en peso representa el 85% de la semilla y con una composición alta de almidón.
- **Embrión.** Se compone del escutelo y del eje embrional o embrionario.
 - **Escutelo.** El escutelo es considerado por algunos como el equivalente al cotiledón. Nunca funciona como una hoja sino más bien se encarga de digerir o absorber los nutrimentos del endospermo y contiene un alto contenido de lípidos.
 - **Eje embrionario.** Contiene los tejidos que conformaran a la nueva planta, en la parte basal se encuentra la raíz primaria cubierta por un tejido de protección denominado coleoriza y en la sección opuesta se encuentra la plúmula cubierta de una estructura denominada coleóptilo.
- **Capa terminal o pedicelo.** Parte que se une al olote, es una estructura esponjosa, adaptada para la rápida absorción de humedad. Entre esta capa y la base del embrión se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar o hilo, la cual funciona como una pared sellante durante la maduración de la semilla (la formación de la capa negra indica semilla madura).

La composición química de la semilla es variable y está relacionada con el estadio del desarrollo, la raza, la variedad, la tecnología del cultivo y el clima, la parte de la planta o del grano que se analice y las técnicas y métodos de análisis.

En general el endospermo en peso representa el 82% de la semilla de maíz, el pericarpio el 6% y el embrión el 12%. Siendo la composición promedio de la semilla entera expresada en peso seco 72.8 % almidón, 4.7% lípidos, 9.6% de proteínas, carbohidratos en aproximadamente 2% y fibra 10%. Mientras, que en los tejidos mayoritarios de la semilla la composición es la siguiente:

Endospermo. Presenta un alto contenido de almidón, el 86.6% promedio del total de la semilla, y contiene además proteínas como las albúminas, globulinas, prolamina (zeína) y glutelinas (gluten del maíz), y en escasas cantidades de lípidos y azúcares.

Embrión. Contiene la mayor cantidad de lípidos de la semilla, aproximadamente 34.4%, en particular en el maíz Tuxpeño var Chalqueño se encuentra en un 42% (Luna-Loaiza, 2011), mientras que el contenido de azúcares es bajo, si bien la sacarosa es el mayor componente de estos (Martínez-Marcelo, 2008; Luna-Loaiza, 2011; Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Contiene también proteínas como albúminas, globulinas, glutelinas y escasa prolamina (zeína) (Reyes, 1990).

Pericarpio. Contiene almidón, grasa, proteína, cenizas, azúcares y fibra. Los principales carbohidratos son parte de la pared celular como celulosa y hemicelulosa (Reyes, 1990).

Una semilla madura de maíz además de contener compuestos de reserva presenta la característica de presentar un bajo contenido de agua, entre el 8 y 13%. Las semillas que completan su maduración con el secado una vez que han acumulado sus compuestos de reserva son denominadas semillas ortodoxas, y ellas pueden sobrevivir en estado seco, ya que están bien equipadas para mantenerse por periodos prolongados en condiciones desfavorables. Lo anterior con la finalidad de optimizar la germinación a pesar de que haya pasado un tiempo desde que se formó y maduró la semilla, y se mantiene en un estado dormante o latente. La dormancia o latencia es un estado temporal de la semilla que previene que una semilla viable germine aún en condiciones favorables. Se conoce que el balance dinámico entre la síntesis de dos hormonas el ácido abscísico (ABA) y el ácido giberélico (GA_3) controla el equilibrio entre la dormancia y la germinación (Bentsink y Koornneef, 2002). Más adelante se detalla la función de cada una.

II. 2 Germinación

La germinación es el proceso que comienza con la entrada de agua a la semilla y culmina con la salida del tejido embrionario, en el caso particular del maíz la emergencia de la radícula. En condiciones adecuadas de humedad, temperatura y condiciones de luz, la semilla de maíz reiniciará su proceso de elongación (Bewley y Black, 1995).

Se ha descrito ampliamente que la germinación se realiza durante las primeras dos fases de la curva de hidratación de la semilla (Bewley y Black, 1995). En la primera fase de

hidratación, la semilla entra en contacto con el agua, proceso físico que permite la hidratación de moléculas, durante esta fase se ha encontrado que hay una salida rápida de solutos (Bove *et al.*, 2002; Calzada-Alejo, 2011), principalmente debida a que las membranas celulares se reacomodan (Bewley y Black, 1995 y Bove *et al.*, 2002). En algunas ocasiones si la salida de solutos es alta, los microorganismos que se encuentran en la superficie de la semilla se aprovechan de estos y se multiplican, proceso que puede llevar a la muerte de la semilla. Con la hidratación se readquiere la permeabilidad selectiva de la membrana, comienza la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN, por sus siglas en inglés) y de las moléculas que se dañaron durante el proceso de desecación de la semilla que ocurrió durante la embriogénesis o previo a la hidratación (Bewley y Black, 1995; Bove *et al.*, 2002).

La mayor actividad metabólica ocurre en la fase II o también denominada fase estacionaria de la toma de agua, en esta se prepara a la célula para la duplicación celular. Todos aquellos procesos celulares que necesitan de energía y esqueletos carbonados o nitrogenados dependen del aporte de nutrimentos almacenados en el propio embrión. Recientemente se demostró que la sacarosa es un metabolito que se moviliza desde las primeras horas de imbibición del embrión de maíz y que provee de carbono al eje embrionario antes de la emergencia de la radícula (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Se ha encontrado también que la biogénesis mitocondrial está activa en esta fase, su producto principal, el adenosin trifosfato (ATP) se sintetiza probablemente para la síntesis de los polímeros de la pared celular, la síntesis del DNA, el ácido ribonucleico (RNA, por sus siglas en inglés) y las proteínas y para los eventos de transporte entre compartimentos celulares y entre tejidos (Logan *et al.*, 2001).

Finalmente, la fase III, también llamada post-germinativa, comienza por la aparición de la radícula, presentando un importante incremento en la absorción de agua y en la utilización de de nutrientes provenientes de los tejidos de reserva, el endospermo en el caso del maíz.

En resumen, durante la germinación se suceden tanto eventos físicos y bioquímicos que regulan el proceso de la emergencia de la radícula, entre los que destacan el debilitamiento de la cubierta de la semilla, el encendido de la actividad metabólica (síntesis y/o reparación de DNA, RNA, proteínas y membranas), la relajación de las paredes celulares embriogénicas, y el re-ensamblamiento y biogénesis de los organelos (Srivastava, 2002).

II.3 Hormonas y germinación

Entre las moléculas que también cambian en concentración durante la germinación, son las hormonas, es importante mencionar que la fisiología de las semillas así como en las distintas etapas del desarrollo de la planta se gobierna por los niveles de sus hormonas. Antes de describir qué ocurre con los niveles de hormonas durante la germinación definamos hormona. El término hormona se utiliza en un sentido amplio para incluir sustancias que se producen, transportan y perciben de manera natural en las plantas, en pequeñas cantidades, y llevan a cabo una variedad de respuestas específicas principalmente involucradas en la formación de órganos (Kucera *et al.*, 2005).

Las hormonas producen una variedad de efectos en el crecimiento, o en respuestas morfogénéticas, y cada una es pleiotrópica en sus efectos. No todas las respuestas son estimuladoras, además de que varias hormonas pueden tener efecto sobre la misma respuesta. Así, existe una aparente redundancia en el control de la misma respuesta. Sin embargo, aún no se conoce si la señalización está implicada o si el mecanismo de la respuesta es el mismo en cada caso, pero el fenómeno de la redundancia es común (Srivastava, 2002).

Las hormonas son activas en pequeñas concentraciones, normalmente en el orden η molar, aunque muchas respuestas comienzan a presentarse en concentraciones de 10 a 100 μ molar. Hasta una cierta concentración de la hormona, la respuesta incrementa y luego se satura. Para algunas hormonas, una alta concentración puede convertirse en una respuesta inhibitoria. Por otra parte, el transporte de hormonas ocurre en algunos casos del sitio de síntesis al sitio de acción (sitio blanco), pero en otros, el sitio de producción y el sitio de acción puede ser el mismo (Srivastava, 2002).

Algunas de las hormonas en plantas son: las auxinas, el ABA, las GA, los brasinoesteroides, el etileno y las citocininas. A continuación se describirán brevemente las tres primeras, por ser motivo de este estudio.

II.3.1 Ácido abscísico

ABA es un sesquiterpenoide (un terpenoide C_{15}) con un anillo y una cadena lateral (Figura 2). En el C-1' se presenta asimetría presentando las formas (+) y (-) ó (S) y (R). Solamente el enantiómero S-(+) está presente de manera natural en las plantas. El ABA que se encuentra mayormente en plantas es el isómero 2-*cis*, 4-*trans*. Por convención, debido a que se presenta de manera natural, el ácido abscísico (+)-2-*cis*, 4-*trans* es nombrado ácido abscísico o simplemente ABA (Srivastava, 2002).

ABA es un ácido débil que a pH ácido está en la forma protonada, es en este estado en el que atraviesa la membrana por difusión simple, no así la forma aniónica que requiere la difusión facilitada para ser acarreada. Así, ABA puede ser almacenada en cloroplastos cuando se tiene un pH mayor que en el citoplasma (Srivastava, 2002).

ABA se encuentra principalmente en las semillas y las hojas en plantas maduras, pero también se ha encontrado que varias especies de hongos fitopatógenos pueden sintetizarlo (Srivastava, 2002).

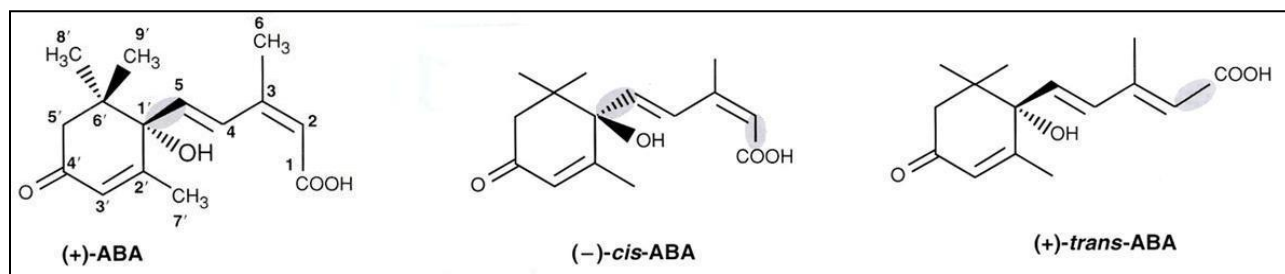


Figura 2. Estructura de (+)-ABA y sus enantiómeros (tomado de Srivastava, 2002).

II.3.2 Papel fisiológico del ABA

ABA es una señal específica durante el desarrollo y en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental como el frío, la sequía, las altas concentraciones de sal en el suelo, por esto último se le conoce como la hormona del estrés. ABA induce numerosas respuestas fisiológicas como el cierre de los poros estomáticos que restringen la transpiración, el ajuste del metabolismo para tolerar la desecación y las bajas temperaturas, así como la inhibición del

crecimiento de las plántulas. Un efecto reconocido de ABA es reprimir la germinación y se presume que tiene la función de estabilizar el estado de dormancia (Srivastava, 2002; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

Estudios genéticos muestran que el embrión en desarrollo sintetiza ABA y no es la planta madre quién se lo dona. Durante la embriogénesis de la semilla la dormancia aparece al final de la fase de maduración, en la cual el ciclo celular cesa, la dependencia molecular de la planta madre desaparece, el contenido de agua decrece, los productos de almacenamiento son sintetizados y el ABA se acumula (alto contenido de ABA y bajo de GA), y se establece la dormancia primaria de la semilla. Altos niveles de ABA se han encontrado en el complejo pedicelo/placento-chalaza de los granos de maíz. Hay una gran cantidad de evidencia que muestra que para que la dormancia se rompa y que la germinación ocurra debe disminuir el contenido de ABA de la semilla (Srivastava, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

La síntesis de ABA se localiza en dos compartimentos en el citoplasma y en el plastidio. Mientras que su catabolismo se realiza en el citosol y principalmente ocurre por dos tipos de reacciones la hidroxilación y su conjugación (Figura 3). El ABA es convertido a su forma inactiva e inestable (8'-hidroxi ABA) a través de la ABA 8'-hidroxilasa, la cual es parte de la familia de las monooxigenasas P450. Aunque, también se ha reportado la hidroxilación en 7' y 9'. Una vez hidroxilado se isomeriza espontáneamente a ácido faséico (PA, por sus siglas en inglés) y se cataboliza a dihidro-faséico (DPA, por sus siglas en inglés). Por otra parte tanto PA, DPA y ABA se conjugan con compuestos de bajo peso molecular como la urocin difosfato-D glucosa (UDP-D glucosa), mediante una glicosiltransferasa. Durante la germinación la disminución de ABA podría ocurrir por la disminución en su síntesis o por el incremento en su degradación. Se ha observado que el decremento en ABA durante la imbibición de las semillas de avena y *Arabidopsis* está asociado al incremento en PA (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

No obstante que se ha observado la disminución de ABA, también se ha encontrado que otras señales son necesarias para que la germinación de la semilla ocurra, como son el

incremento de GA y otras moléculas señal como etileno, las especies reactivas de oxígeno, glucosa, nitrato o proteínas que unen calcio (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009; Srivastava, 2002).

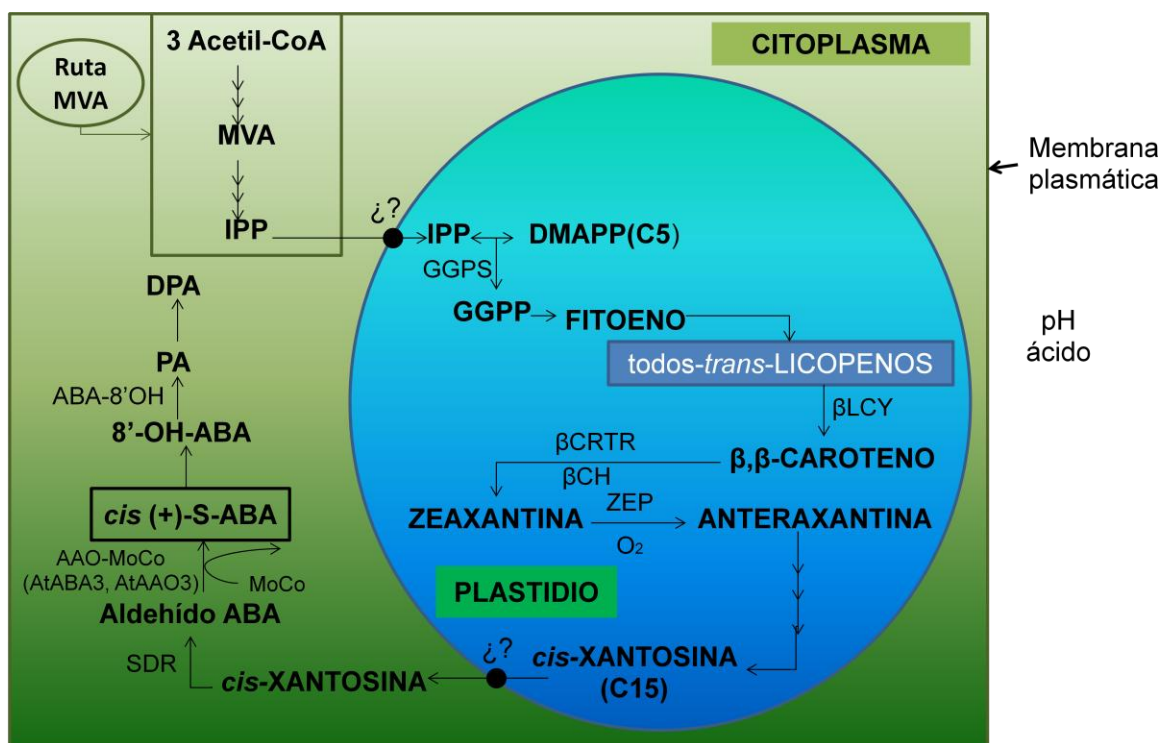


Figura 3. Metabolismo de ABA. Por sus siglas en inglés: βLCY, licopeno β-Ciclase; βCH, hidroxilasa β-caroteno; βCRTR, hidroxilasa anillo β-carotenoide; AAO-MoCo, aldehído abscísico oxidasa o sulfatasa cofactor del molibdeno; DMAPP, dimetilalil difosfato; DPA, ácido dihidrofaséico; GGPP, geranilgeranil difosfato; GGPS, geranilgeranil difosfato sintasa; IPP, isopentenil difosfato; MoCo, cofactor del molibdeno; MVA, ácido mevalónico; SDR, miembro de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta; PA, ácido faséico; ZEP, epoxidasa zeaxantina (adaptado de Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009).

II.3.3 Giberelinas (GA)

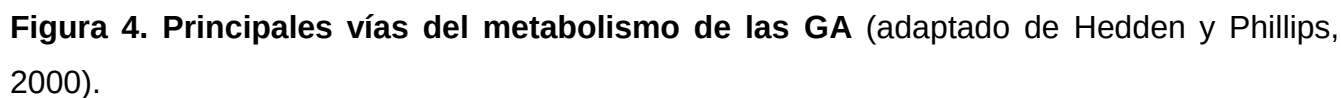
Las GA son mejor definidas por su estructura que por su actividad biológica. Todas son ciclo diterpenos con una estructura *ent*-giberelina. Las GA son ácidos débiles con un pKa de aproximadamente 4.8 y se encuentra en estado disociado a pH neutro (Srivastava, 2002). Las GA se encuentran en todos los tejidos vegetativos y el tejidos florales a concentraciones

bajas entre 0.1 a 100.0 ng/ g de peso fresco. Se ha llegado al conocimiento a detalle de las vías de síntesis de GA en plantas debido a los estudios de estas vías en hongos y a que se han obtenido plantas mutantes en algunos de los genes implicados en el metabolismo de las GA. Las vías de formación y catabolismo de los compuestos bioactivos GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ se muestran en la Figura 4. Como se observa la síntesis de las GA es compleja, las reacciones ocurren entre el citosol, el plastidio y el retículo endoplásmico. Adicionalmente, la regulación de su síntesis también es compleja, ya que la transcripción de algunos de los genes que codifican para su síntesis depende de varios factores como: la luz (GA₃ox), condiciones ambientales (*ent*-copalil difosfato sintasa, CPS), del fotoperiodo (GA₂₀ox) y de las auxinas (GA₂₀ox y GA₃ox), además de su propia autorregulación (Kucera *et al.*, 2005).

II.3.4 Papel fisiológico de las GA

El papel de las GA en el crecimiento y desarrollo de las plantas fue evidente cuando mutantes deficientes en GA presentaban un tamaño menor que las plantas silvestres. En los años 50's del siglo pasado se encontró que las mutantes enanas de chícharo y maíz llegaban a su tamaño normal cuando se les aplicaba GA, éste último obtenido de cultivos con el hongo *Gibberella fujikuroi*. Las GA están involucradas en un gran número de respuestas bioquímicas y morfogenéticas. Una respuesta muy común es la promoción de la elongación en los órganos axiales, como tallos, pecíolos y los pedicelos de las flores (Hedden y Phillips, 2000; Kucera *et al.*, 2005).

En la germinación se ha observado que el embrión sintetiza GA₃, respuesta que posiblemente es mediada vía fitocromo, esta activación debida a la luz lleva a la acumulación de GA₃ y a su transporte a los tejidos externos, como es la capa de aleurona. En la aleurona la hormona induce la expresión de varias proteínas entre ellas la α -amilasa, enzima que se encarga de hidrolizar el almidón contenido en el endospermo de las semillas de los cereales (Bewley y Black, 1995; Srivastava, 2002). Está bien documentado que el aumento de GA al transcurrir la germinación coincide con la reducción en el contenido del ABA (Srivastava, 2002; Aguilera-Alvarado, 2010). Por lo que se estima que en realidad el balance ABA/GA es el que lleva a que proceda la germinación o a mantener la dormancia.



Dos funciones han sido propuestas para la acción de GA en la germinación, la primera es que GA incrementa el potencial de crecimiento del embrión y la segunda que GA es necesario para superar la restricción mecánica debida a las capas que cubren a la semilla, debilitando los tejidos que rodean a la radícula. El hecho de que GA se acumula en la zona de la radícula apoya la segunda función propuesta. Además, se ha observado que la ruptura de la testa y el endospermo de semillas de tabaco depende de la acción de ácido giberélico y que la adición de ABA después de la ruptura de la testa inhibe la ruptura del endospermo. Se conoce que la glucanasa de clase I denominada β -1,3-glucanasa (β -Glu I) se induce después de la ruptura de la testa, pero antes de la ruptura del endospermo de las semillas de *Nicotiana* (Figura 5).

Está inducción se localiza exclusivamente en el micrópilo del endospermo, que es donde la radícula emerge. Mientras que la hormona antagónica del GA, el ABA, inhibe la inducción de los genes que codifican a la β Glu I durante la germinación de tabaco y retrasa la ruptura del endospermo (Kucera *et al.*, 2005). Por otra parte, otra señal importante para que la germinación proceda viene del etileno, quien aumenta la transcripción del gen β Glu I (vía el elemento de unión de proteínas en respuesta a etileno, EREP) y por tanto la ruptura del endospermo.

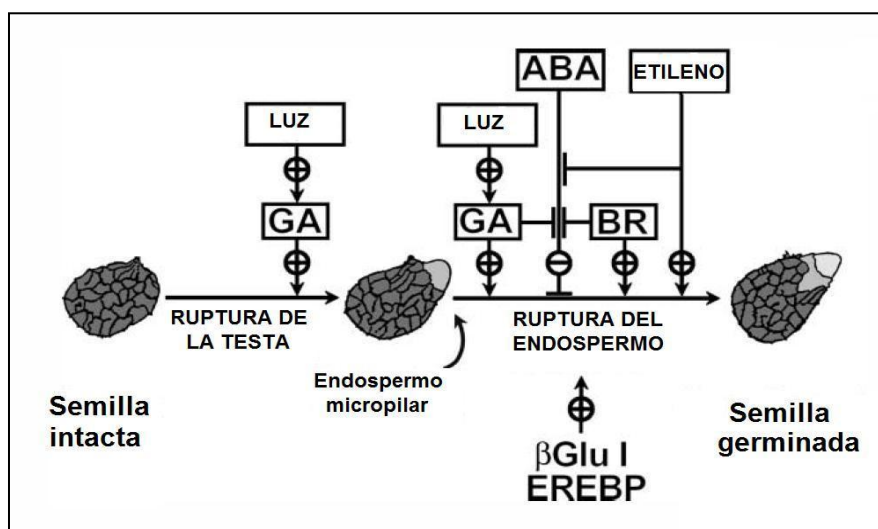


Figura 5. Interacciones hormonales durante la liberación de la dormancia y germinación y sus efectos en la ruptura de la testa y el endospermo de la semilla de tabaco (tomado de Kucera *et al.*, 2005).

Otra enzima que es parte de la remodelación o relajación de la pared celular de los endospermos es la expansina, enzima localizada en la pared celular. La transcripción de los genes para las expansinas aumenta al iniciar la imbibición, así como la actividad enzimática en la zona micropilar de la semilla, a la par del aumento en la concentración de GA. Mientras que la adición de ABA no afecta su actividad. Por lo que es probable que el aumento en la transcripción de varios genes que codifican para expansinas estén siendo regulados por los niveles de GA para favorecer la ruptura del endospermo y la salida de la radícula (Weitbrecht *et al.*, 2011).

II.3.5 Auxinas

El término auxinas se refiere a un pequeño número de moléculas que tienen la habilidad de inducir el crecimiento. El crecimiento se define como un incremento irreversible en tamaño y se logra por el alargamiento de células individuales a expensas de la toma de agua (Teale *et al.*, 2006; Zhao, 2010).

El ácido indol-3-acético (IAA) fue la primera auxina encontrada y la que predomina en plantas, aunque también ha sido encontrada en humanos, animales y microorganismos. IAA es un ácido débil con un pKa de pH 4.85 y, en soluciones con un pH neutro, está presente en estado disociado (Figura 6) (Srivastava, 2002).

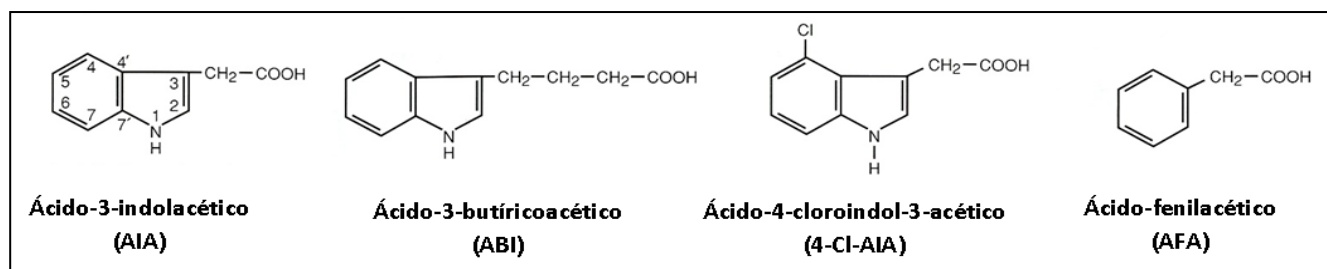


Figura 6. Estructura química del ácido 3-indolacético y otras auxinas presentes naturalmente (adaptado de Srivastava, 2002).

II.3.6 Papel fisiológico de las auxinas

IAA es una hormona indispensable ya que regula varios aspectos del desarrollo de las plantas entre los que se incluyen: el patrón de formación en el desarrollo del embrión, la inducción de la división celular, la elongación del tallo y el coleóptilo, la dominancia del ápice, la inducción de enraizamiento, la diferenciación del tejido vascular, el desarrollo del fruto, y de los movimientos de tropismo tales como la flexión de los brotes hacia la luz o que las raíces sigan la gravedad (Srivastava, 2002; Zhao, 2010). Los efectos de las auxinas a pesar de ser diversos se pueden dividir en dos grandes categorías: efectos en la expansión celular y efectos sobre la división celular (Teale *et al.*, 2006).

Efectos en la división celular. Auxina promueve la división celular, aunque se desconocen aún las bases moleculares de los efectos, hay evidencia de que la inducción puede ser mediada a través de la vía dependiente del proteosoma y la vía dependiente de ABP-1 (proteína de unión a auxinas-1, por sus siglas en inglés), aunque la auxina puede tener varios blancos potenciales. Los blancos proteicos están involucrados en la entrada a la fase S del ciclo celular o bien en la transición de G2 a M.

Efectos en la expansión celular. A nivel de la pared celular y la membrana plasmática se ha encontrado que la auxina induce la expansión celular y la hiperpolarización de la membrana, así como evidentemente hay una inducción en la actividad debida a proteínas que remodelan la pared celular o su degradación, como son las expansinas, arabinogalactanos, extensinas, proteínas ricas en prolina, peroxidasas clase III entre otras (Teale *et al.*, 2006).

Respecto a este último punto se ha descrito en la literatura que el crecimiento debido a auxinas pudiera estar de acuerdo con la teoría ácida del crecimiento, la cual propone que un tejido expuesto y susceptible a auxina secreta protones hacia la pared celular (apoplasto) disminuyendo su pH (Rayle y Cleland, 1992). El decremento en el pH apoplástico activa el proceso de ablandamiento de la pared celular, aunque se desconoce con certeza como ocurre, se propone que puede modificar las uniones entre los diferentes componentes de la pared celular, o bien activar enzimas que la remodelan, como las expansinas. Durante la

germinación se ha encontrado que la actividad de la ATPasa de protones es alta en la zona radicular a las 24 h de germinación del maíz justo cuando la radícula emerge (Enríquez-Arredondo *et al.*, 2005; Sánchez-Linares *et al.*, 2012), por lo que es factible que la acidificación en esa zona ocasionada por la ATPasa de protones de la membrana plasmática pueda ser producto de la señalización mediada por auxinas.

La función biológica de la auxina se lleva a cabo a través de una regulación estricta y compleja entre tres procesos: el metabolismo de auxinas, su transporte y la señalización. Se ha logrado avanzar en el conocimiento sobre las vías de síntesis de auxinas gracias al conocimiento generado al dilucidar la vía de síntesis de auxinas por microorganismos patógenos de plantas. De las múltiples vías que contribuyen con la síntesis *de novo* de auxinas, en *Arabidopsis* la vía dependiente del triptófano es la principal (Zhao, 2010). Por otra parte, existe una poza de auxinas-conjugadas como los IAA-aminoácidos, IAA-azúcares, IAA metil éster que al ser hidrolizadas contribuyen también a la señalización.

Además de su metabolismo, su transporte direccional es crucial para guiar la información hacia la zona o tejido que requiere el crecimiento en la planta. Para ello se crea el gradiente de auxinas a través de transportadores específicos (AUX e IAA), lo que lleva a que la auxina se movilice desde zonas muy alejadas de la planta hasta su sitio de acción.

II.3.7 Hormonas en la defensa de las plantas

La concentración de hormonas se modifica no solo por el periodo del desarrollo de la planta, sino también por las condiciones ambientales y nutrimentales a las que se enfrente como la sequía, frío, inundaciones, insectos, microorganismos, plantas competidoras entre otros.

El ácido salicílico (SA), los jasmonatos (JA) y el etileno (ET) son las hormonas o fitoreguladores que juegan un papel importante en la defensa de las plantas, sin embargo también ABA, GA, auxinas, brasinoesteroides y citocinas participan en la defensa (Figura 7) (Bari y Jones, 2009). Los cambios hormonales y las señales que desencadenan son distintos dependiendo del tipo de patógeno.

Los patógenos fúngicos pueden clasificarse en tres tipos: biótrophos, necrótrofos o hemibiótrophos. Los primeros son aquellos microorganismos que se asocian a la planta utilizando estrategias que podrían clasificarse como sofisticadas, ya que desarrollan estructuras que pueden entremeterse en los apoplastos de las células, como las hifas y los apresorios, adquieren los nutrientes de la célula vegetal y además suprimen de manera específica algunas de las reacciones de defensa de la planta, las que podrían restringir la invasión. Por el contrario, los hongos necrótrofos al interactuar con la planta llevan a la muerte de la célula hospedera para nutrirse de está. Para lograrlo sintetizan y exportan una variedad amplia de enzimas que degradan la pared celular, además de toxinas. Mientras que los organismos hemibiótrophos combinan ambas estrategias, esto es, se inicia con una fase biotrófica que permite el crecimiento y propagación de las hifas entre los apoplastos, para posteriormente secretar enzimas que degradan la pared celular y toxinas para inducir la muerte celular (Koeck *et al.*, 2011).

Se conoce que SA juega un papel crucial en la defensa de la planta contra organismos biotróficos y hemibiótrophos. En contraste, el JA y el ET están relacionados con la defensa por organismos necrotróficos y el daño ocasionado por herbívoros (Figura 7). Aunque las vías del SA y JA/ET son mutuamente antagonistas, hay evidencias de interacciones sinérgicas.

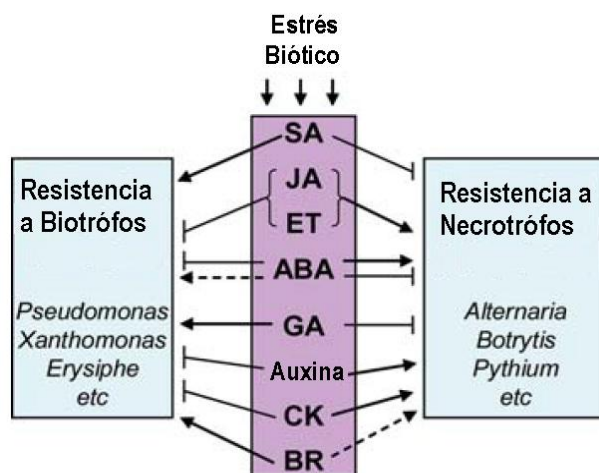


Figura 7. Modelo simplificado mostrando como las diferentes hormonas producen una regulación positiva o negativa en la resistencia de la planta ante patógenos biotróficos o necrotróficos. Las flechas indican activación o una interacción positiva y las líneas entrecortadas indican represión o una interacción negativa (tomado de Bari y Jones, 2009).

En relación a las otras hormonas que participan en la defensa de la planta contra patógenos, se ha logrado el entendimiento del papel individual de algunos de los componentes en las vías de transducción de señales a través de la identificación y caracterización de diferentes mutantes afectadas en la biosíntesis, percepción y en la transducción de la señal de las hormonas. En la Tabla 2 se muestran algunos ejemplos que sugieren que las hormonas ABA, GA y auxinas participan en la resistencia a la enfermedad debida a microorganismos patógenos. Aunque, el mecanismo molecular que integra o relaciona al estrés por patógenos con los cambios hormonales en la planta es aún poco entendido.

Adicionalmente, los patógenos microbianos han desarrollado habilidades para producir fitohormonas o mimetizar su función llevando a un desbalance hormonal y una activación inapropiada de las respuestas de defensa en la planta.

Tabla 2. Efectos de mutaciones en la síntesis, percepción o componentes de la señalización de ABA, auxinas y GA en la sensibilidad a patógenos por diferentes plantas (información adaptada de Bari y Jones, 2009).

Hormona examinada	Planta	Microorganismo patógeno	Efecto en la planta
ABA	Jitomate, mutante sitiens deficiente en ABA.	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Oidium neolycopersici</i> <i>Erwinia chrysantemi</i>	Resistencia a la enfermedad.
	<i>Arabidopsis</i> , mutante aba2-1 deficiente en ABA.	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria brassicicola</i> <i>Pythium irregulare</i> <i>Leptosphaeria maculans</i>	Resistencia a la enfermedad por patógenos fúngicos.
	<i>Arabidopsis</i> , mutante incapaz en la síntesis de ABA o su sensibilidad.	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	Resistencia a la enfermedad. Aumento [ABA] y [JA]
	<i>Arabidopsis</i> silvestre asperjada con ABA.	<i>Botrytis cinerea</i>	Susceptibilidad a la enfermedad.
	Arroz silvestre asperjada con ABA.	<i>Magnaporthe grisea</i>	Susceptibilidad a la enfermedad.
Auxinas	<i>Arabidopsis</i> silvestre.	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	Susceptibilidad a la enfermedad. Activa la producción de auxina. Reprime la expresión de los genes de los transportadores de auxinas AUX/IAA.

Hormona examinada	Planta	Microorganismo patógeno	Efecto en la planta
Auxinas	<i>Arabidopsis</i> , mutante por expresión de microRNAi que produce la reducción en el receptor de auxinas.	<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	Resistencia a la enfermedad.
	<i>Arabidopsis</i> , mutante en los componentes de señalización o transporte auxinas.	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	Resistencia a la enfermedad.
GA	Arroz, mutante <i>gid1</i> , defectuosa en el receptor de GA.	<i>Magnaporthe grisea</i>	Resistencia a la enfermedad. Aumento en [GA] Aumento en la proteína PBZ1 (probenazole inducible1) inducida por GA.
	Arroz, mutante <i>eui</i> , defectuosa en la Enzima regulada por GA, la Elongated Uppermost Internode (EUI).	<i>Xantomonas oryzae</i> <i>Magnaporthe oryzae</i>	Susceptibilidad a la enfermedad.

II.4 *Fusarium* principal patógeno en maíz

Se ha documentado que las semillas, hojas, raíces y tallos son susceptibles a un cierto número de enfermedades que reducen la capacidad de la planta para crecer de una manera normal, y pueden, en última instancia, reducir la producción de semillas.

Si bien un amplio número de organismos pueden afectar el crecimiento del maíz, los hongos son los que causan las mayores pérdidas. Las pérdidas no se restringen solo a la cosecha, sino también a las pérdidas económicas para el tratamiento de las enfermedades producidas por las micotoxinas que secretan los patógenos y que pueden ser consumidas por las vacas, puercos y caballos (Goldblatt, 1972).

Fusarium es un hongo que naturalmente se encuentra donde se cultiva maíz. Durante la época cálida en la floración y después de ésta se ha observado un incremento en la enfermedad por el hongo. El hongo es del tipo filamentoso y hialino (Figura 8A y 8B). La reproducción sexual, aunque no común, puede ser facilitada por los microconidios usados como célula espermática para la fertilización del protoperitecio¹. Así, los microconidios son importantes para la sobrevivencia y reproducción de *Fusarium*.

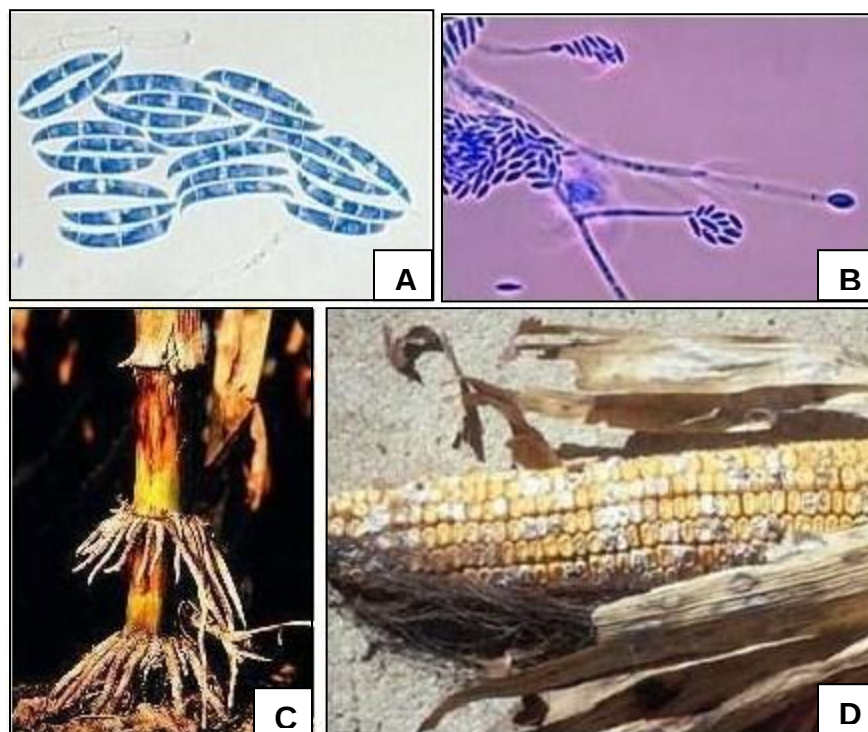


Figura 8. *Fusarium* y la enfermedad que produce en el maíz. A. Macroconidios, B. Microconidios, C. Planta de maíz infectada con *Fusarium*. D. Mazorca infestada con *Fusarium* (tomado y adaptado de Malvick, 2007).

Los síntomas de la enfermedad en el maíz producidos por *Fusarium* varían mucho dependiendo del genotipo, medio ambiente y gravedad de la enfermedad (Figura 8C). Normalmente, los granos individuales o grupos de granos infectados están dispersos al azar en toda la mazorca (Figura 8D). Se llega a observar el crecimiento típico del hongo como la aparición de un color rosa blanquizco a morado en los granos y/o en las inflorescencias

¹ Protoperitecio: precursor del peritecio, el cual es un ascocarpo provisto de una abertura que contiene ascas, que a su vez tienen ascosporas que se forman como resultado de cariogamia y meiosis. (Castañón, 2004)

masculinas. El crecimiento fúngico se encuentra frecuentemente en la punta de la mazorca, donde la infección está asociada con la oruga del maíz y otros tipos de daños. Cuando la enfermedad es muy grave, toda la mazorca puede ser blancuzca y aparecer desgastada con crecimiento fúngico sobre los granos y entre ellos (Figura 8D) (American Phytopathological Society, 2004).

Los híbridos de maíz difieren en su susceptibilidad a la enfermedad por *Fusarium*. Un adecuado almacenamiento de los granos después de la recolección previene la acumulación de la micotoxina fumonisina. La humedad y fertilización equilibradas, y el control de los insectos que dañan a los granos, reducen la gravedad de la enfermedad (American Phytopathological Society, 2004).

Se considera que *Fusarium* es el género productor de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas del hemisferio norte y se encuentra habitualmente en cereales cultivados en regiones templadas de América, Europa y Asia. Las toxinas más comunes del género *Fusarium* son los tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas. Estos metabolitos se pueden elaborar tanto durante el crecimiento de la planta como al principio del almacenamiento. Pueden estar presentes en granos de cereales asintomáticos y se encuentran en cereales y sus productos (Soriano, 2007).

Las fumonisinas son un grupo de al menos 15 micotoxinas de estructura química similar, son amino polialcoholes, carboxilados y que pueden tener distintos sustituyentes, destaca la fumonisina B1 por ser la toxina más potente y en algunos casos la más abundante (Figura 9) (Desjardins *et al.*, 1997). Las fumonisinas se descubrieron a mediados de los ochenta a partir de cultivos de *F. moliniforme* (Gelderblom *et al.*, 1988). Actualmente, las principales especies productoras de fumonisinas son *F. verticillioides* y *F. proliferatum* (Soriano y Dragacci, 2004), y también algunas cepas de *Fusarium fujikuroi*.

En contraste, la producción de GA₃ es casi exclusiva del *F. fujikuroi*, cepa que produce una enfermedad en arroz que se caracteriza por sobrecrecimiento. *F. fujikuroi* es una cepa que es usada comercialmente para producir a gran escala GAs, principalmente GA₃, aunque también GA₄ y GA₇, que tienen aplicaciones en la agricultura y horticultura como reguladores

del crecimiento en plantas (Malonek *et al.*, 2005). Sin embargo, la cepa de *Fusarium* que usamos en este estudio, *F. verticillioides*, es incapaz de producir GA₃, debido a la ausencia de 5 de los 7 genes que codifican para los genes biosintéticos de estas GA (Bömke *et al.*, 2008).

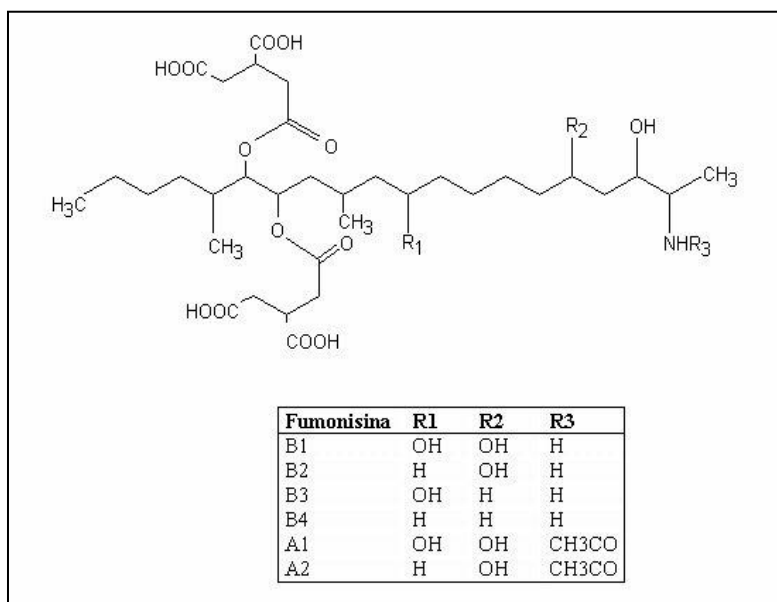


Figura 9. Estructura química de las fumonisinas (tomado de Velázquez, 2007).

En cuando a la respuesta de defensa de la planta se conoce que *Fusarium verticillioides* induce la síntesis de SA en los embriones de maíz a partir de las 24 y 36 horas de germinación, y que probablemente este aumento sea responsable de la inducción de nucleasas que llevan a la muerte celular del embrión de maíz (De la Torre-Hernández *et al.*, 2010).

II.5 *Trichoderma asperellum* hongo benéfico para plantas.

Trichoderma asperellum es un hongo del orden de los hipocreales que produce conidios rugosos, tabicados, de forma ovoide o claramente elipsoidales, con 2.8 a 4.5 µm de diámetro (Figura 9) (Soriano, 2007; Catalogue of Life, 2012). El crecimiento fúngico maduro en cultivo es de color verde oscuro a verde azulado oscuro.

Este hongo se encuentra de manera común en los suelos, y es capaz de producir una gran variedad de compuestos entre los que se encuentran los antibióticos. Adicionalmente, como una estrategia de sobrevivencia compiten por los nutrientes al parasitar a otros hongos. El hongo *Trichoderma* produce efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de plantas, induce la respuesta de defensa de las plantas, incrementa la toma de nutrientes y aumenta la eficiencia del uso de fertilizantes (Vargas *et al.*, 2009). Aunque solo ciertas cepas de *Trichoderma* pueden influenciar el desarrollo de la planta y por tanto su productividad (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

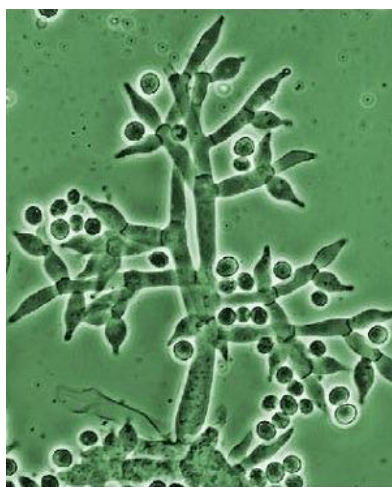


Figura 10. Fiálides de *Trichoderma asperellum*.

En maíz, la inoculación de *Trichoderma* afecta positivamente el sistema radicular tanto en su arquitectura como en su peso (Shoreh y Harman, 2008). El sistema radicular es importante para la planta ya que es su sistema de anclaje al suelo, contribuye al uso eficiente del agua y facilita la adquisición de nutrientes minerales del suelo. Debido a que las auxinas regulan la arquitectura de la raíz, se ha buscado su presencia y posibles blancos moleculares cuando *Trichoderma* se encuentra interaccionando en plantas. Por ejemplo, plantas de *Arabidopsis* cultivadas en presencia del hongo *Trichoderma viridens* llevan a un aumento en el número de raíces secundarias y su biomasa, incremento que no se observa cuando *Trichoderma* interacciona con plantas de *Arabidopsis* que carecen de los genes involucrados en la señalización o en el transporte de auxinas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). *Trichoderma* produce compuestos similares a auxinas al igual que IAA en concentraciones de 0.25 a 8 μM ,

y a ciertas concentraciones estos incrementan el crecimiento radicular de *Arabidopsis* (Figura 10) (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Debido a los efectos benéficos en el crecimiento de planta hay varios grupos de investigación que han propuesto cepas para mejorar bajo condiciones controladas de campo la producción de diversos cultivos. Además, a nivel molecular se han encontrado cambios dramáticos en la expresión de genes en la planta que nos ayudarán a entender la interacción de *Trichoderma* con la planta (Hermosa *et al.*, 2012).

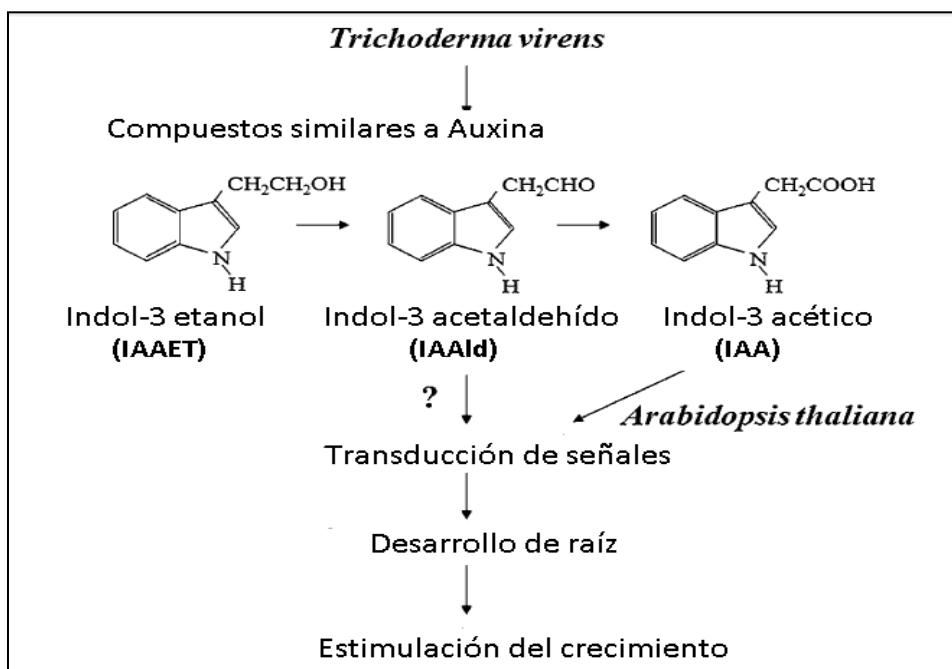


Figura 11. Respuestas de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* reguladas por *T. virens*.

T. virens induce la proliferación de las raíces laterales e induce la acumulación de biomasa debida a IAA si bien IAAld puede ser convertido a IAA por las enzimas de las plantas, el compuesto directamente regula la expresión de genes que se conoce son inducidos por IAA. IAAET no mostró una clara actividad como auxina, pero puede ser almacenado para formar otro compuesto indol activo como el IAAld o IAA (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México, tanto desde el punto de vista alimentario, industrial, político como social. El maíz se produce en todas las regiones de México en un amplio rango y diverso de climas. Alrededor del 50% de las tierras cultivables en México se dedican a la producción de maíz, siendo los estados con mayor producción Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla, Sinaloa y Veracruz (Mejia y Peel, 2009). A pesar de que México ocupa el cuarto lugar como productor de maíz en el mundo, no es un país exportador sino que es un gran importador de maíz, debido al alto consumo que se realiza del mismo, tanto para alimento humano como animal, además de los usos industriales (SIAP, 2007; Mejia y Peel, 2009).

El aumento de la producción de maíz así como de otros cultivos agrícolas es necesario para abastecer a la población no sólo en México sino la población mundial, por lo que se están realizando en el mundo estudios para aumentar su producción o bien que aquellas tierras cultivables mantengan e incrementen la relación biomasa/hectárea de este cultivo. Parte de la reducción en la producción mundial de maíz se debe al crecimiento de plagas y/o patógenos, por lo que el estudio de la interacción maíz-patógeno se hace necesario para controlar el crecimiento de éste o reducir sus pérdidas (SIAP, 2007).

Por otra parte, el uso de microorganismos que puedan aumentar, mejorar o mantener a la planta ante situaciones de estrés, ha llevado a la búsqueda de los efectos de estos microorganismos no solo en la fisiología de la planta sino a nivel molecular, buscando entender y utilizar a estos microorganismos para mejorar la productividad en el campo.

La detección de los niveles de hormonas cuando un hongo benéfico o uno patógeno interacciona con maíz nos ayudará a entender las estrategias que ambos microorganismos desencadenan en la planta para establecerse, pero de mayor importancia permitirá detectar los cambios que se producen a nivel hormonal en la planta y que pudieran ayudarla a sobrevivir ante su interacción con hongos.



Adicionalmente, en vista de que se conoce cómo cambian las hormonas durante la germinación, al menos ABA y GA (Srivastava, 2002), nos permitirá discriminar en este modelo entre los niveles de hormonas fisiológicos y los que se producen con la presencia de ambos hongos. Con lo que se presentará evidencia por primera vez de los cambios en los niveles de ABA, GA y auxinas durante la germinación del maíz y durante la infección por el hongo patogénico (*Fusarium verticillioides*) y por el hongo benéfico (*Trichoderma asperellum*).



IV. HIPÓTESIS

Debido a que tanto el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*, como el hongo benéfico *Trichoderma asperellum*, son hongos capaces de sintetizar (GA, *Fusarium*) o inducir (auxinas, *Trichoderma*) la acumulación de hormonas cuando se encuentran en tejido vegetal, esto afectará la síntesis o degradación de las principales hormonas relacionadas con la germinación en los embriones de maíz.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de ABA, GA e IAA en la germinación de embriones de maíz en ausencia y presencia de *Trichoderma asperellum* o *Fusarium verticillioides*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto en el crecimiento de los embriones de maíz en presencia del hongo benéfico *Trichoderma asperellum* o el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*.
2. Cuantificar los niveles de ABA, GA e IAA en extractos de embriones de maíz germinados a diferentes tiempos con *Trichoderma asperellum* o *Fusarium verticillioides*.
3. Comparar y analizar el efecto que producen los hongos en los niveles de las hormonas durante la germinación de embriones de maíz.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Esquema general de trabajo.

La metodología experimental que se efectuó a lo largo del presente trabajo se encuentra en la Figura 11. De manera general los embriones de maíz fueron infectados con el hongo *Fusarium verticillioides* o con el hongo *Trichoderma asperellum*. Se tuvo como control a embriones no infectados. Las determinaciones se realizaron al menos en dos lotes distintos de embriones y por duplicado. La cepa de *Fusarium verticillioides* fue proporcionada por el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra, Investigador del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM; mientras que la cepa de *Trichoderma asperellum* por el Dr. José Luis Hernández Mendoza, quien es Investigador del Centro de Biotecnología Genómica del IPN.

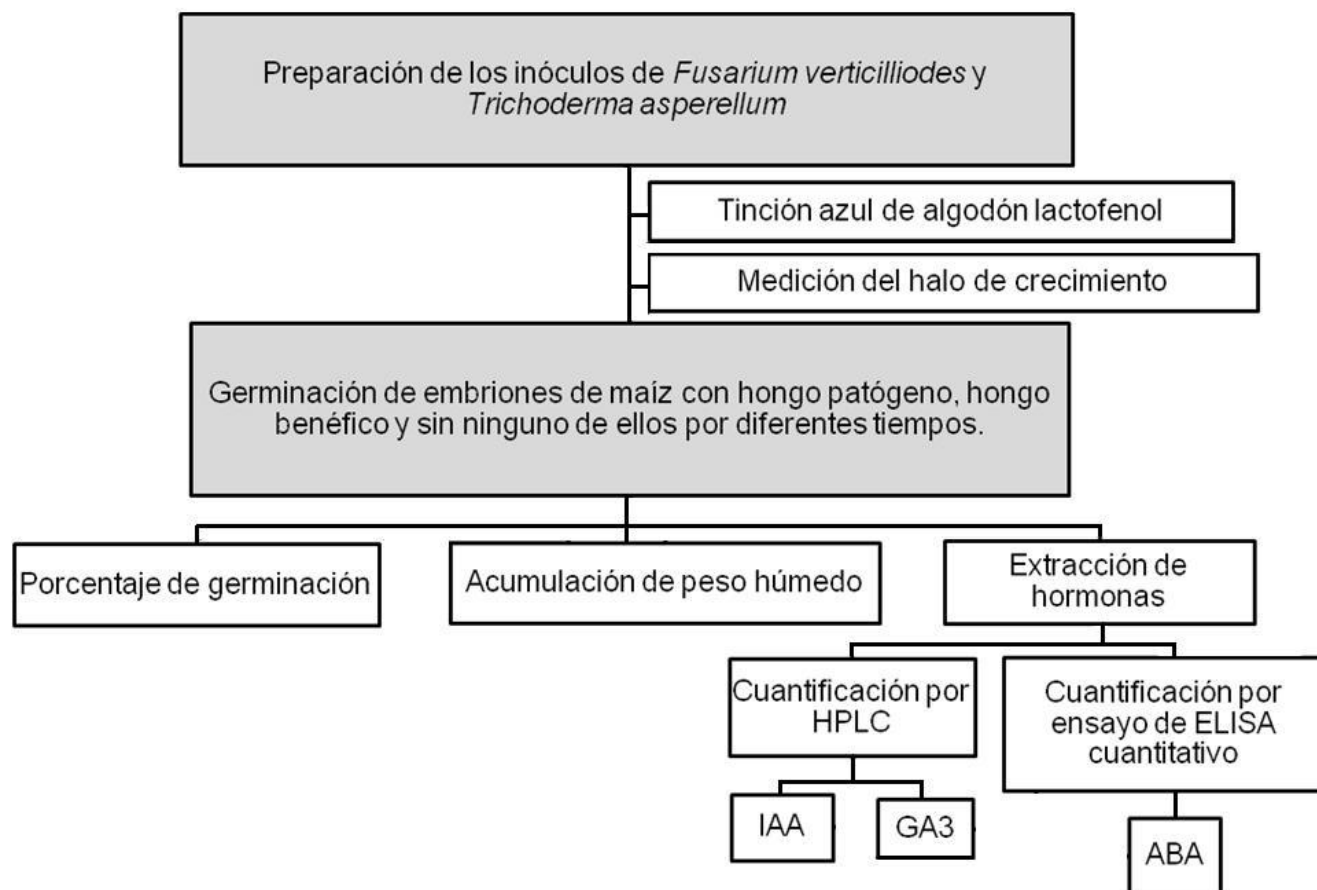


Figura 12. Esquema general de trabajo realizado.

VII.2 Material biológico.

VII.2.1 Preparación y calibración de la solución concentrada de *Fusarium verticillioides* (Tomado y adaptado de Guzmán-Chávez, 2010) y *Trichoderma asperellum*.

Preparación del inóculo. En condiciones de esterilidad, se agregaron 5.0 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *Fusarium verticillioides* y a uno de *Trichoderma asperellum*, de 2 semanas y 1 semana de crecimiento a temperatura ambiente, respectivamente, cada uno se encontraba en una caja Petri de Agar Papa Dextrosa (PDA) al 1X. Se colocó en agitación moderada y constante por 15 min a temperatura ambiente. Se recolectó el líquido resultante en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, al cual se le nombró: “*suspensión de conidios*”. A continuación se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C con el rotor 1420-B en la centrífuga Universal 320 R Heitich Zentrifugen, con el cual se centrifugó en todos los casos posteriores.

Se desecharon las tres cuartas partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones obtenidos para ser reunidos en un solo Eppendorf. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y, en condiciones de esterilidad, el botón se resuspendió en 1.0 mL de agua estéril desionizada, obteniendo así una *suspensión concentrada de conidios*.

Calibración del inóculo. En un tubo Eppendorf no estéril de 1.5 mL, se agregaron 990.0 µL o 999.0 µL de agua estéril desionizada y 10.0 µL o 1.0 µL de la suspensión concentrada de conidios de *Fusarium verticillioides* o *Trichoderma asperellum*, respectivamente. Se tomaron 10.0 µL para cargar la Cámara Neubauer y realizar el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes con el microscopio óptico Olympus CH30 (Guzmán-Chávez, 2010). Con los datos obtenidos del conteo, se calculó el volumen necesario para obtener una solución concentrada que, en el caso de *Fusarium verticillioides* fue de 6,000 conidios/µL y 4,000 conidios/µL para *Trichoderma asperellum*. La suspensión calibrada puede ser utilizada el siguiente día, pero no después ya que en el refrigerador sigue creciendo el hongo.

Finalmente, para mantener al patógeno, se sembraron 10 µL de la suspensión concentrada de conidios en PDA 1x. Todo el material en contacto con el hongo se esteriliza o se desecha después de estar en hipoclorito de sodio comercial por una noche.

VII.2.2 Crecimiento individual o en cultivo dual de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Los inóculos, se sembraron los hongos de manera individual y en un cultivo denominado dual en cajas Petri con PDA 1X. Para los crecimientos individuales se colocaron en el centro de la caja Petri con PDA 10 μL de una suspensión de 4,000 conidios/ μL de *Fusarium* o *Trichoderma*. Mientras que para el cultivo dual se colocaron ambos hongos en la misma caja y a una distancia de 4 cm entre cada gota de cultivo. Las tres cajas se mantuvieron en oscuridad y a temperatura ambiente durante seis días. A partir de las 48 h día se tomaron fotos cada 24 horas, con la cámara de un celular BlackBerry 9800 de 5.0 Megapíxeles, en condiciones de esterilidad. Estos cultivos también sirvieron para realizar las observaciones al microscopio que más adelante se detalla.

VII.2.3 Germinación de los embriones de maíz en presencia o ausencia de patógeno. (Tomado y adaptado de Guzmán-Chávez, 2010).

Extracción y desinfección de los embriones de maíz. Se obtuvieron los embriones de maíz chalqueño por disección manual, usando una navaja de un solo filo, y retirando los restos de testa. Se almacenaron a 4°C en un frasco cerrado hasta su utilización. Previo a la germinación se pesó aproximadamente 1 g de embriones y se lavó, en condiciones de esterilidad, con una solución de hipoclorito de sodio al 2.0% por 1 min, se colocaron en un papel filtro estéril para después ser enjuagados en agua estéril desionizada por 1 min, colocándolos nuevamente en papel filtro estéril.

Germinación. Se colocaron los embriones control en cajas Petri con Agar al 1.0%, se incubaron por 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h a 29°C en oscuridad en la incubadora Incubator Lab-Line. Para el caso de los embriones inoculados con alguno de los hongos, se repite el procedimiento previamente descrito, con la excepción de que cada uno de los embriones fueron inoculados con 10 μL de la suspensión de conidios calibrada anteriormente, por lo que la concentración final de conidios en los embriones fue de 60,000 y 40,000 para los embriones infectados con *Fusarium* y *Trichoderma*, respectivamente.

Pasado el tiempo de germinación, se fotografiaron los embriones con la cámara de un celular BlackBerry 9800 de 5.0 Megapíxeles y se llevaron a cabo las pruebas que a continuación se describen; finalmente fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

VII.3 Métodos

VII.3.1 Tinción azul algodón lactofenol

FUNDAMENTO. El fenol es un fungicida que al estar combinado con el ácido láctico permite la conservación de las estructuras propias del hongo, las cuales son teñidas por el colorante azul algodón (Bonifaz, 2010).

TÉCNICA. En un portaobjetos se colocó una gota pequeña del colorante azul algodón lactofenol, sobre ésta se puso una impronta de los hongos a analizar tomada con una cinta adhesiva transparente, cuidando de no generar burbujas. Posteriormente se tapó con un cubreobjetos que se fijó con barniz transparente. Y se procedió a observar al microscopio con un objetivo de 100X.

VII.3.2 Porcentaje de germinación.

Se evaluó el porcentaje de germinación, considerando como embrión germinado aquel en el que la radícula alcanzó 2 mm.

VII.3.3 Acumulación de peso húmedo.

Se pesaron todos los embriones al final del tiempo de germinación. Al valor obtenido se le restó el que había sido registrado inicialmente. Al dividir esa diferencia entre el número de embriones y multiplicar por 100, se obtuvo el porcentaje de acumulación de peso húmedo por embrión.

VII.3.4 Extracción de GA, auxinas y ABA

La extracción se realizó de acuerdo a la bibliografía (Pan, 2008) con las modificaciones hechas por Luna-Loaiza (comunicación personal), quedando el protocolo como sigue. Se pulverizó 1 g de embriones con nitrógeno líquido en mortero. Después se añadieron 6 mL de 1-propanol : H₂O : HCl concentrado (2 : 1 : 0.002 v/v), se tomó la mezcla y se depositó en tubos falcón de 15 mL, los cuales se agitaron por 30 min a 4°C. Concluido este tiempo se agregaron 10 mL de CH₂Cl₂ y se agitaron nuevamente 30 min a 4°C. Al término de este tiempo se formaron dos fases divididas por una capa de tejido vegetal. Con una pipeta de plástico se retiró la fase superior junto con el material vegetal. Posteriormente, se centrifugó el líquido restante a 13,000 rpm por 5 min a 4°C en una centrifuga Sorvall® RC5B. Nuevamente se observaron las dos fases y una capa más fina de material vegetal. Si aún se observaba material vegetal se centrifugaba según se mencionó anteriormente. Se tomó la fase inferior (fase orgánica) y se depositó en viales color ámbar que fueron almacenados a -80°C. Se procedió a dejar a sequedad en un rotavapor IKA® RV10 C S99 a una temperatura de 45°C, con una velocidad de 80 rpm, aproximadamente durante 15 min, y nuevamente se almacenó a -80°C.

VII.3.5 Determinación de la concentración de GA₃ e IAA por medio de HPLC.

FUNDAMENTO. El HPLC es una técnica de separación en el que un pequeño volumen de una muestra líquida, o fase móvil, se desplaza sobre una columna llena de partículas de 3 a 5 micras de diámetro, llamada fase estacionaria, con la presión que aplica una bomba. Los compuestos que se unen débilmente a la fase estacionaria se moverán con rapidez y serán detectados a la salida por un dispositivo de flujo (detector), aquellos compuestos que se unen fuertemente requerirán más tiempo antes de salir. Como resultado de ello se obtiene un cromatograma que puede ser analizado de manera cuantitativa (Skoog, 2001).

TÉCNICA. Se solubilizó el concentrado de la muestra mencionado en el apartado VII.3.4 en 900 µL de metanol y posteriormente se filtraron en MILLEX®-GV PVDF de 0.2 µm de diámetro para eliminar las impurezas que pudieran estar presentes. Se tomaron 200 µL de esta solución y se colocaron en un inserto que se adapta dentro del vial, se programó al

equipo para que inyectara 20 μL de estos en una columna C_{18} Hibar® 150-4,6 Purospher® STAR/RP-18 para realizar la separación de los componentes y su detección. El equipo utilizado fue un HPLC SHIMADZU® (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU® acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LC solution.

Se corrió la muestra utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/ H_2O (24:76) con un flujo constante de 1 mL/min. De cada tratamiento se realizaron tres réplicas, obteniéndose en total tres cromatogramas en el cual se identificaron los picos de cada uno de los compuestos tomando en cuenta su tiempo de retención (ver tabla 3, condiciones establecidas por Luna-Loaiza, comunicación personal). Los cromatogramas obtenidos para los estándares internos y algunas de las muestras se encuentran en el Apéndice 1.

Con los valores del área bajo la curva y la curva patrón para cada una de las hormonas se obtuvo la concentración de hormona en la muestra. La descripción de los cálculos que se realizaron para obtener la concentración de cada hormona se encuentran en el Apéndice 2.

Tabla 3. Tiempos de retención (t_R) de GA, IAA y ABA

Hormona	Espectro	t_R (aproximado)
GA	205 nm	10.75 min (10.5 – 11.5 min)
IAA	259 nm	8.8 min (8.75 – 9.25 min)
ABA	259 nm	3.9 min (3.8 - 4.1 min)

VII.3.6 Determinación de la concentración de ABA por un ensayo de ELISA competitivo.

FUNDAMENTO. Se utilizó el método de detección mediante anticuerpos monoclonales. El ensayo para detección tiene unido al anticuerpo anti-ABA en el fondo del pozo de una microplaca, al cual se le añade la muestra y una solución que contiene una cantidad conocida de un rastreador, el cual está compuesto del complejo ABA-fosfatasa alcalina. Una vez que las dos soluciones entran en contacto con el anticuerpo tanto el ABA de la muestra como el ABA-fosfatasa alcalina se unen a este. Se lava el pozo para eliminar lo no unido y se añade una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina. Entre mayor cantidad de ABA en la muestra menor actividad de fosfatasa alcalina, por lo que la intensidad del color amarillo que presenta el pozo se encuentra relacionada de manera inversa con la concentración de ABA en la muestra (Número de catálogo: PDK 09347/0096 Agdia Incorporated, Elkhart, Indiana, EU).

Preparación del estándar. El kit contiene un estándar de ABA, a partir del cual se hacen diluciones para tener 1000, 100, 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 y 0 pmoles de ABA/mL. De cada solución estándar se agregaron 100 μL al pozo de la microplaca, posteriormente se añadieron 100 μL de la solución rastreadora (ABA-fosfatasa alcalina) y se incubó a 4°C por 3 horas. Después se realizaron 3 lavados con Buffer PBST 1X (Amortiguador Fosfato Salino con detergente Tween-20). Por último se agregaron 200 μL de la solución sustrato de PNP (Purina nucleósido fosforilasa) y se incubó 1 h a 37°C. Se procedió a leer el valor de absorbancia a 405 nm. Los cálculos realizados se encuentran en el Apéndice 3.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Crecimiento e interacción entre *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Fusarium verticillioides se conoce que es un hongo necrótrofo que ataca al maíz. Se presenta de manera sistémica en los granos, debido a que las hifas se esparcen en el pericarpio célula a célula, colonizando filas de células y creciendo de arriba hacia debajo de la semilla en un patrón radial que puede llevar al desarrollo de síntomas macroscópicos (Duncan y Howard, 2010). Mientras que *Trichoderma* se ha descrito como un género de hongos biótros que coloniza las raíces. Dentro de los beneficios que provee *Trichoderma* están las síntesis de hormonas como las auxinas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), también se ha descrito que el hongo brinda protección contra hongos patógenos induciendo el sistema inmune de la planta (Van Wees *et al.*, 2008) o bien directamente interaccionando con los hongos. Dentro de los mecanismos para combatir a los hongos se encuentran la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de las hifas de varios hongos, o bien tienen contacto físico con las hifas y las parasitan o estrangulan y también reducen el crecimiento de hongos al competir por los nutrientes (Choudhary *et al.*, 2011; Parizi *et al.*, 2012).

Para observar el tipo de crecimiento que producían ambos hongos se sembraron, en el centro de una caja Petri con PDA 1X, 10 µL de la suspensión de 400 conidios de *Trichoderma* o *Fusarium*/µL, una caja para *Trichoderma* y otra para *Fusarium*. Mientras que en una tercera caja se colocaron 10 µL de conidios de *Trichoderma* y a 4 cm de éste 10 µL de conidios de *Fusarium* (cultivo dual). Se mantuvieron las cajas en oscuridad a temperatura ambiente durante seis días, monitoreando el crecimiento cada día (Figura 13).

Fusarium verticillioides creció como una colonia con numerosas hifas blancas, desde el inicio aparece un pigmento naranja en la base de la colonia consecuencia de la formación de esporodoquios (Bonifaz, 2010) y a partir del quinto día se torna púrpura (conidios maduros), el halo de crecimiento alcanzó, para el sexto día, 6.3 cm de diámetro. Por su parte, *Trichoderma asperellum* creció rápidamente, hifas blancas y finas en un principio y a partir del cuarto día se tornan de color verde oscuro, producto de la conidación (López *et al.*, 2004). Desde el día 5 el halo de crecimiento ocupa todo el diámetro de la caja Petri, 10 cm.

Días post-inoculación	2	3	4	5	6
<i>Fusarium verticillioides</i>					
<i>Trichoderma asperellum</i>					
Ambos					

Figura 13.- Crecimiento individual o en cultivo dual de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

Se muestran los crecimientos de los hongos a lo largo de 6 días en PDA 1X. Se agregaron 10 μL a una concentración de 4,000 conidios/ μL en todos los casos.

Se ha descrito al género *Trichoderma* como capaz de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, y en este caso al realizar el cultivo dual de *T. asperellum* y *F. verticillioides* se observó una clara reducción en el crecimiento de *Fusarium* (Figura 13). Debido a que *Trichoderma* es un hongo de rápido crecimiento, compite eficientemente por el espacio y los nutrientes. Por lo que la carencia de nutrientes es la causa común de muerte de los microorganismos cercanos a *Trichoderma* (Parizi *et al.*, 2012).

Entre el crecimiento de ambos hongos hay una franja denominada “zona de interacción” donde el color blanco de *T. asperellum* se torna amarillo, color más acentuado en el sexto día de crecimiento, mismo donde se observó que existían hifas de *F. verticillioides*.

Se tomaron improntas de la zona de interacción, así como de los hongos individuales, y se tiñeron con azul de algodón lactofenol, técnica específica para teñir hongos (Bonifaz, 2010). Posteriormente se observaron al microscopio óptico y con el objetivo de 100X.

Las improntas de *Fusarium verticillioides* mostraron hifas tabicadas, así como macroconidios fusiformes de 3-5 septos en forma de luna creciente (Figura 14A) y microconidios solos o en grupo (Figura 14B). Las improntas de *Trichoderma asperellum* muestran conidios unicelulares y transparentes que pueden mantenerse agrupados. Las fiálides, estructuras en forma de botella, presentan grupos de conidios (Figura 14C-E).

En la zona de interacción, se observó claramente que las hifas de *Trichoderma asperellum* (las más delgadas) se enroscan varias veces alrededor de las hifas de *Fusarium verticillioides* (Figura 14F-I). La obvia interacción del enrollamiento de hifas es una de las formas en las que *Trichoderma* colapsa o estrangula al hongo blanco, al patógeno (Parizi *et al.*, 2012).

Los resultados nos muestran las características de ambos hongos y como *Trichoderma asperellum* si es un hongo que interactúa negativamente con el hongo *Fusarium verticillioides*, por lo que los efectos que producirían en maíz serían distintos y nos permitirían comparar los efectos hormonales producidos al colonizar a los embriones de maíz.

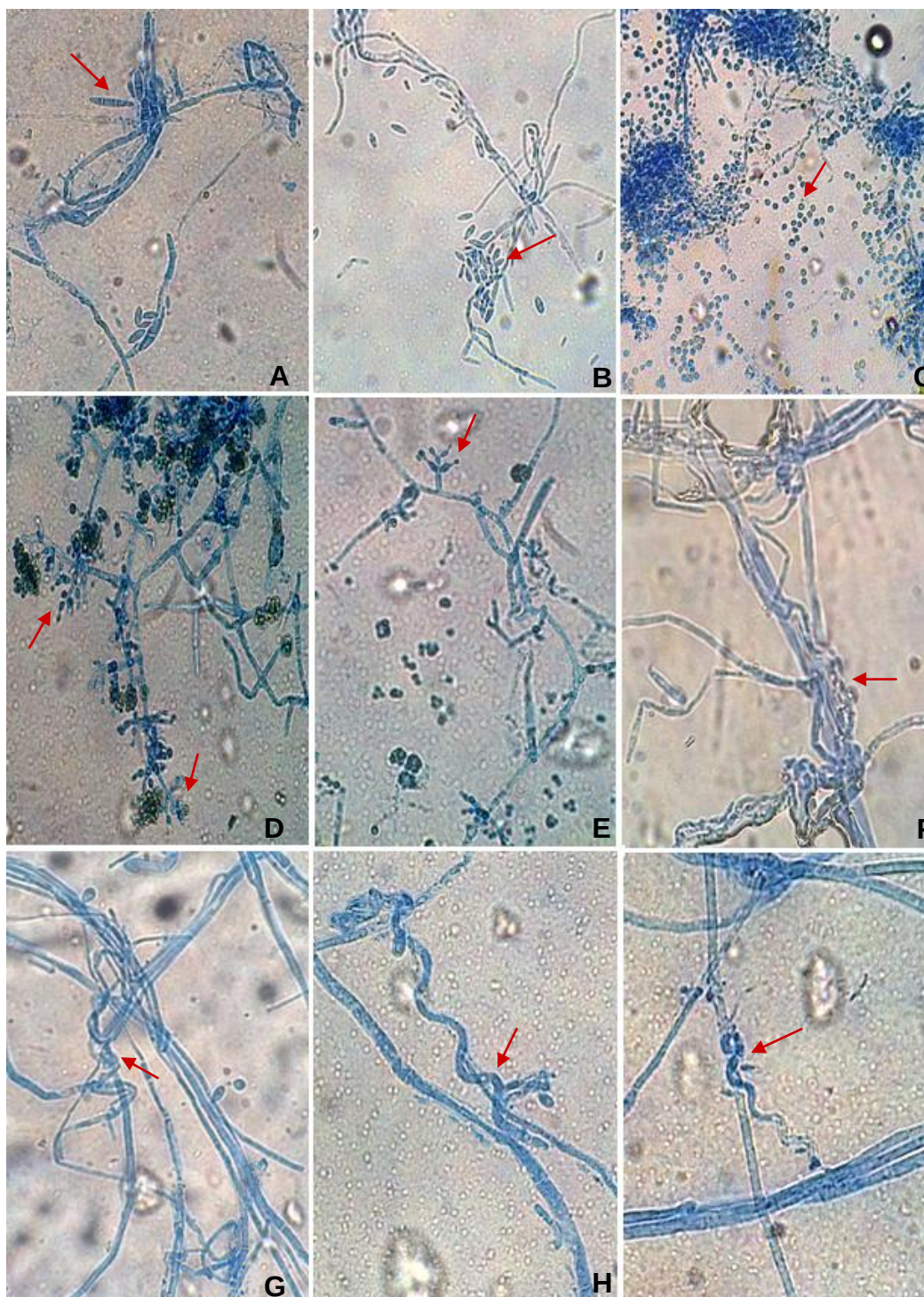


Figura 14.- Fotografías microscópicas de los hongos *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides* teñidos con azul algodón lactofenol (100X). Las flechas indican la presencia de: (A) Macroconidios y (B) microconidios de *Fusarium verticillioides*. (C) Microconidios y (D, E) conidióforos de *Trichoderma asperellum*. (F-I) Interacción microscópica entre *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*.

VIII.2 Efectos fisiológicos de *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum* sobre los embriones de maíz.

Para determinar los cambios fisiológicos que cada uno de los hongos producía en los embriones de maíz, se infectaron 1 g de embriones con una suspensión de conidios del hongo. En el caso de *Fusarium verticillioides* se añadieron a cada embrión 10 μL de una suspensión de 6000 conidios/ μL , concentración de embriones que en un estudio previo se determinó como óptima para producir síntomas en el embrión pero sin llegarlo a matar antes de las 36 h de germinación (Guzmán-Chávez, 2010). En la Figura 15 se muestra el progreso de la infección a diferentes tiempos de la germinación (8, 12, 18, 24, 36 y 48 h) por duplicado y un grupo control (grupo no infectado).

El micelio aéreo de color blanco, característico de este género, comenzó a observarse a partir de las 24 h de germinación de los embriones con el hongo, sobre todo en los embriones en los que la radícula no había emergido. Los embriones comienzan a tonarse café oscuro a las 8 h hasta alcanzar una coloración morada a las 36 h, coloración típica del hongo. A las 48 ya hay un abundante micelio aéreo.

La consistencia del tejido embrionario pierde su dureza a partir de las 36 h, pero se acentúa a las 48 h, ya que el embrión se deshace.

La longitud de la radícula y el porcentaje de germinación se reducen a causa de la infección con *Fusarium verticillioides* a las 48 h. Aunque en casi todos los tiempos el porcentaje de germinación es menor con respecto al control, se observa que algunos embriones llegan a llevar a cabo la elongación de la radícula, alcanzando longitudes similares a las del grupo que no fue infectado con el hongo.

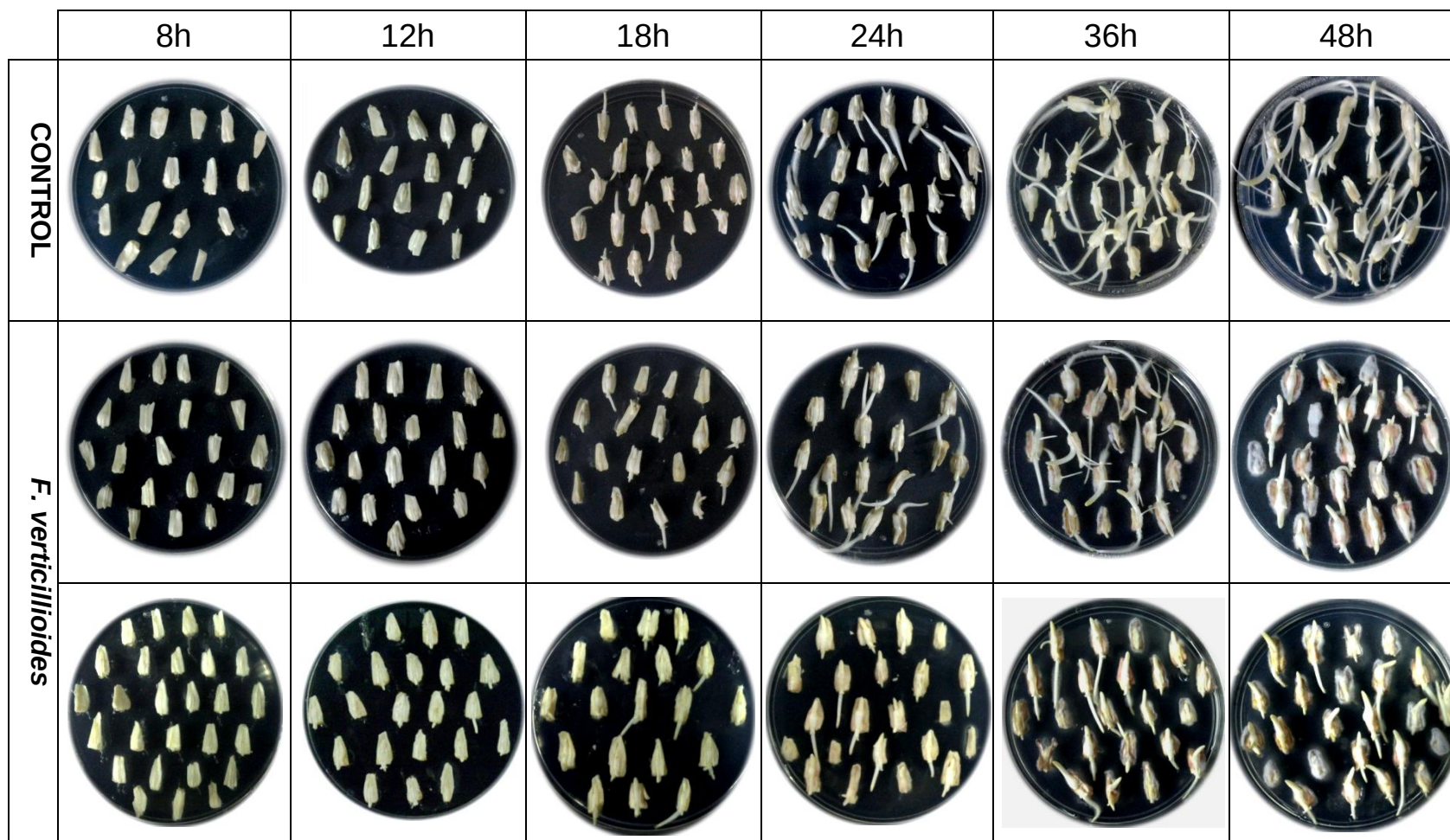


Figura 15.- Efecto de *Fusarium verticillioides* en la germinación y crecimiento radicular de embriones de maíz. Cada una de las cajas Petri contuvo 1 g de embriones de maíz.

Para la infección de los embriones con *Trichoderma* se tuvo que determinar cuál era la concentración óptima para mantener a los embriones viables y germinando, concentración que seguramente era diferente a la de *Fusarium* ya que su crecimiento es más rápido que esté último. Por lo que se germinaron embriones de maíz a 29°C en condiciones de oscuridad, inoculados con 10 µL de una suspensión de conidios de *T. asperellum*, probando las concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1,000 conidios/µL. Se registró el efecto del hongo sobre los embriones a las 24 y 48 h después de la inoculación (Figura 16).

A las 24 h, los embriones inoculados con las concentraciones de 400 y 600 conidios/µL tienen el mayor número de embriones germinados y la longitud de la radícula es más grande que a otras concentraciones de *T. asperellum*. Además a las 48 h sólo en la concentración de 400 conidios/µL la radícula continúa creciendo a pesar de la presencia del hongo (Figura 16).

Debido a estas observaciones y con el objetivo de encontrar los cambios hormonales en el embrión de maíz una vez que se encuentra presente *Trichoderma asperellum*, se procedió a utilizar la suspensión con la concentración de 400 conidios/µL. Se germinó 1 g de embriones infectados con *Trichoderma asperellum* por 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h (Figura 17). El micelio de color blanco de *Trichoderma asperellum* se observa hasta las 48 h con ligeros tonos en verde, esta tonalidad coincide con el cambio de color a amarillo del embrión.

La longitud de la radícula y el porcentaje de germinación es similar entre los controles y los inoculados con *Trichoderma asperellum*, excepto al tiempo de las 48 h en donde se reduce. Una característica de la radícula en los embriones germinados con *Trichoderma asperellum* es que tiende a penetrar el agar.

La germinación de la semilla es un proceso crucial en el ciclo de vida de las plantas, pues determina su inserción en el ecosistema agrícola de manera natural, siendo la base para la producción de cultivos. Aunque se ha observado que hay algunos factores externos tal como la temperatura, la exposición a la luz o la infección de patógenos que pueden modificar el curso normal de inicio y término de la germinación (Wetbrecht *et al.*, 2011).

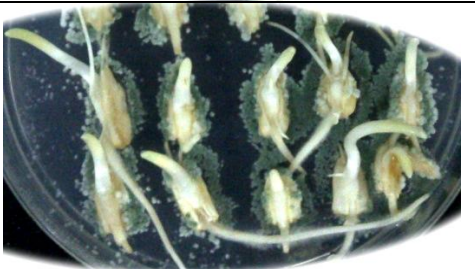
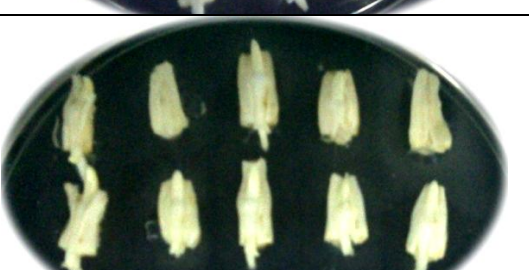
Conidios/ μL	Tiempo de germinación (h)	
	24	48
200		
400		
600		
800		
1000		

Figura 16.- Embriones de maíz inoculados a diferentes concentraciones de *Trichoderma asperellum*. En la figura se muestran diez embriones que fueron inoculados con 10 μL de una suspensión de *Trichoderma asperellum* a diferentes concentraciones. Se indica en la parte superior el tiempo de germinación de los embriones de maíz.

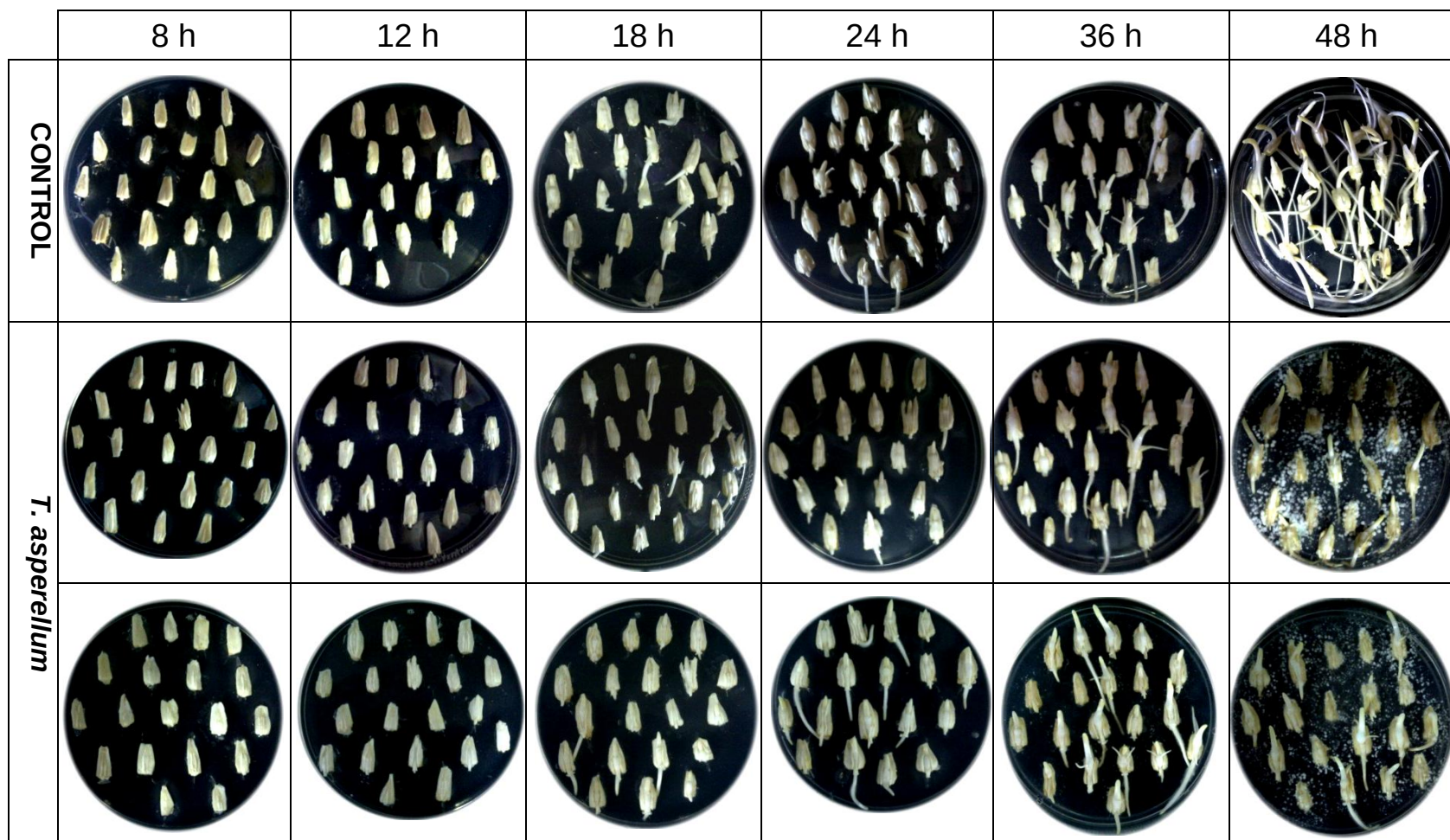


Figura 17.- Efecto de *Trichoderma asperellum* en la germinación de embriones de maíz. Cada una de las cajas Petri contuvo 1g de embriones de maíz.

La cuantificación de los cambios en el porcentaje de germinación en presencia o ausencia de los hongos nos evidenció que a pesar de la presencia de cualquiera de los hongos los embriones alcanzaron entre 80 a 100% de germinación y con perfiles similares (Figura 16). Lo anterior es indicativo de que las concentraciones de conidios utilizadas en estos ensayos permitirán observar las diferencias en la producción de hormonas entre los diferentes tratamientos realizados.

Aunque similares en % de germinación observamos que la infección con *Fusarium verticillioides* disminuye ligeramente el porcentaje de germinación respecto al control. Mientras que los embriones germinados con *Trichoderma asperellum* no modifican el porcentaje de germinación, excepto al tiempo de 48 h en el que es ligeramente menor que los embriones sin infectar (Figura 18).

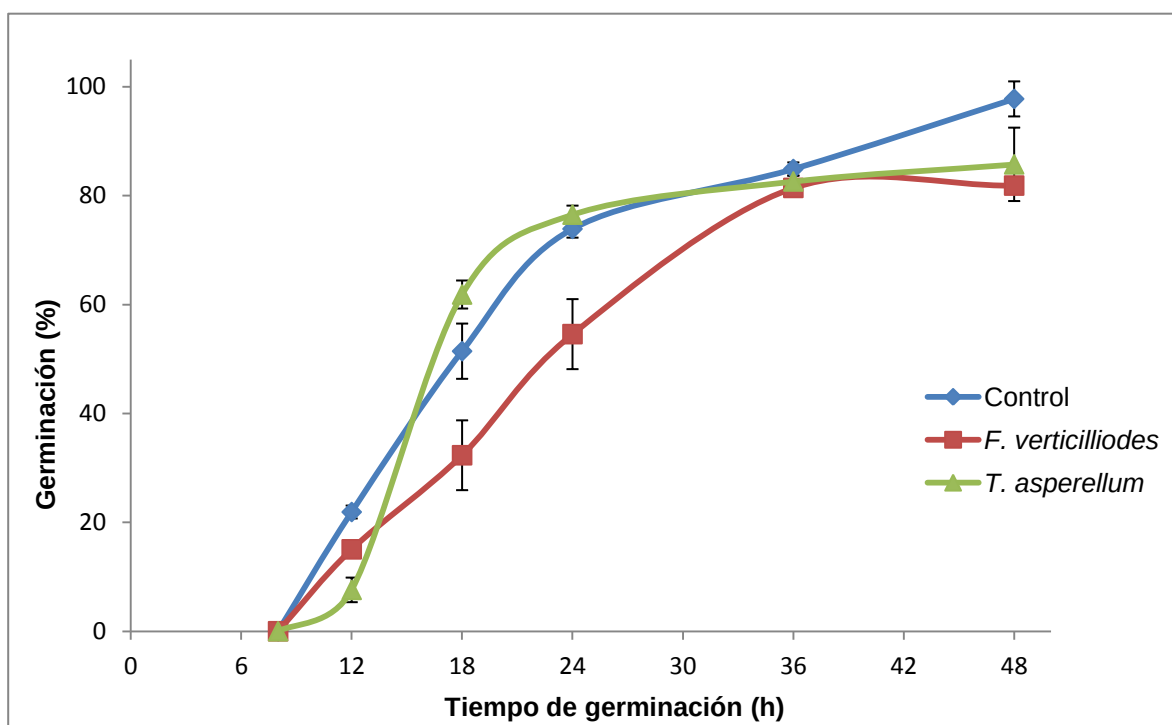


Figura 18.- Porcentaje de germinación de embriones de maíz tratados con *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum*. Datos expresados como medias $\pm$ desviación estándar por duplicado de 1 g de embriones cada una.

Para determinar en qué fase de la germinación ocurrían los cambios en el contenido de hormonas, se determinó la curva de acumulación de peso húmedo (Figura 19). La ganancia de toma de agua de los embriones de maíz describe las 3 fases características observadas en semillas (Bewley y Black, 1995; Bove *et al.*, 2001).

De las 0 a las 8 h la toma de agua es alta y se debe principalmente a la hidratación de los componentes celulares (Manz *et al.*, 2005). La fase II o estacionaria la encontramos en los embriones alrededor de las 8 a las 36 h de germinación, la ganancia de agua es menor ya que el tejido sigue tomando agua pero ahora de una manera más controlada, se ha sugerido que en esta fase las acuaporinas participan activamente transportando agua (Wetbrecht *et al.*, 2011). Después de la salida de la radícula ocurre una toma de agua acelerada (después de las 36 h), la cual converge con el tiempo en el que la radícula se elonga y aparece el coleóptilo está es la fase III y corresponde al estadio post-germinativo (Bove *et al.*, 2001; Wetbrecht *et al.*, 2011).

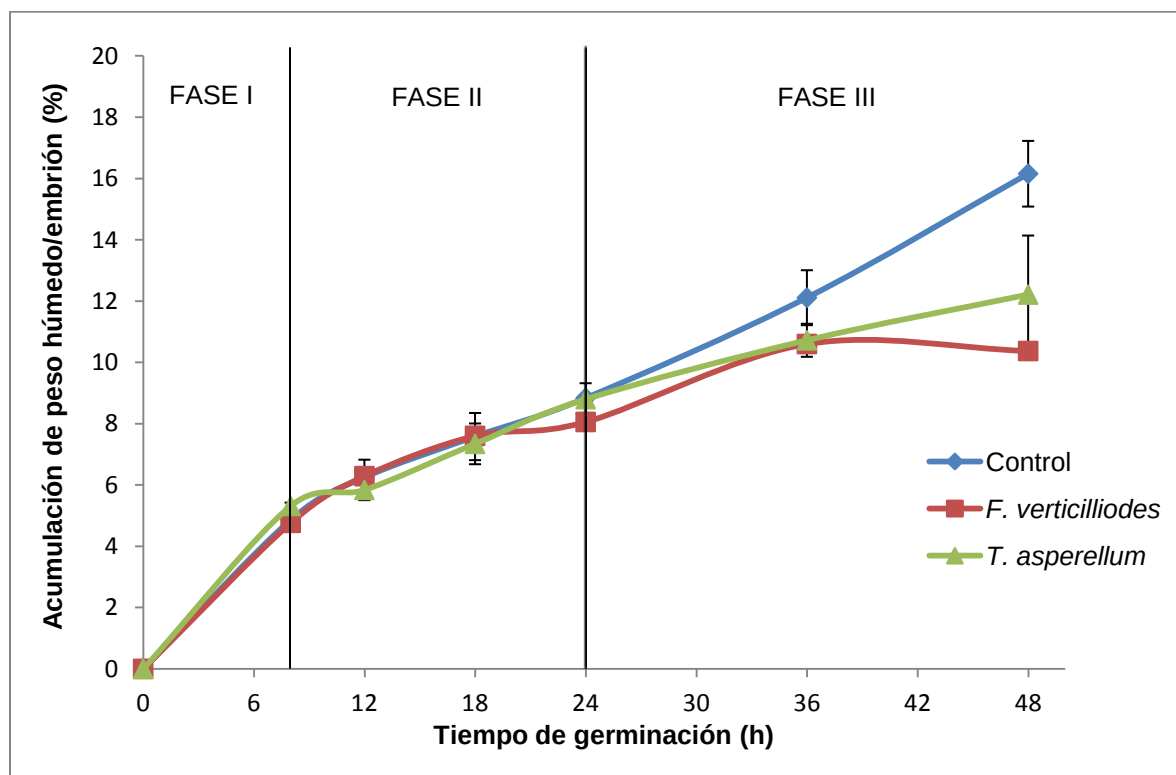


Figura 19.- Acumulación de peso húmedo de los embriones de maíz germinados en presencia de *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Se indican las tres fases de la germinación. Datos expresados en medias $\pm$ desviación estándar, n=2.

En cuanto a la acumulación de peso húmedo por el embrión infectado con cualquiera de los hongos se modificó solamente durante la Fase III, a las 36 h la diferencia entre los embriones infectados con *Trichoderma asperellum* y sin infectar es del 4%, mientras que los embriones infectados con *Fusarium verticillioides* acumulan 6% menos agua que los embriones no infectados.

VIII.3 Detección de los cambios hormonales producidos por la interacción de *Fusarium verticillioides* o *Trichoderma asperellum* y los embriones de maíz.

De manera natural las semillas denominadas ortodoxas² contienen un contenido de ABA alto que le permite mantenerse por un tiempo prolongado en el almacén y no germinar. Cuando la semilla se hidrata comienza el proceso germinativo y comienza la degradación de ABA y además se activa la síntesis de GA₃, la hormona antagonista, ambos sucesos se reconoce que son necesarios para que la germinación proceda (Footitt *et al.*, 2011; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Al analizar el contenido de ABA en los embriones, se encontró que efectivamente conforme transcurre la germinación el nivel de ABA disminuye (Figura 20). Sin embargo, la infección de los embriones con *Fusarium verticillioides* reduce escasamente su contenido (de 14 pmoles/g a 7.8 pmoles/g, a las 0 y 48 h, respectivamente). Contrario a lo que ocurre con la infección con *Trichoderma asperellum* que muestra un perfil similar de disminución en el contenido de ABA al avanzar el tiempo de germinación alcanzando un nivel aún menor que los encontrados en los embriones sin infectar (Figura 18).

Se ha documentado que *Trichoderma* es un hongo que no sintetiza y que tampoco induce la síntesis de ABA por la planta, y con los resultados de este trabajo mostramos que tampoco interfiere en su degradación, ya que se reduce el nivel de ABA conforme transcurre el tiempo de germinación de manera muy similar a los embriones sin infectar (Sofo *et al.*, 2011).

² Semillas ortodoxas: son semillas susceptibles de almacenarse por largos periodos de tiempo, pasan por una etapa de deshidratación y de completa inhibición del metabolismo, por lo cual su tasa respiratoria es mínima.

Mientras que *Fusarium verticillioides* parece interferir en su degradación ya que la concentración de ABA se mantiene a niveles altos y por todo el periodo analizado. Sin embargo, no podemos descartar que también se esté sintetizando y lo que detectamos sea el balance entre la síntesis y la degradación. La degradación de ABA se lleva a cabo a través de la actividad de la ABA 8'-hidroxilasa, enzima que se sintetiza al colocar en agua a la semilla, el estrés oxidativo generado en forma de peróxido está relacionado con su síntesis. La expresión del gen de la ABA 8'-hidroxilasa podría ser un blanco de los elicitores de *Fusarium verticillioides*, disminuir su síntesis para inducir la permanencia de ABA, ya que el hongo es incapaz de sintetizar ABA (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

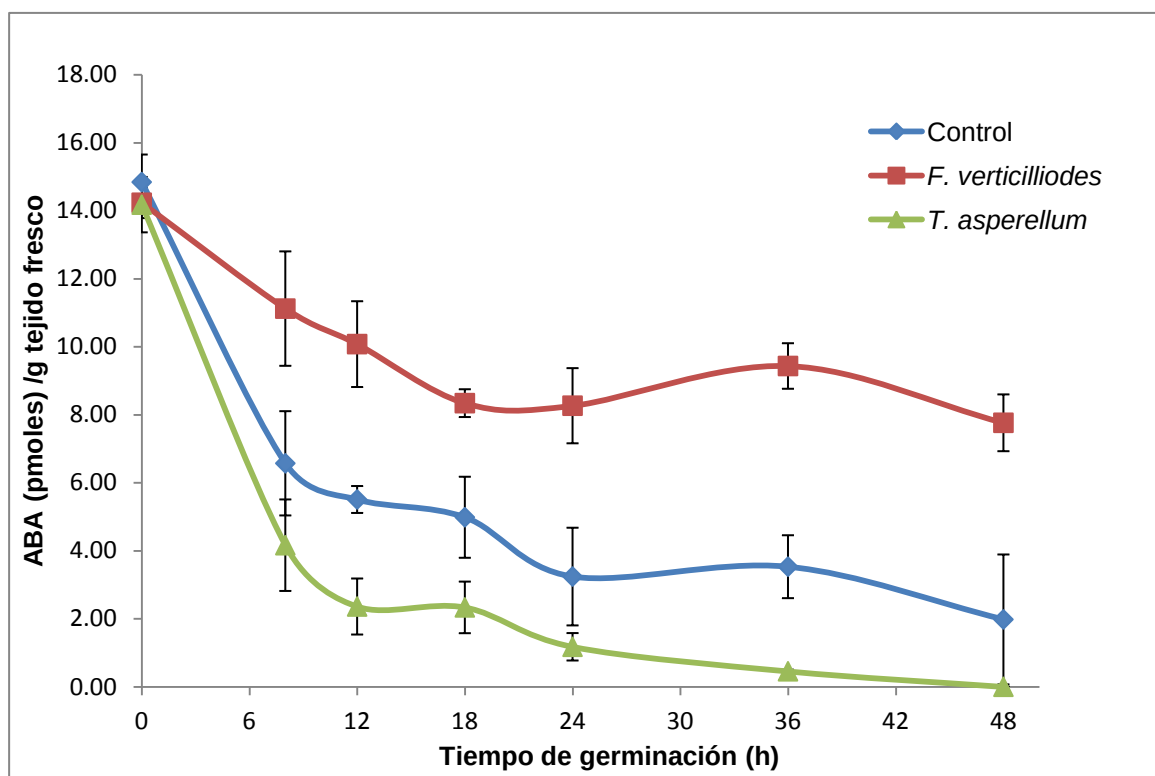


Figura 20.- Comparación en el contenido de ABA de embriones de maíz inoculados con *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. La concentración de ABA se obtuvo de la detección mediante anticuerpos monoclonales descrita en *Materiales y métodos*. El grupo control se refiere a los embriones que no fueron inoculados. Se adicionaron 10 μ L de una suspensión de 400 conidios de *Trichoderma asperellum*/ μ L o 10 μ L de una suspensión una suspensión de 6000 conidios de *Fusarium verticillioides* / μ L. Datos expresados en medias $\pm$ desviación estándar, n=2.

El papel de ABA durante la patogénesis es controversial ya que aunque algunos autores han determinado que altas concentraciones de ABA aumentan las defensas de la planta contra patógenos. Otros autores, han encontrado que ABA hace más susceptible a la planta de enfermarse (Bari y Jones, 2009; Berrocal-Lobo y Molina, 2008). En los embriones de maíz parece no ayudar ya que el embrión se reblandece y al final muere.

VIII.4 Concentración de GA₃

Se encontró que conforme avanza la germinación hay un incremento en los niveles de GA en los embriones (Figura 21). Resultado esperado, ya al aumentar GA promueve el avance de la germinación (Footitt *et al.*, 2011; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

Por su parte, la infección de los embriones con los hongos produjo un perfil similar de aumento de giberélico y con un máximo a las 36 h, aunque el contenido de giberélico alcanzado en los embriones infectados fue mayor. Los niveles de giberélico en los embriones germinados con *Trichoderma asperellum* son similares hasta las 18 h de germinación, a las 24 h es cerca de 2 veces más que en los embriones control, y a las 36 h el nivel de GA en los embriones con *Trichoderma asperellum* sigue alto, 1.7 veces más que los embriones control.

Por su parte *Fusarium verticillioides* mantiene un perfil similar de GA en los embriones sin hongo hasta las 12 h de germinación, pero a las 24 h es 3 veces más alto que los embriones control y continua aumentando a las 36 h, después hay una caída en el contenido de giberélico hasta ser menor que en los embriones control.

En la fase reproductiva sexual o teleomorfo de *Fusarium verticillioides* el hongo es llamado *Gibberella moniliforme*, hongo que principalmente ataca a maíz, pero también al arroz y la caña de azúcar. Los miembros de esta especie producen una gran variedad de micotoxinas y otros metabolitos secundarios como las moliniforminas, ácido fusárico, beauvericina, fumonisinas, bikaverina y GA (Desjardins, 2003). Lo anterior explica el aumento en el contenido de GA al infectar al embrión con *Fusarium verticillioides*, el hongo se encuentra en otra fase y produce GA.

En el caso de *Trichoderma* no se tienen reportes de que sintetice giberélico, pero sí de que induce la síntesis de GA en la célula vegetal, aunque el mecanismo no se ha dilucidado (Sofa *et al.*, 2011).

El papel de GA en la semilla es estimular el crecimiento. Mutantes que sobreexpresan a la enzima clave en la síntesis de GA, la GA20ox en *Arabidopsis* produjo plantas con elevadas concentraciones de GAs bioactivas, con efectos en varios aspectos del desarrollo, como son reducción de la dormancia, hipocótilos largos, hojas verde pálido y floración temprana (Hedden y Phillips, 2000). En la patogénesis las GA se han relacionado con influir positivamente en la vía del ácido salicílico y promover la resistencia a microorganismos biótrofos y la sensibilidad a organismos necrótrofos. *Fusarium* es un microorganismo necrótrofo por lo que el aumento de GA no promovería la resistencia de la planta, sino más bien su susceptibilidad (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

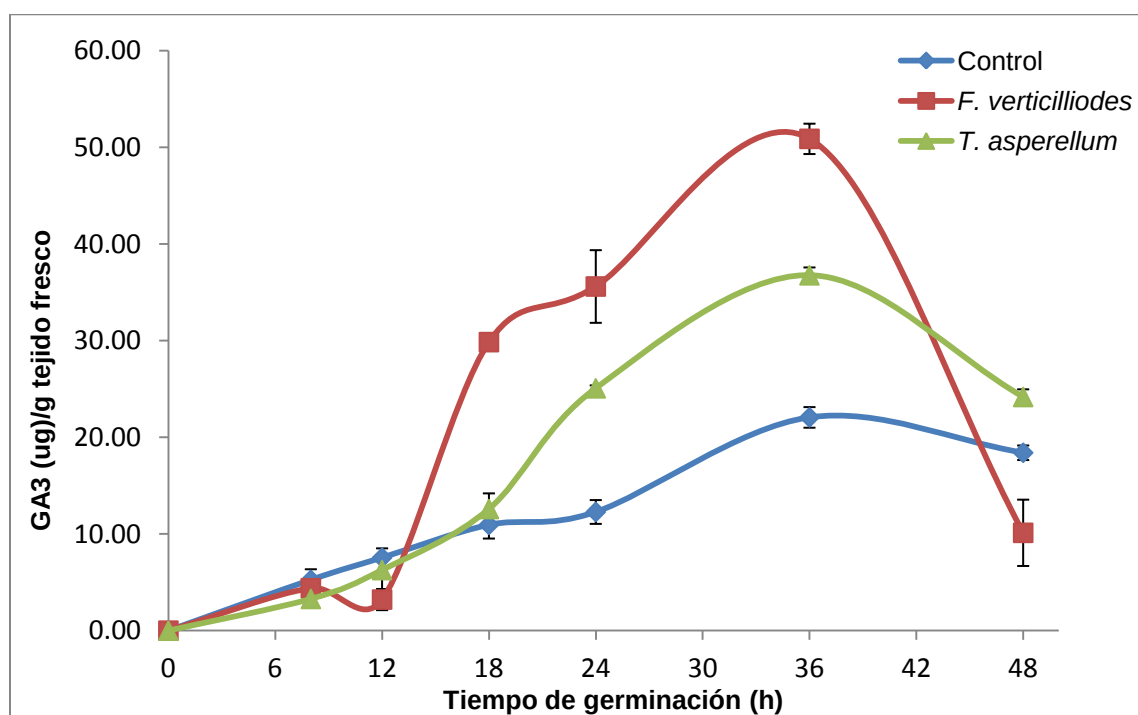


Figura 21.- Niveles de GA₃ en embriones de maíz germinados en ausencia y presencia de *Fusarium* y *Trichoderma*. La determinación de los niveles de ABA se realizó mediante la técnica de HPLC, los cromatogramas obtenidos tanto de las muestras como del estándar se encuentran en el apéndice. Datos expresados en medias $\pm$ desviación estándar, n=6. Se realizó la determinación en dos lotes de 1g de embriones germinados cada uno, y la detección en HPLC de cada lote se hizo por triplicado.

VIII.5 Concentración de IAA

Durante la germinación, el crecimiento de la radícula es una consecuencia de la elongación celular, relacionada con el contenido de IAA (Teale *et al.*, 2006). El perfil de contenido de IAA en los embriones de maíz es complejo con una tendencia a reducir su contenido conforme avanza la germinación, excepto que a las 12 h se presenta un aumento (Figura 22). Cabe mencionar que es a ese tiempo en donde se empieza a observar la salida de la radícula en algunos de los embriones y es posible que el aumento en IAA aunado a la reducción de ABA y el comienzo en el incremento en el nivel de GA sean pre-requisito para continuar con la elongación radicular y/o promover que los embriones germinen.

En cuanto a los niveles de IAA en los embriones germinados con *Trichoderma* y *Fusarium* durante la germinación también son complejos pero distintos a los embriones sin infectar. Con el hongo patógeno, los niveles de IAA en los embriones comienzan a declinar a las 8 h pero después se incrementan alcanzando niveles superiores a los encontrados en los embriones sin hongo, si bien después de las 24 se reducen hasta llegar a niveles no detectables.

En cuanto a *Trichoderma asperellum*, se observa que hay un aumento en la síntesis de auxinas al inicio de la germinación. Se conoce que *Trichoderma* es un hongo que induce la síntesis en las plantas por lo que el resultado era esperado (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Hermosa *et al.*, 2012). A pesar de que en algunos tiempos comienza a disminuir el nivel de IAA, los niveles nunca alcanzan a ser menores a los encontrados en los embriones sin hongo.

Contrario a las GA, las auxinas se ha propuesto que interaccionan positivamente con las vías de transducción de señal dependientes de JA/ET promoviendo la resistencia a hongos necrótrofos (Robert-Seilantantz *et al.*, 2007). Por lo que si *Trichoderma* se ha propuesto como un hongo biocontrol, el que encontremos que estimula un nivel alto de auxinas podría aumentar sus defensas contra cualquier ataque posterior.

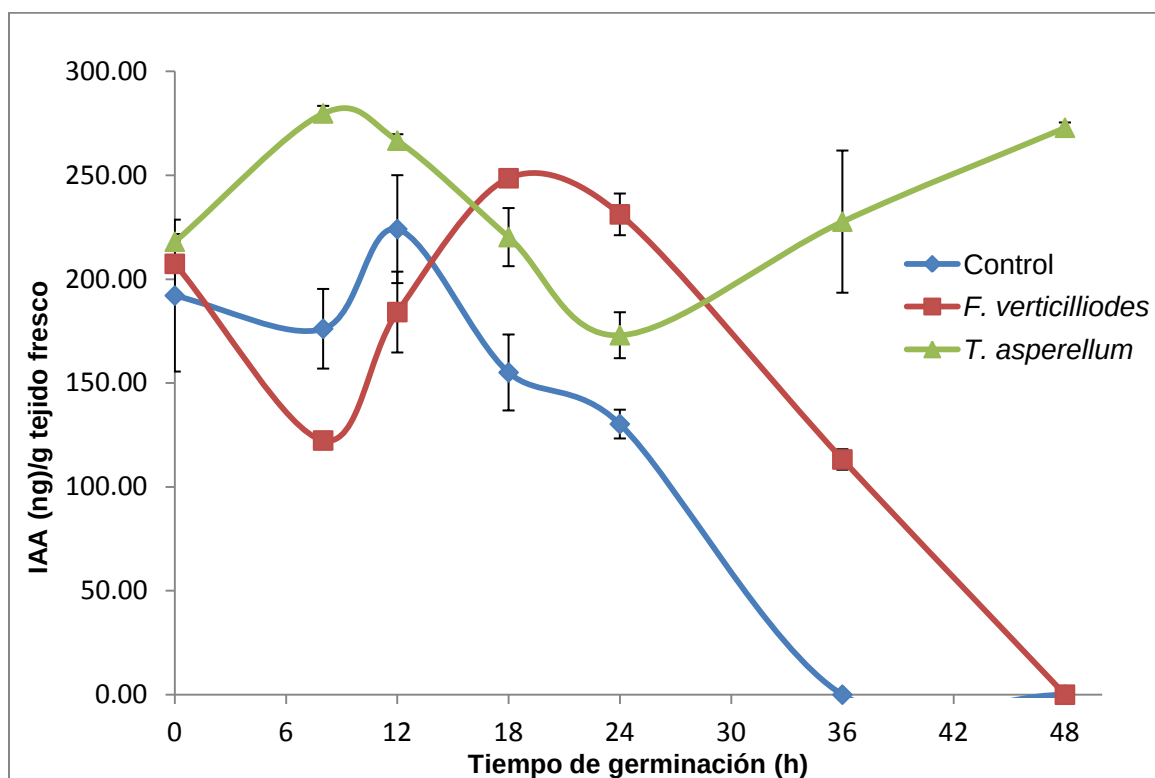


Figura 22.- Curva de concentración de IAA. Se muestran las curvas resultantes de la concentración de IAA para los embriones de maíz que fueron infectados con *Fusarium verticillioides*, inoculados con *Trichoderma asperellum* o que no tuvieron ninguna interacción (grupo control). Datos expresados en medias $\pm$ desviación estándar, $n=6$.

VIII.6 La modificación en los niveles hormonales de ABA, GA e IAA indican si los embriones están frente al ataque de un patógeno o bien alertas para una nueva infección.

Los cambios hormonales debidos a los dos hongos estudiados fueron diferentes (Figuras 23 y 24). *Fusarium verticillioides* mantuvo niveles altos de ABA y de GA, y si bien aumentó los niveles de auxinas se encuentra retrasado en tiempo con relación tanto a los embriones sin infectar (Figura 23), así como con los de *Trichoderma asperellum*. El mantenimiento de un índice alto de ABA/GA en el embrión puede significar una disminución en los eventos germinativos promovidos por el hongo. Además el que también encontremos altos índices de ABA/GA en tiempos previos al aumento de auxinas, hormona que se conoce que promueve

la elongación celular a través de relajar las interacciones en la pared celular, podrían propiciar el continuo avance del hongo a través de las paredes celulares de un embrión con poca actividad metabólica interna. Eventos que serían necesarios para que el hongo continúe colonizando y al final sea exitoso llevando al progreso de la infección y la muerte del embrión.

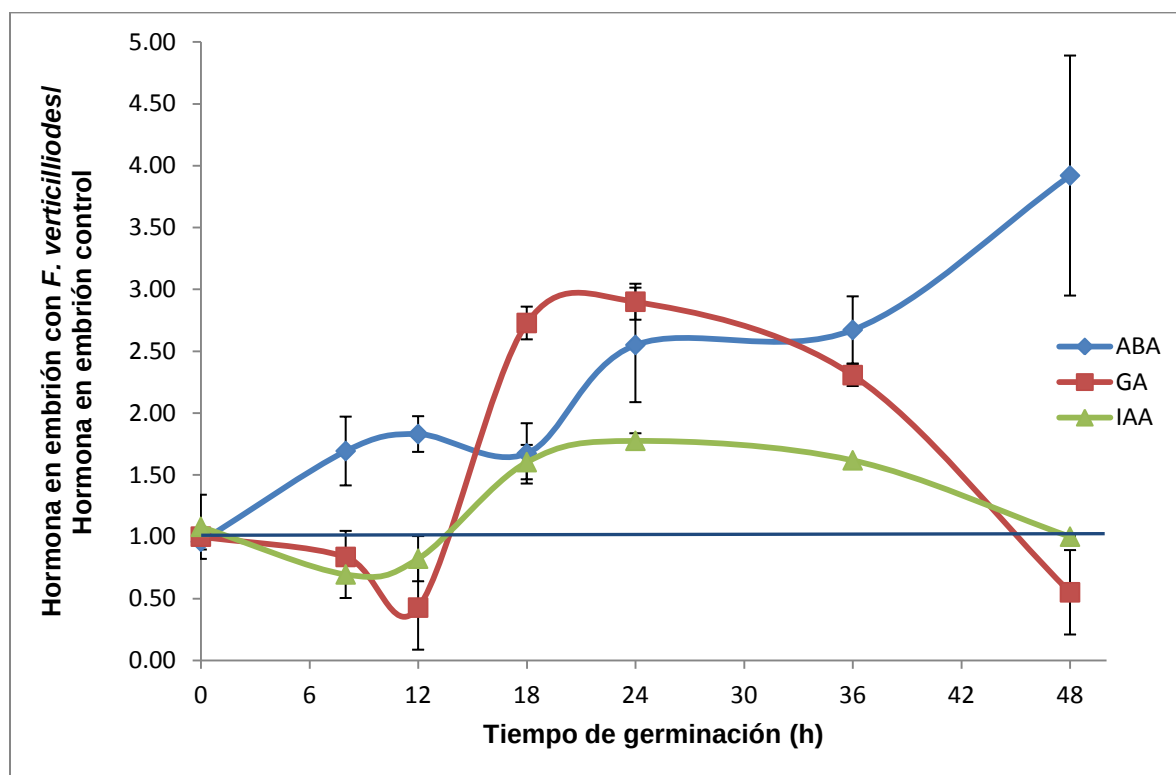


Figura 23. Efecto de *Fusarium verticillioides* en los niveles de ABA, IAA y GA₃. Las curvas se construyeron a partir de los datos de las Figuras 18-20. Se obtuvo el índice entre el contenido de hormonas de los embriones en presencia de *Fusarium* entre el contenido de hormonas de los embriones sin hongo a los diferentes tiempos de germinación de los embriones.

Mientras que *Trichoderma* permite que los eventos de degradación de ABA continúen e incluso promueve una mayor reducción, entonces esto llevaría a un buen índice (bajo) de ABA/GA, promotor de la germinación (Figura 24). En cuanto al contenido de GA, *Trichoderma asperellum* al igual que *Fusarium verticillioides*, no afectó el contenido de GA al inicio de la germinación entre las 12 y 18 h, sin embargo promovieron la síntesis de más GA,

llevando, en el caso de *Trichoderma asperellum*, a alcanzar 2 veces más hormona a las 18 h, mientras que con *Fusarium verticillioides* fue de 3 veces a las 12 h. En relación al nivel de IAA en los embriones, *Trichoderma asperellum* indujo el aumento en su contenido desde el inicio de la germinación. IAA se conoce que puede favorecer el proceso de elongación de la semilla, por lo que su aparición temprana podría promover que la radícula emerja más prontamente y, aunque esto no ocurrió, se observó la aparición temprana del coléctalo y la inmersión de la radícula en el agar, por lo que en general el aumento en IAA promovió el establecimiento de la planta. Es posible que este fenómeno ayude a que evada la infección a otros hongos debido a que ya está más próximo a un estadio con capacidad fotosintética y el aporte de nutrimentos a expensas de sus reservas se reduce y por tanto podría hacer frente a algunos microorganismos por un tiempo mayor.

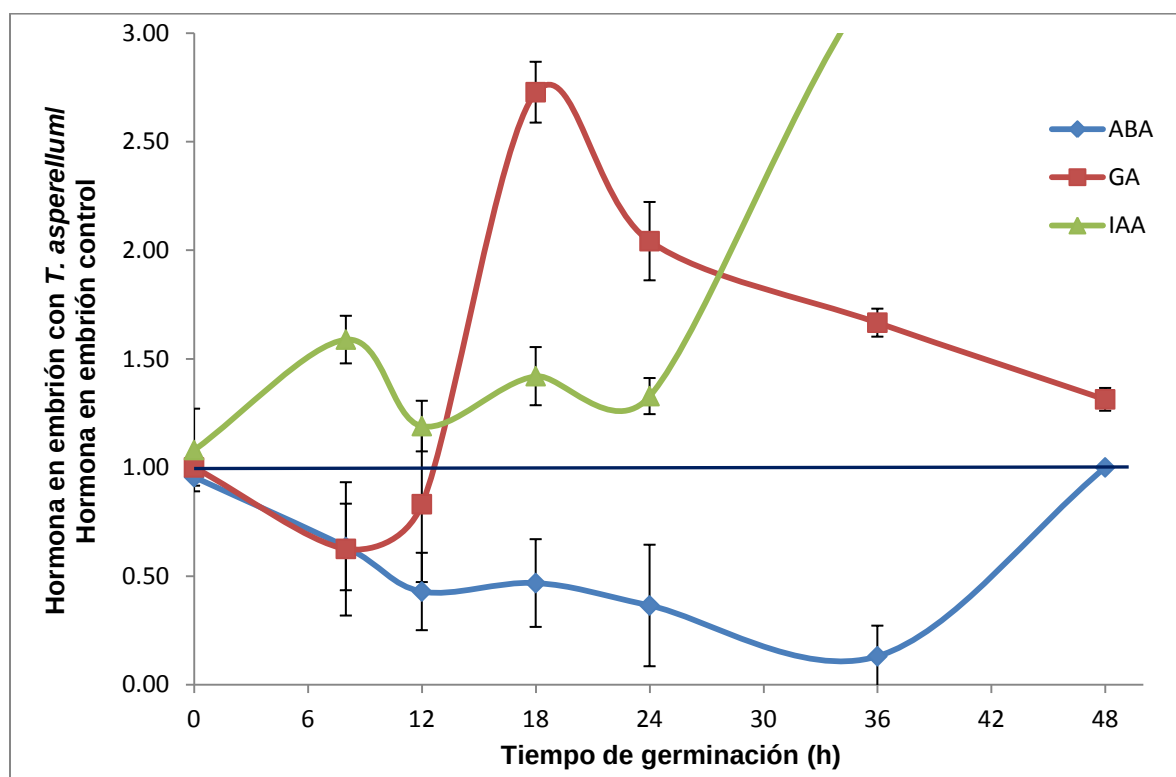
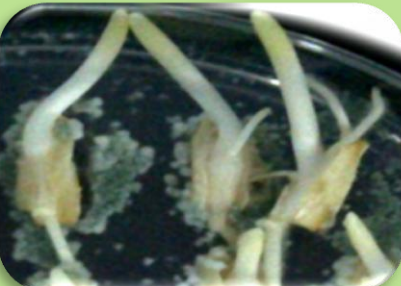


Figura 24. Efecto de *Trichoderma asperellum* en los niveles de ABA, IAA y GA₃. Las curvas se construyeron a partir de los datos de las Figuras 18-20. Se obtuvo el índice entre el contenido de hormonas de los embriones en presencia de *Fusarium verticillioides* entre el contenido de hormonas de los embriones sin hongo a los diferentes tiempos de germinación de los embriones.

Este es el primer trabajo que se realiza en la determinación de los niveles de hormonas no directamente relacionadas con la defensa en maíz y que muestra como dos hongos con diferente forma de vida cambian el perfil hormonal. Por lo que, en vista de que el perfil hormonal de los embriones en presencia de los dos hongos es distinto, sugiere que es factible que el balance no sólo de las hormonas que han sido implicadas en la defensa estén funcionando solas para defender a la planta, sino que la red de interacciones con las señales normales (hormonas) que regulan el desarrollo de la planta pueden influenciar la capacidad y la estrategia de defensa (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de resultados.

	Estado seco	Germinación	Situación en la post-germinación	Fotografía 48 h
Control	↑ [ABA] ↓ [GA] ↑ [IAA] ↑ ABA/GA	↓ [ABA] ↑ [GA] ↓ ABA/GA ↓ [IAA]	Desarrollo natural del embrión de maíz.	
Fusarium verticillioides		↑↑ [ABA] ↑↑ [GA] ↑↑↑ ó sin cambio ABA/GA ↓ [IAA]	Establecimiento del hongo patógeno, progresión de la enfermedad y muerte del embrión de maíz.	
Trichoderma asperellum		↓ [ABA] ↑↑ [GA] ↓ ABA/GA ↑↑↑ [IAA]	Promoción de la salida del coleóptilo y radícula del embrión.	



IX. CONCLUSIONES

1. Los hongos *Fusarium verticillioides* y *Trichoderma asperellum* influyeron de manera distinta en los niveles hormonales de los embriones a lo largo de la germinación.
2. El hongo *Fusarium verticillioides* mantuvo los niveles de ABA altos, incrementó los niveles de GA y retrasó el aumento en el nivel de IAA.
3. Mientras que el hongo *Trichoderma asperellum* no modificó los perfiles de degradación de ABA y el aumento de GA en los embriones, aunque en este último alcanzó valores mayores, sí cambió el perfil de aparición de auxinas, ya que mantuvo siempre niveles altos.
4. Adicionalmente, el hongo *Trichoderma asperellum* fue capaz de interaccionar negativamente con *Fusarium verticillioides*, es decir, inhibió su crecimiento.
5. Lo anterior podría explicar porqué el hongo *Trichoderma asperellum* ha sido propuesto como un hongo biocontrol de microorganismos patógenos, y benéfico para el crecimiento de plantas.
6. El hongo *Fusarium verticillioides* mantuvo un índice alto ABA/GA reduciendo la capacidad de germinar del embrión, pero permitió el aumento de auxinas lo que le favoreció como mecanismo para continuar invadiendo al embrión al relajar sus paredes celulares.
7. Por su parte el hongo *Trichoderma asperellum*, mantuvo el índice adecuado de ABA/GA para poder germinar y conservó desde tiempos muy tempranos un alto nivel de auxinas, el cual promovió el crecimiento de todo el embrión, radículas y coleóptilos, permitiéndole establecerse antes; por lo que el hongo *Trichoderma asperellum* fue favorable para la germinación y el crecimiento de los embriones de maíz.



X. PERSPECTIVAS

1. Determinar si la presencia de *Trichoderma asperellum* favorece el crecimiento de la plantas de maíz y la hace más fuerte ante diferentes tipos de estrés. Germinando semillas con *Trichoderma asperellum* y dejando que siga su crecimiento hasta planta, y midiendo a diferentes tiempos los cambios en la longitud del tallo, hojas, efecto de diferentes tipos de estrés (salino, hídrico, patógenos) en la planta.
2. Promover la germinación de embriones y el crecimiento de plántulas de maíz en presencia de *Trichoderma asperellum* y enfrentarlas a un hongo como *Fusarium verticillioides* para observar si efectivamente *Trichoderma asperellum* induce las defensas de la planta y le permite sobrevivir contra el ataque a *Fusarium verticillioides* por más tiempo.
3. Determinar si la persistencia en el nivel alto de ABA está favoreciendo la infección por *Fusarium verticillioides*. Se podrían asperjar embriones o plántulas de maíz con ABA y determinar si la enfermedad aparece a tiempos más cortos. O bien, utilizar plántulas que no sinteticen ABA y determinar si *Fusarium verticillioides* no es capaz de producir la enfermedad.

XII. REFERENCIAS

- Aguilera-Alvarado GP. 2010. Regulación hormonal y osmótica de la expresión del transportador de sacarosa y de un transportador de hexosas putativo en embriones germinados de maíz. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- American Phytopathological Society. Plagas y enfermedades del maíz. 2004. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 101-104.
- Bari, R. y Jones, J. D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*. 69: 473-488.
- Bentsink, L. y Koornneef M. 2002. Seed Dormancy and Germination. *Current Opinion in Plant Biology*. Feb;5(1):33-6.
- Berrocal-Lobo, M. y Molina A. 2008. *Arabidopsis* defense response against *Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science* 13, 145-150.
- Bewley, J. D. y Black, M. 1995. Seeds: Physiology of development and germination. *Seed Science Research*. 5 (02). 127-128.
- Bömke, C; Rojas, M. C; Hedden, P. y Tudzynski, B. 2008. Loss of Gibberellin Production in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A) Is Due to a Deletion in the Gibberellic Acid Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74, No. 24, pp. 7790-7801.
- Bove, J; Jullien, M. y Grappin P. 2002. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3, 1002.1-1002.5.
- Bonifaz, A. 2010. Micología Médica Básica. 3a ed. Mc Graw Hill. México. pp. 394.

- Calzada-Alejo, V. 2011. Cambios en el patrón de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas por la presencia de *Fusarium verticillioides* durante la germinación de embriones de maíz. Detección de las proteínas por anticuerpos.
- Catalogue of Life. 2012. Árbol taxonómico de *Zea mays*.
<http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/9794888/source/tree>
- Catalogue of Life. 2012. Árbol taxonómico del género *Fusarium*.
<http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/8457511>
- Catalogue of Life. 2012. Árbol taxonómico de *Trichoderma asperellum*.
<http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/8461614/source/tree>
- Choudhary, D. K; Sharma, K. P. y Gaur, R. K. 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. *Biotechnology Letters* 33:1905–1910.
- Contreras-Cornejo, H. A; Macías-Rodríguez, L; Cortés-Penagos, C. y López Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol. 149. pp. 1579-1592.
- Desjardins, A. E. 2003. Gibberella from A (venaceae) to Z (eae). *Annual Review of Phytopathology* 41, 177-98.
- Desjardins, A. E. y Hohn, T. H. 1997. Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 10, No. 2. pp. 147–152.
- De la Torre-Hernández, M. E; Rivas-San Vicente, M; Greaves-Fernandez, N; Cruz-Ortega, R. y Plasencia, J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74, 337-345.

- Duncan, K. E. y Howard, R. J. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 6–16.
- Enríquez-Arredondo, C; Sánchez-Nieto, S; Rendón-Huerta, E; González-Halphen, D; Gavilanes-Ruíz, M. y Gavilanes-Ruíz, M. 2005. The plasma membrane H⁺-ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Science* 169: 11-19.
- Finch-Savage, W. E. y Leubner-Metzger, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–523.
- Footitt, S, Douterelo-Soler, I; Clay, H. y Finch-Savage, W. 2011. Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(50): 20236-20241.
- Gelderblom, W. C; Jaskiewicz, K; Marasas, W. F; Thiel P. G; Horak, R. M; Vleggaar, R. y Kriek, N. P. 1988. Fumonisin-novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology* 54 (7), 1806-1811.
- GeoChembio. 2012. Zea Mays, kernel anatomy.
<http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/#kernel>
- Goldblatt, L. 1972. Implications of mycotoxins. *Clinical Toxicology* 5 (4), 453-64.
- Guzmán-Chávez, F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Hedden, P. y Phillips, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*. Dec;5(12):523-30.

- Hermosa, R; Viterbo, A; Chet, I. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. 158, 17-25.
- Kato, T. A; Mapes, C; Mera, L. M; Serratos, J. A. y Bye, R. A. 2009. Diversificación del maíz: una revisión analítica. UNAM, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp. 19-21.
- Koeck, M; Hardham, A. R. y Dodds, P. 2011. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology*. 13(12), 1849–1857.
- Kucera, B; Marc, Cohn, M. A. y Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*. 15, 281-307.
- Leszek, P. y Vincent, D. 2002. *Zea mays* (Maize, Corn). Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0003687.html>
- Logan, D. C; Millar, A. H; Sweetlove, L. J; Hill, S. A. y Leaver, C. J. 2001. Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*. 125, 662-672.
- López Martínez, R; Mendez Tovar, L. J; Hernández Hernández, F. y Castañón Olivares, R. 2004. Micología médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 2a ed. Trillas. México. pp 141, 147 y 185-188.
- Luna-Loaiza, V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Malonek, S; Rojas, M. C; Hedden, P; Hopkins, P. y Tudzynski, B. 2005. Restoration of Gibberellin Production in *Fusarium proliferatum* by Functional Complementation of Enzymatic Blocks. *Applied and Environmental Microbiology* 71(10), 6014-6025.

- Malvick, D. 2007. Hot and Dry Summer Conditions in Minnesota Are Favorable for Corn Ear Rots and Mycotoxin Production. University of Minnesota.
<http://www.extension.umn.edu/cropenews/2007/07MNCN42.html>
- Martínez-Marcelo, V. H. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación del tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos”. Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Manz, B; Müller, K; Kucera, B; Volke, F. y Leubner-Metzger. 2005. Water Uptake and Distribution in Germinating Tobacco Seeds Investigated in Vivo by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Plant Physiology* 138, 1538-1551.
- Mejia, M. y Peel, D. S. 2009. White Corn and Yellow Corn Production in Mexico: Food versus Feed? Analysis & Comments. Livestock Marketing Information Center.
<http://economics.ag.utk.edu/market/analysis/ac2509.pdf>
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2005. Absciscic Acid Biosynthesis and Catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56:165-185.
- Pan, X; Welti, R. y 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.
- Parizi T, E; Ansari M. y Eslaminejad T. 2012. Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Microbial Pathogenesis* 52, 201-205.
- Rayle, D. L. y Cleland, R. E. 1992. The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive And Well. *Plant Physiology* 99, 1271-1274.
- Reyes, P. 1990. El maíz y su cultivo. AGT Editor, S.A. México.

- Robert-Seilaniantz, A; Navarro, L; Bari, R. y Jonathan, D. G. J. 2007. Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10, 372-379.
- Rodríguez-Gacio, Ma. C; Matilla-Vázquez, M. A. y Matilla, A. J. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. Landes Bioscience. *Plant Signaling & Behavior* 4:11, 1035-1048.
- Sánchez-Linares, L; Gavilanes-Ruíz, M; Díaz-Pontones, D; Guzmán-Chávez, F; Calzada-Alejo, V; Zurita-Villegas, V; Luna-Loaiza, V; Moreno-Sánchez, R; Bernal-Lugo, I. y Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* publicado online Mayo18, doi:10.1093/jxb/ers130.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2007. Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996 – 2012. Disponible en: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaDerivada/ComercioExterior/Estudios/Perspectivas/maiz96-12.pdf
- Shoresh, M. y Harman, G. E. 2008. The Molecular Basis of Shoot Responses of Maize Seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 Inoculation of the Root: A Proteomic Approach. *Plant Physiology*. Vol. 147, pp. 2147–2163.
- Skoog, D. 2001. Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. Mc Graw Hill. España. pp. 785 - 792.
- Sofo, A; Scopa, A; Manfra, M; De Nisco, M; Tenore, G; Troisi, J; Di Fiori, R. y Novellino, E. 2011. *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* 3 *P. canescens*). *Plant Growth Regulation* 65:421–425
- Soriano, J. y Dragacci, S. 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research Internacional*. 37(10): 985-1000.

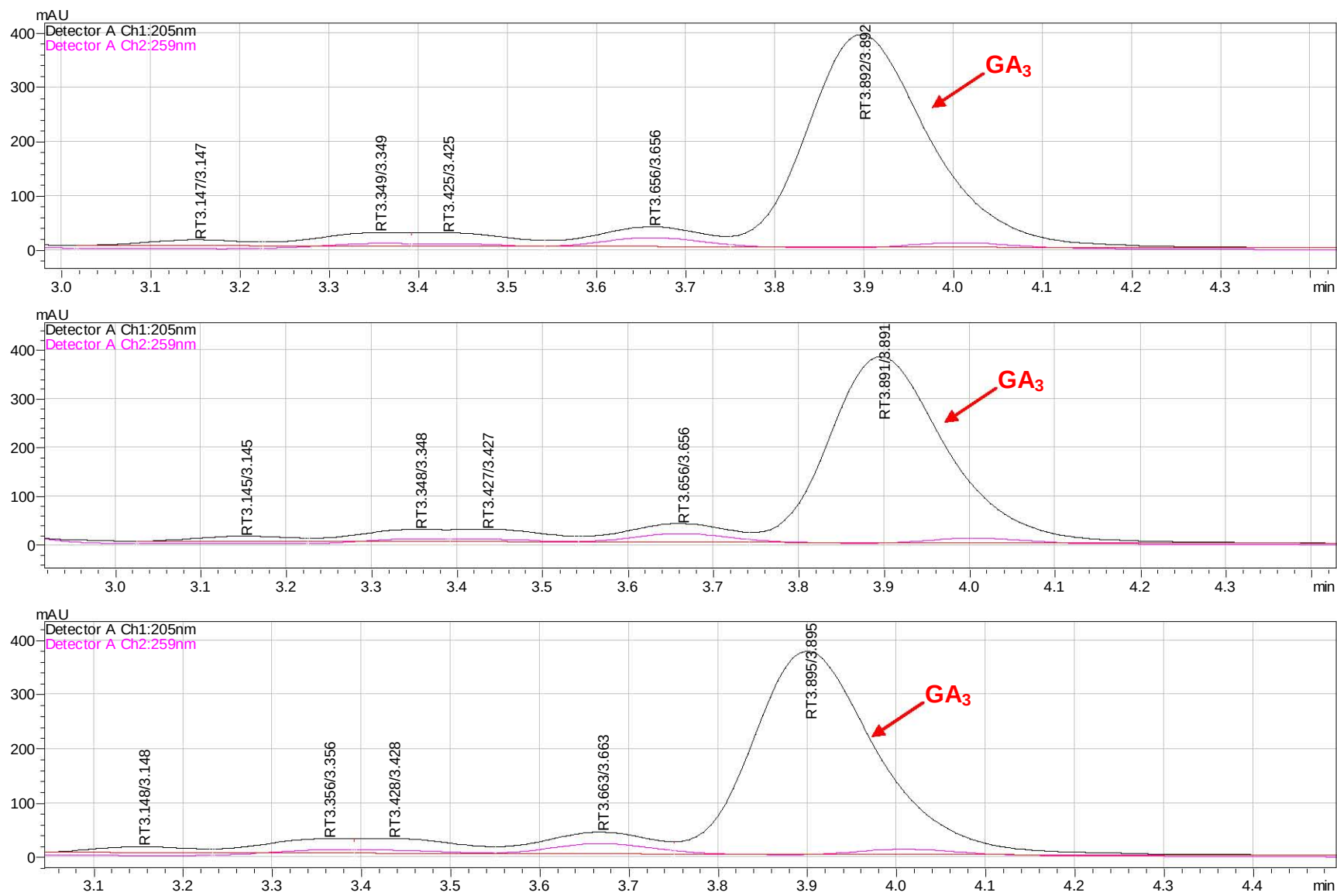
- Soriano, J. 2007. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos. España
- Srivastava, L. 2002. Plants growth and development: Hormones and environment. Academic Press New York pp. 141-188, 217-231.
- Teale, W. D; Paponov, I. A. y Palme, K. 2006. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nov; 7(11):847-59.
- Van Wees, S. C. M; Van der Ent, S. y Pieterse, C. M. J; 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 443–448.
- Vargas, W. A; Mandawe, J, C. y Kenerley, C. M. 2009. Plant-Derived Sucrose Is a Key Element in the Symbiotic Association between *Trichoderma virens* and Maize Plants. *Plant Physiology* 151, 792-808.
- Velázquez, C. A. 2007. Análisis de micotoxinas aminopolihidroxiladas. Universidad de Lleida. <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8361/cavelazquez.pdf?sequence=1>
- Weitbrecht, K; Müller, K. y Leubner-Metzger. 2011. First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 62, No. 10, pp. 3289–3309.
- Zhao, Y. 2010. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. *Annual Review of Plant Biology* 61:49-64.



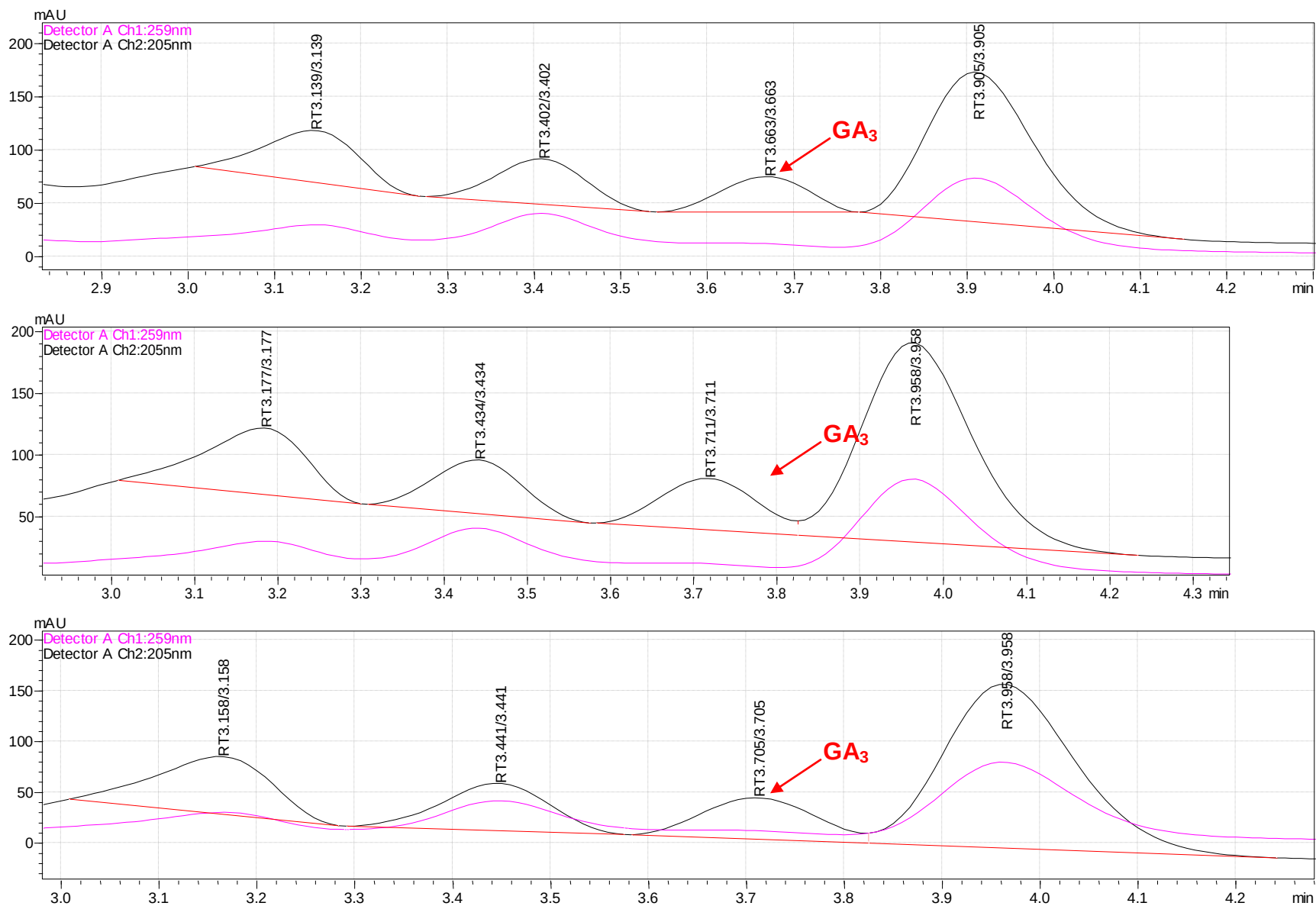
XI. APÉNDICES

Apéndice 1: Cromatogramas obtenidos para la cuantificación de las hormonas GA₃ y IAA.

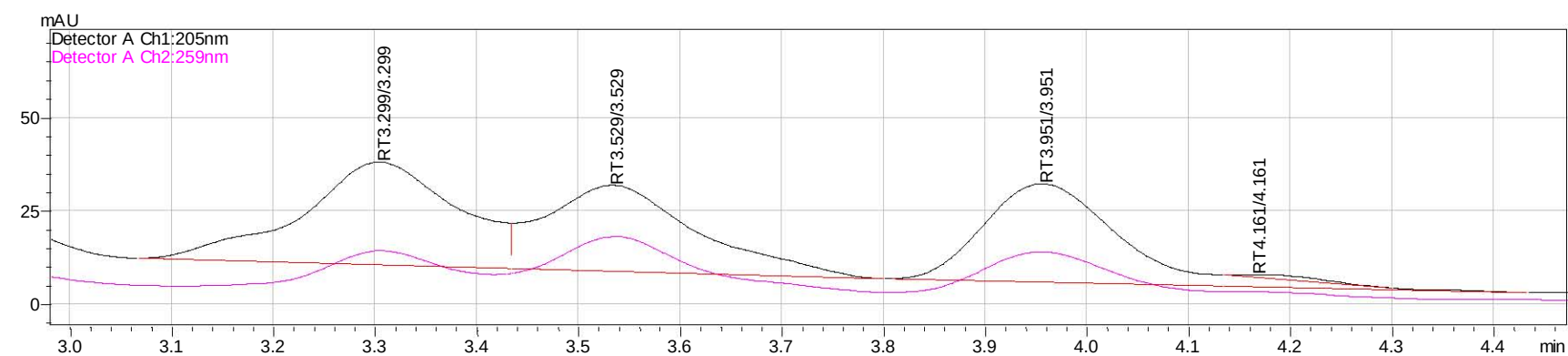
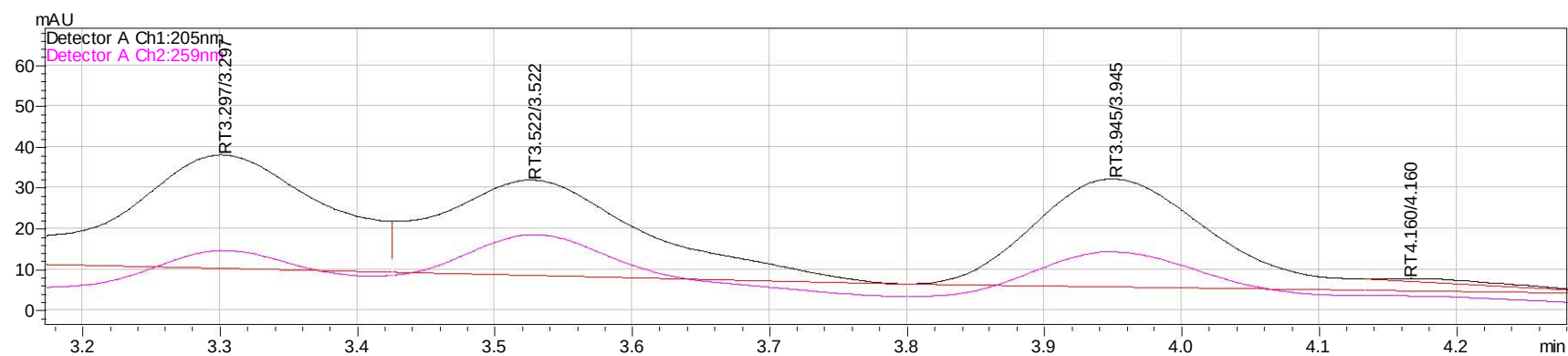
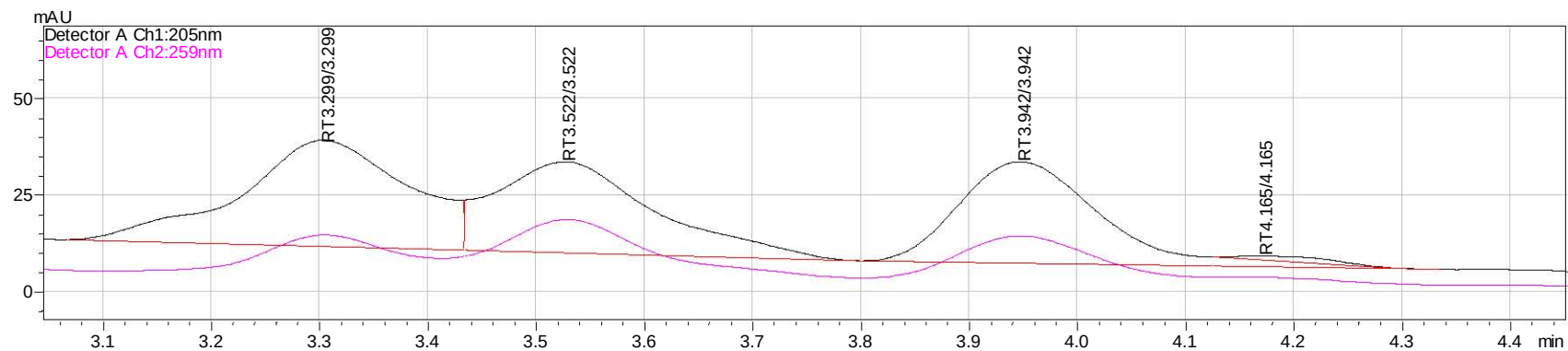
Se muestran los cromatogramas obtenidos de muestras corridas con estándar interno y solo se presentan los resultados obtenidos a las 8 h de germinación en ausencia y presencia de los hongos *Trichoderma asperellum* ó *Fusarium verticillioides*.



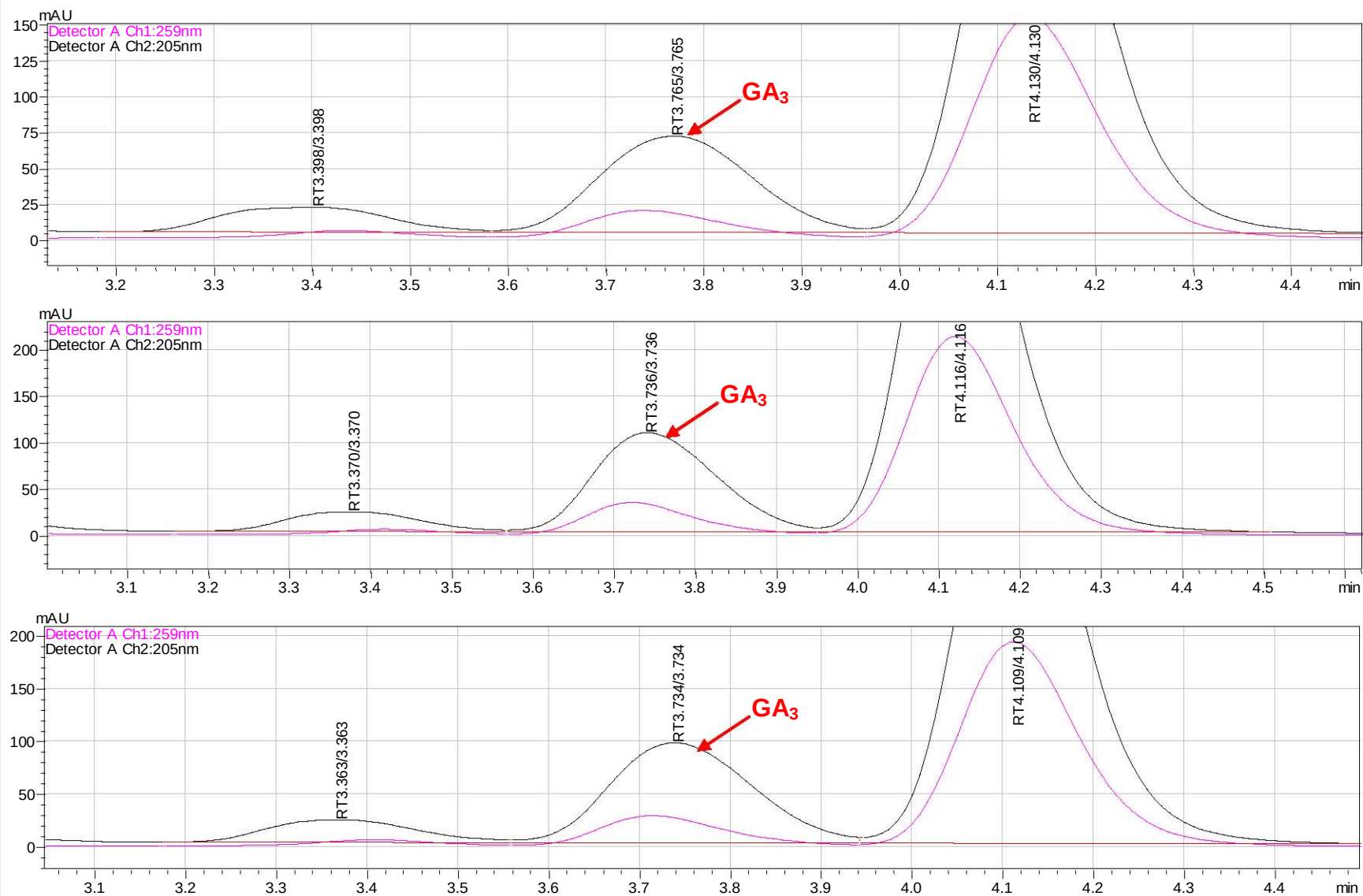
Cromatogramas 1. Estándar interno de GA₃ (20 µg).



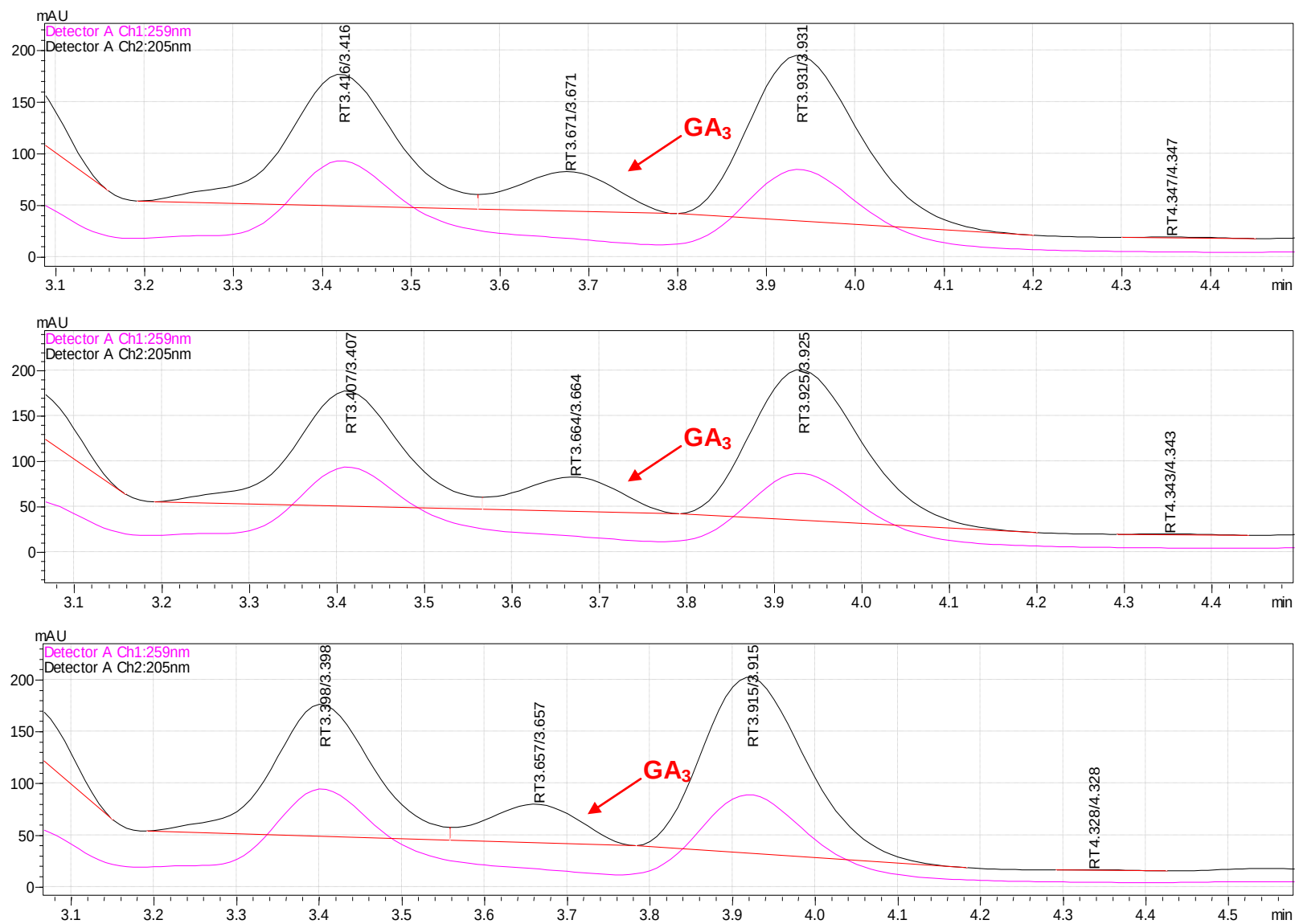
Cromatograma 2. 8h Control. GA₃ .Primer duplicado.



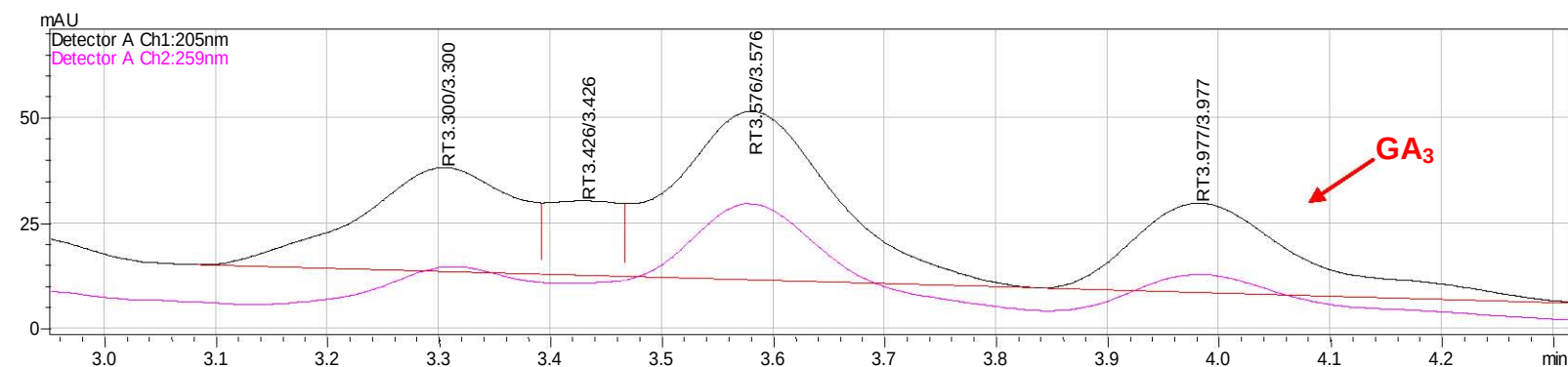
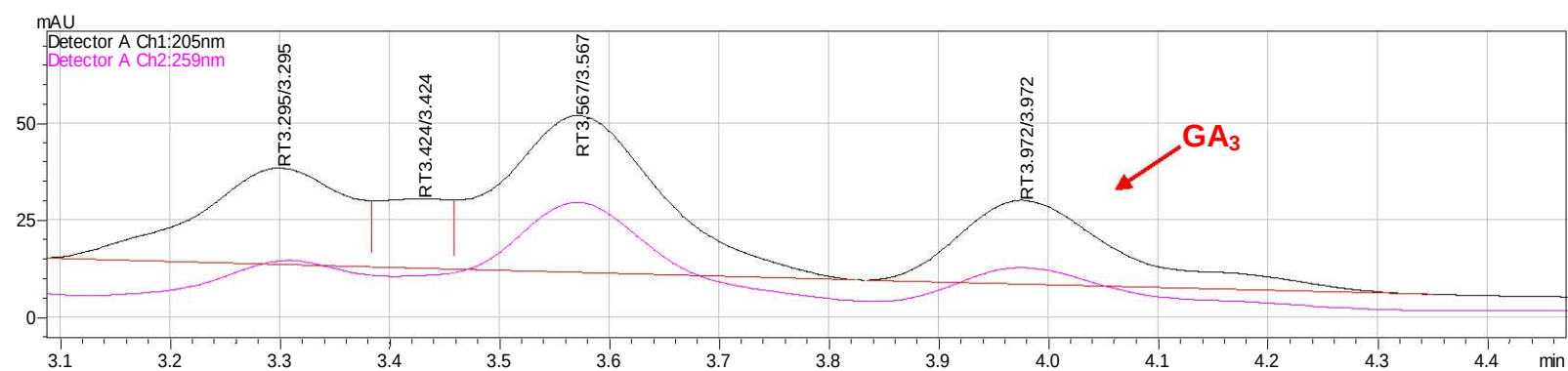
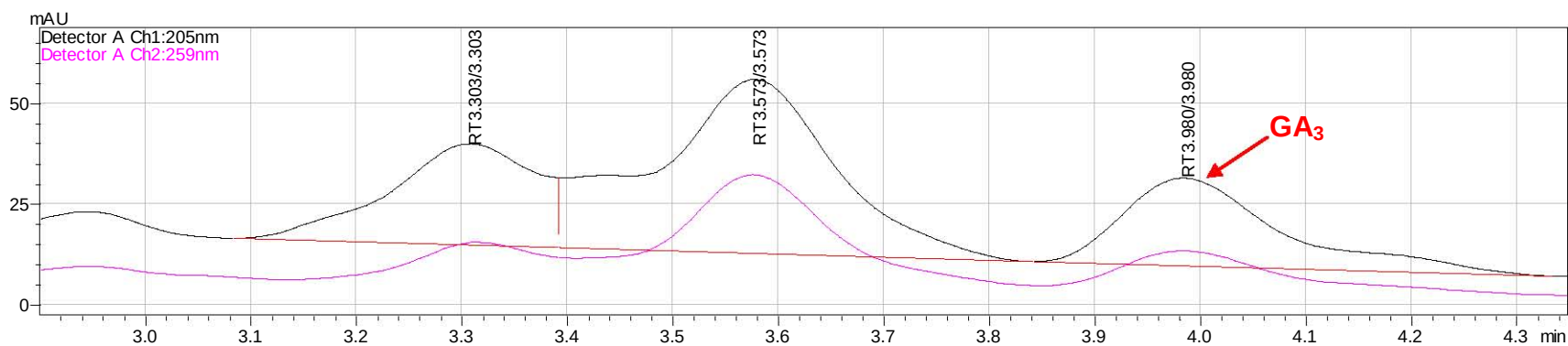
Cromatograma 3. 8h Control. GA₃ .Segundo duplicado.



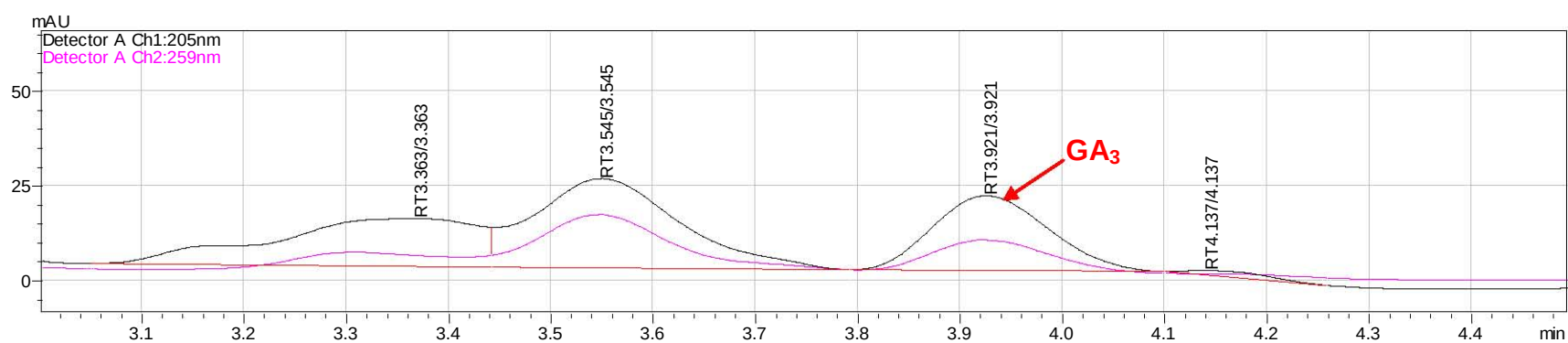
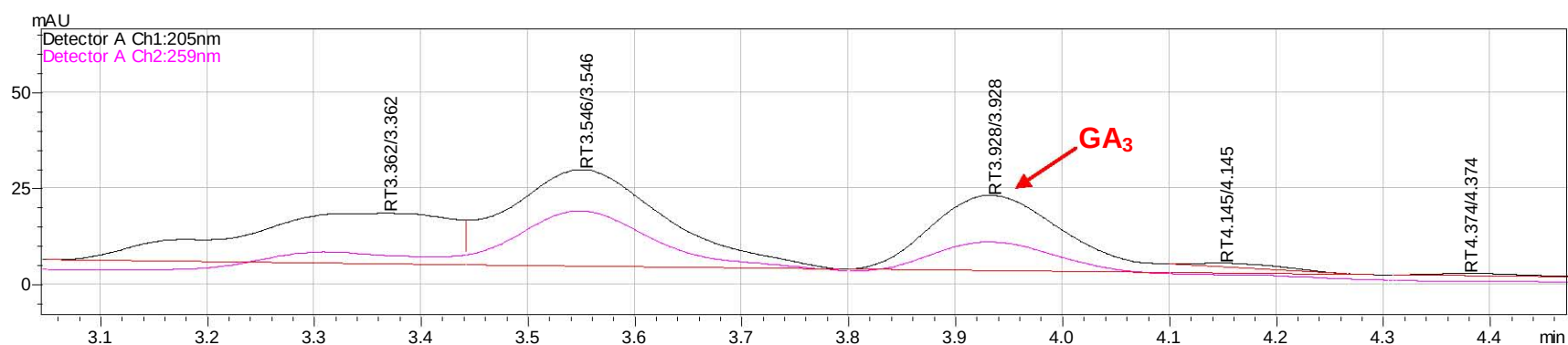
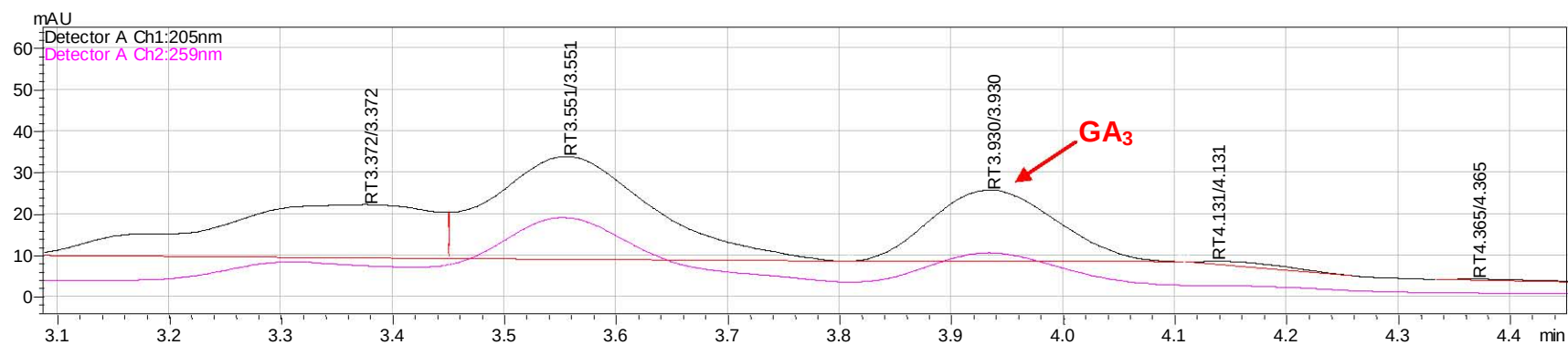
Cromatograma 4. 8h *Fusarium verticillioides*. GA₃. Primer duplicado.



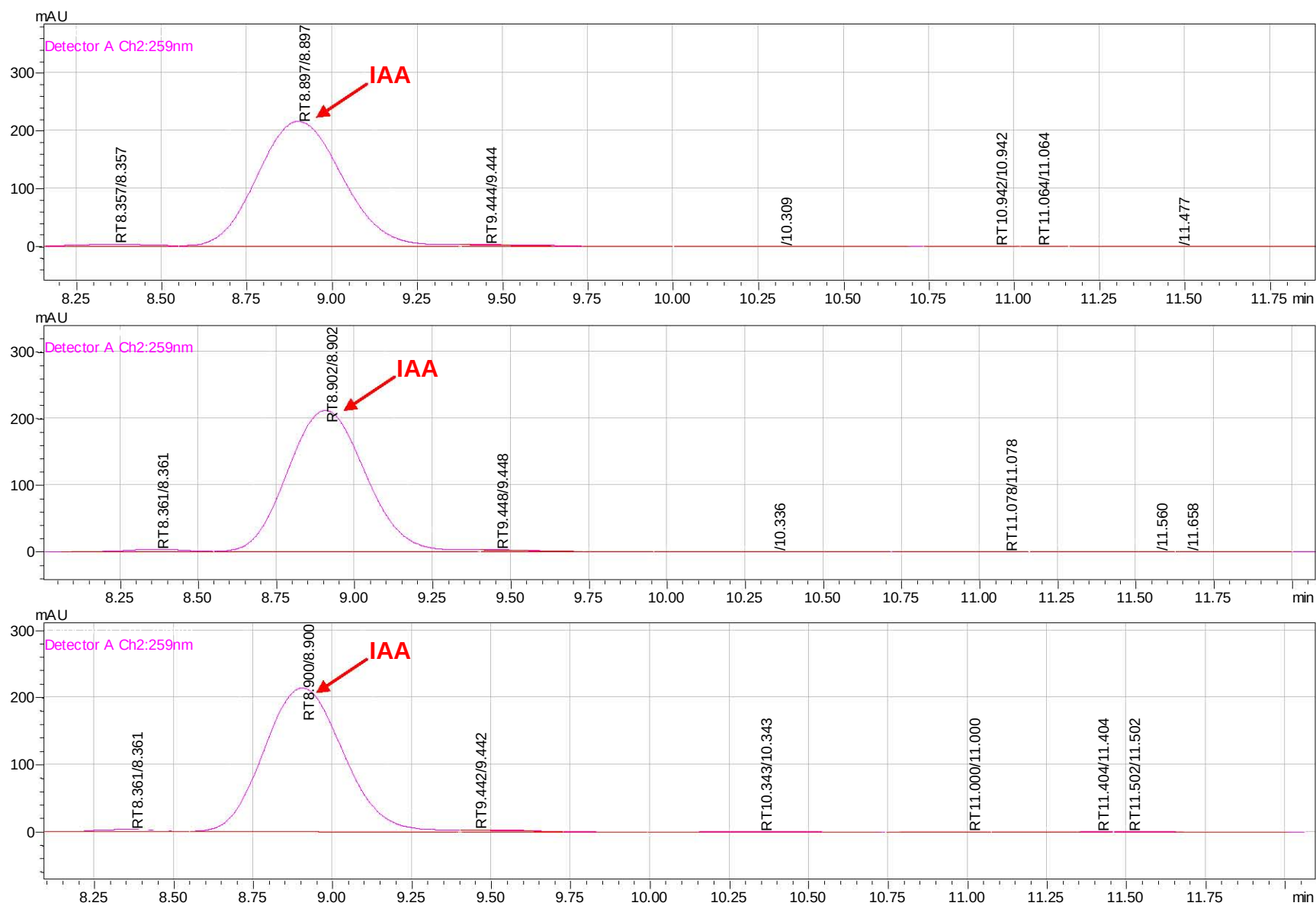
Cromatograma 5. 8h *Fusarium verticillioides*. GA₃. Segundo duplicado.



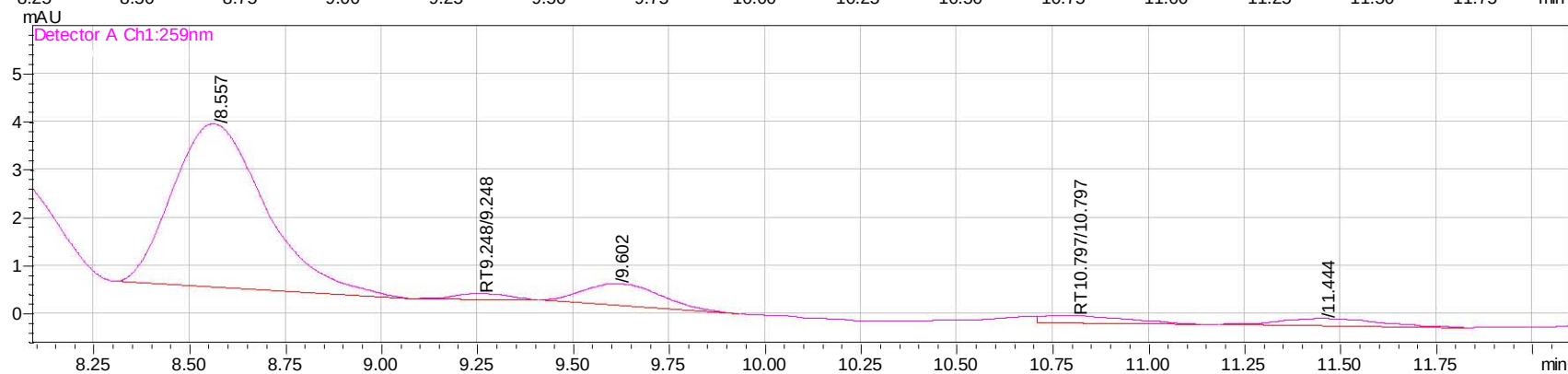
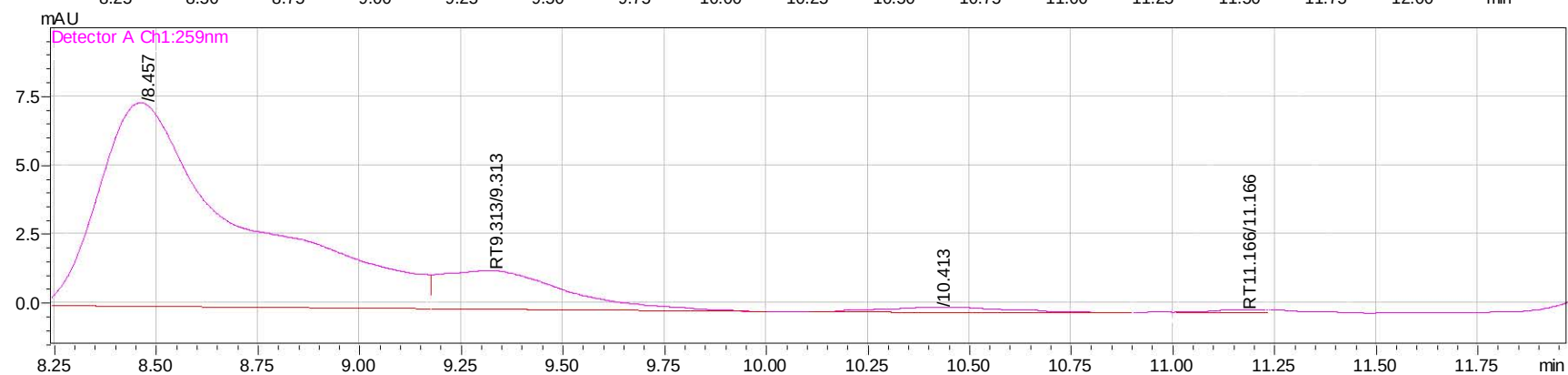
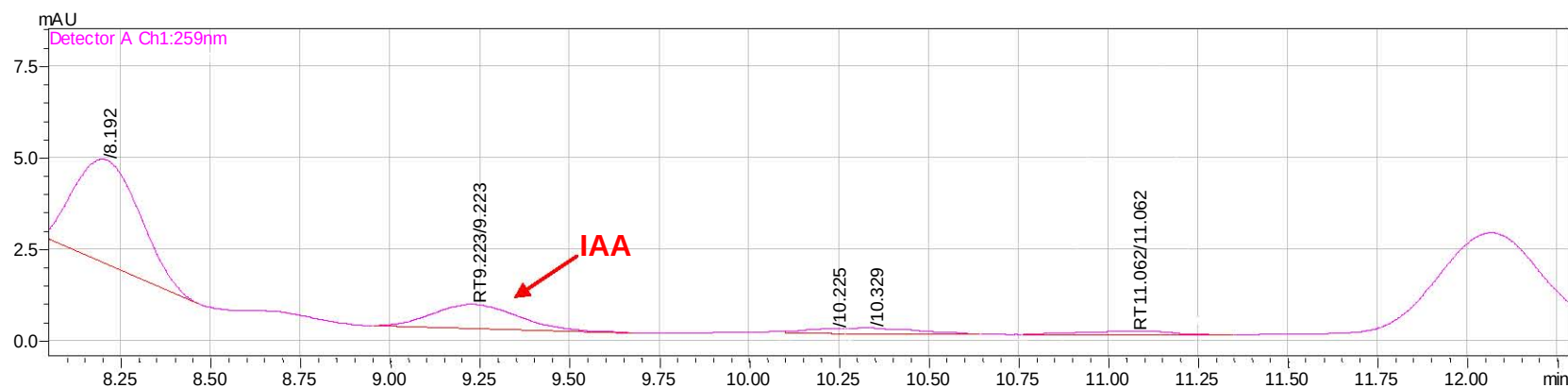
Cromatograma 6. 8h *Trichoderma asperellum*. GA₃. Primer duplicado.



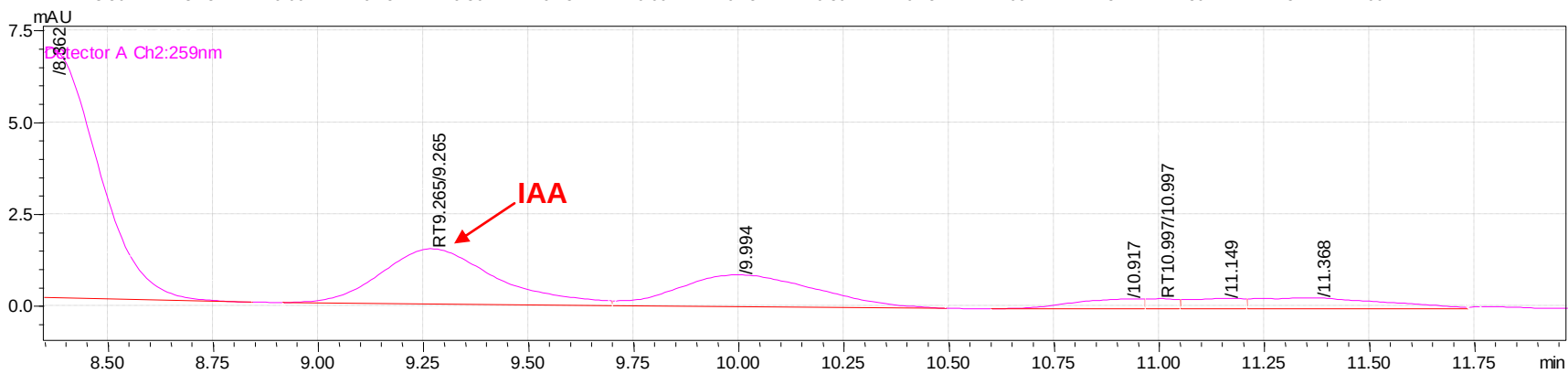
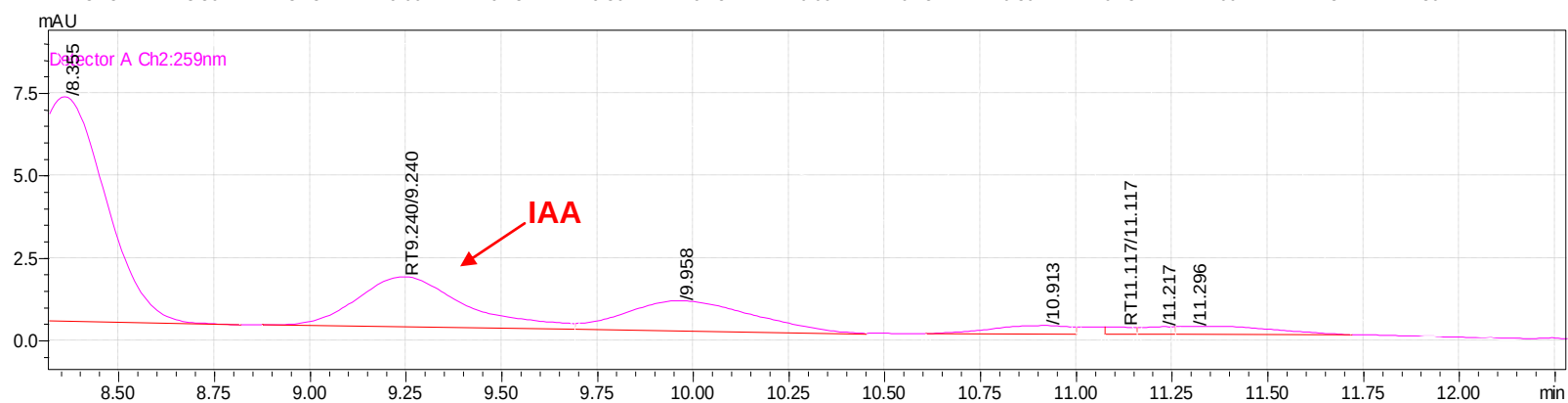
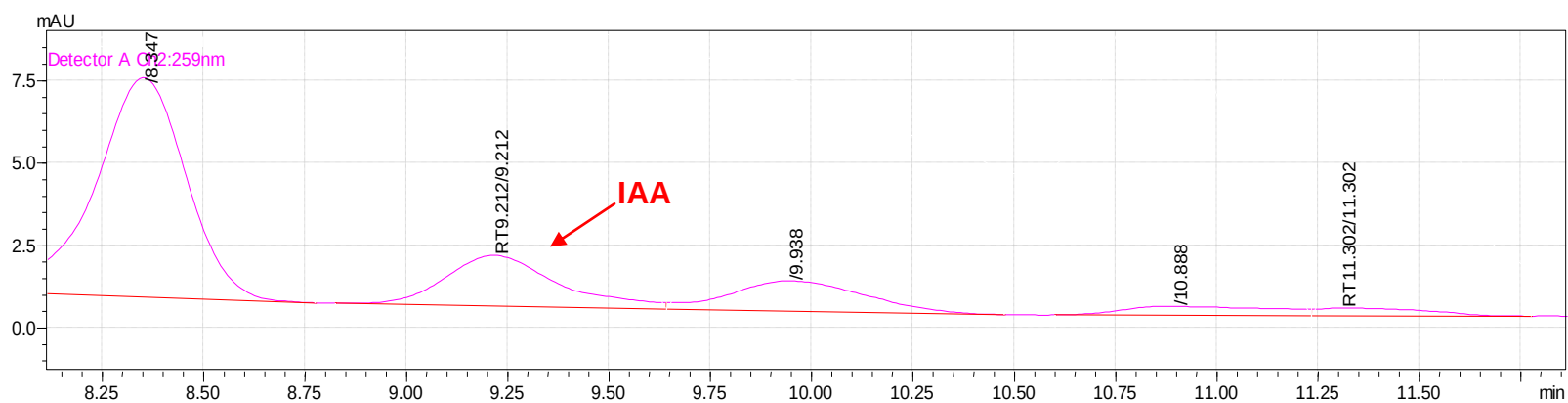
Cromatograma 7. 8h *Trichoderma asperellum*. GA₃. Segundo duplicado.



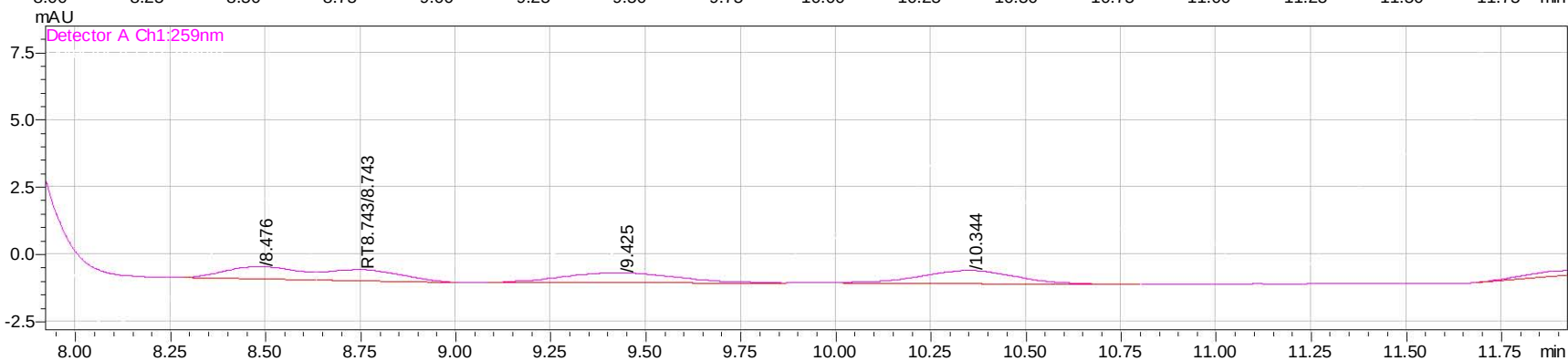
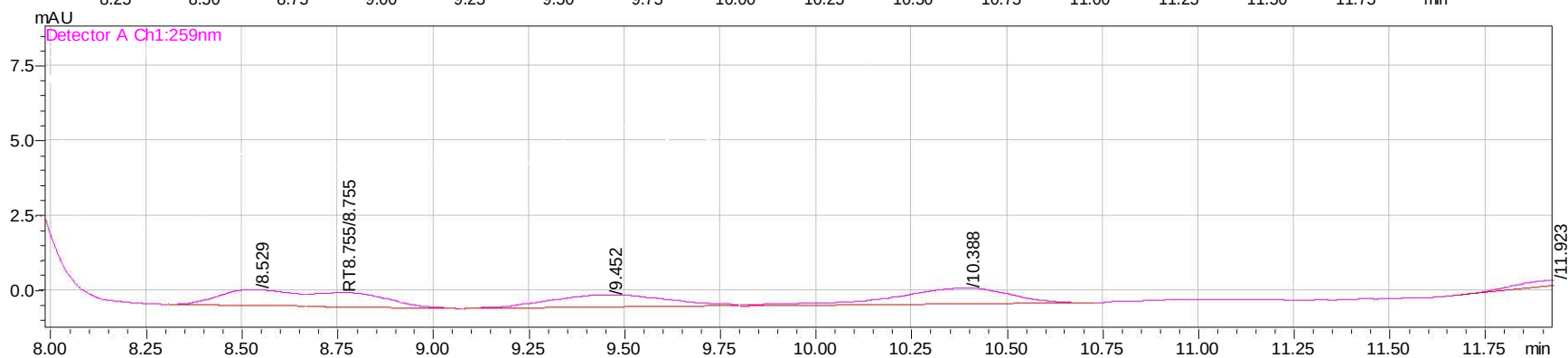
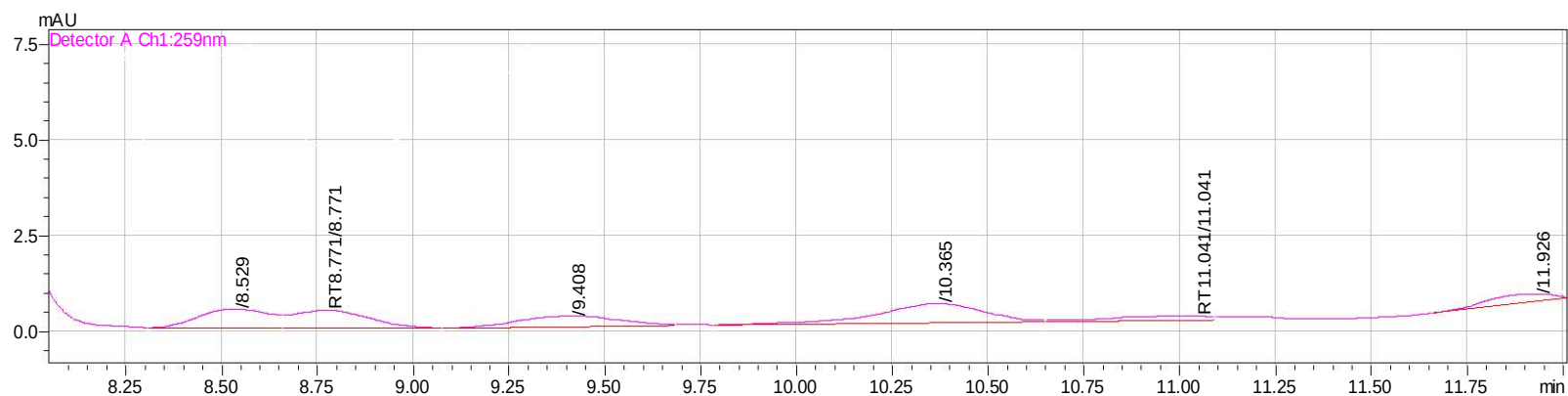
Cromatograma 8. Estándar interno de Ácido 3-Indol Acético (2 μ g).



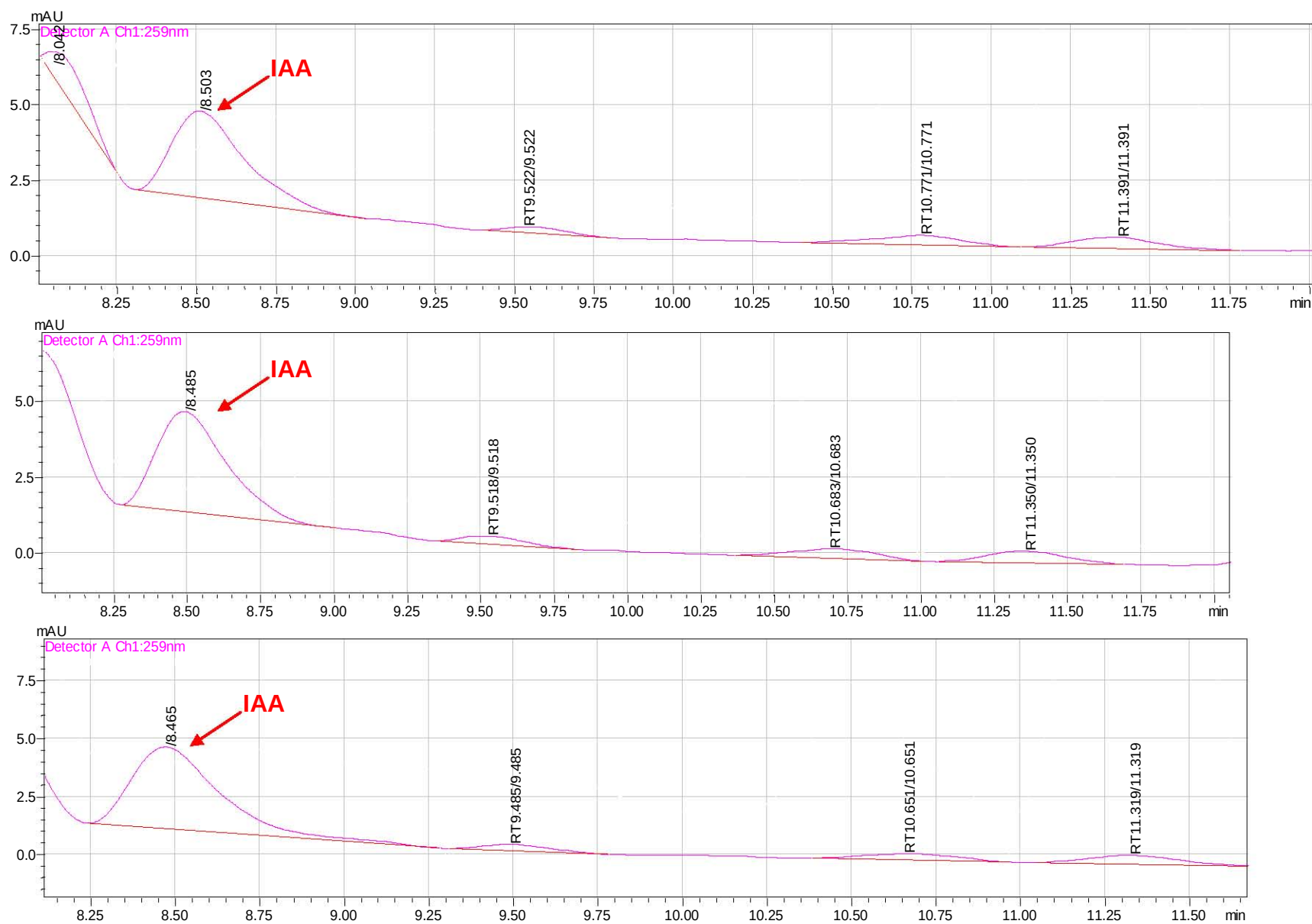
Cromatograma 9. 8h Control. IAA. Primer duplicado.



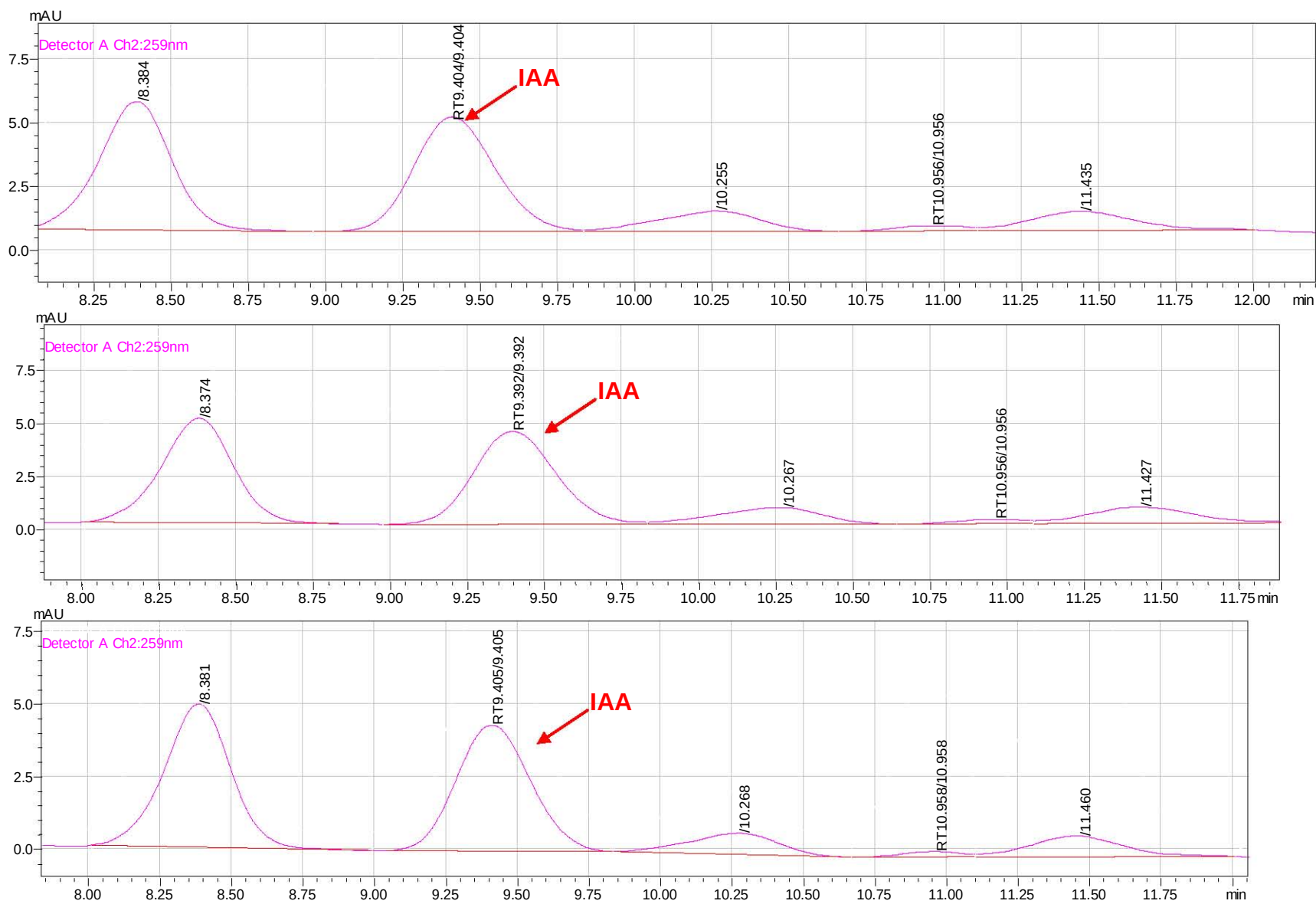
Cromatograma 10. 8h Control. IAA. Segundo duplicado.



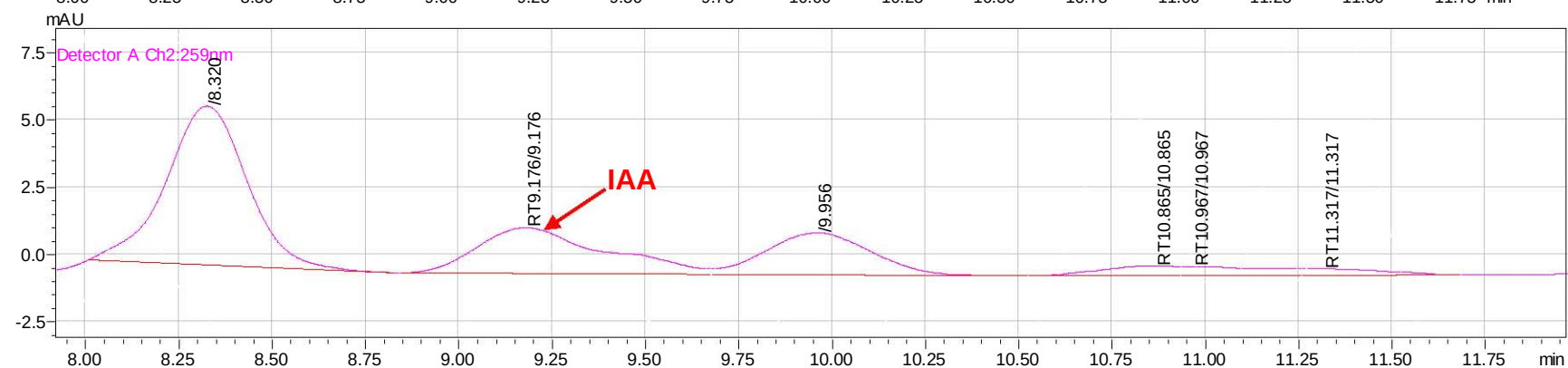
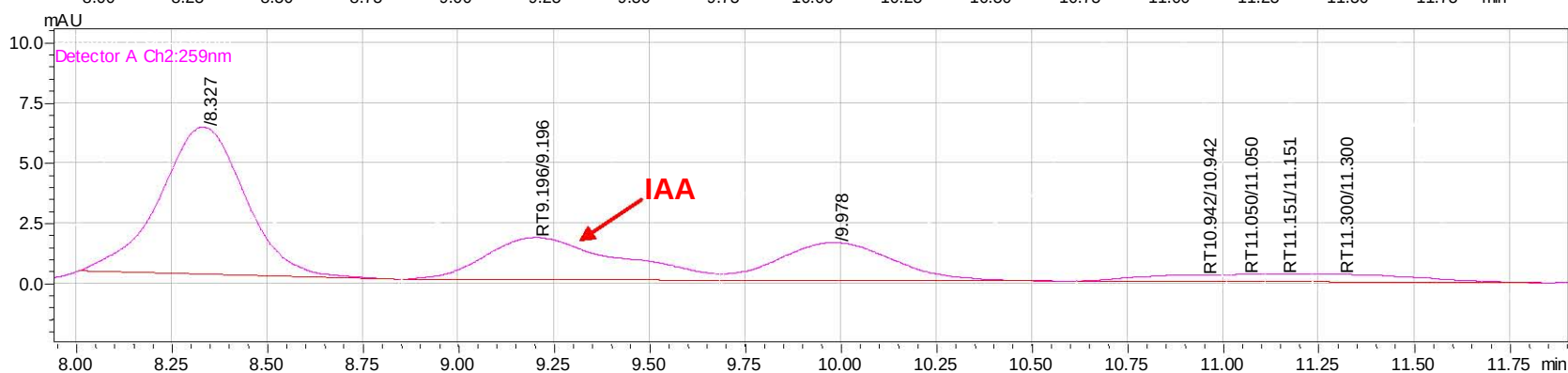
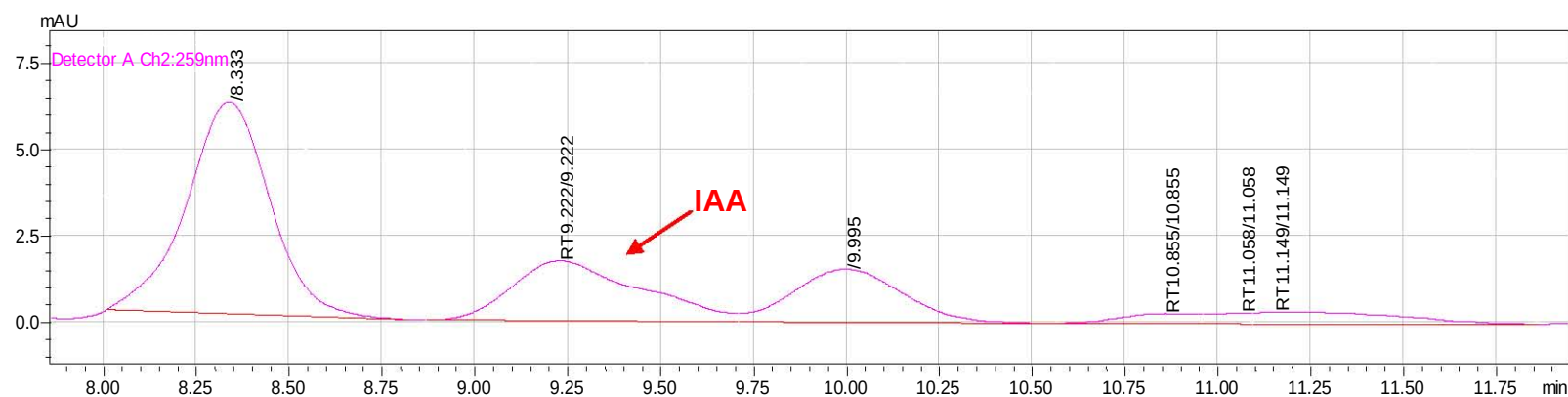
Cromatograma 11. 8h *Fusarium verticillioides*. IAA. Primer duplicado.



Cromatograma 12. 8h *Fusarium verticillioides*. IAA. Segundo duplicado.



Cromatograma 13. 8h *Trichoderma asperellum*. IAA. Primer duplicado.



Cromatograma 14. 8h *Trichoderma asperellum*. IAA. Segundo duplicado.

Apéndice 2: Cálculo del contenido de hormona por g tejido

Para calcular el contenido de hormona por gramo de tejido fresco, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se obtuvo el valor del ABC (Área Bajo la Curva) para GA₃ o IAA en cada tratamiento y tiempo de germinación de los cromatogramas obtenidos usando el software LC Solution.
2. Se obtuvo la ecuación de la recta de las curvas patrón realizadas por Luna-Loaiza (comunicación personal) (Figuras 25 y 26).
3. Se obtuvo la cantidad de GA₃ utilizando la siguientes fórmula:

$$\frac{GA_3 (ug)}{g \text{ tejido fresco}} = \frac{\left[\frac{(ABC - 18314)}{23598} * 0.5 \right]}{cantidad \text{ de tejido fresco}}$$

Donde **ABC** es el Área bajo la curva

0.5 es la cantidad de extracto

23598 es la pendiente de la curva patrón

4. Se obtuvo la cantidad de IAA utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{IAA (ng)}{g \text{ tejido fresco}} = \frac{\left[\frac{(ABC + 75758)}{247.02} * 0.5 \right]}{cantidad \text{ de tejido fresco}}$$

Donde **ABC** es el Área bajo la curva

0.5 es la cantidad de extracto

247.02 es la pendiente de la curva patrón

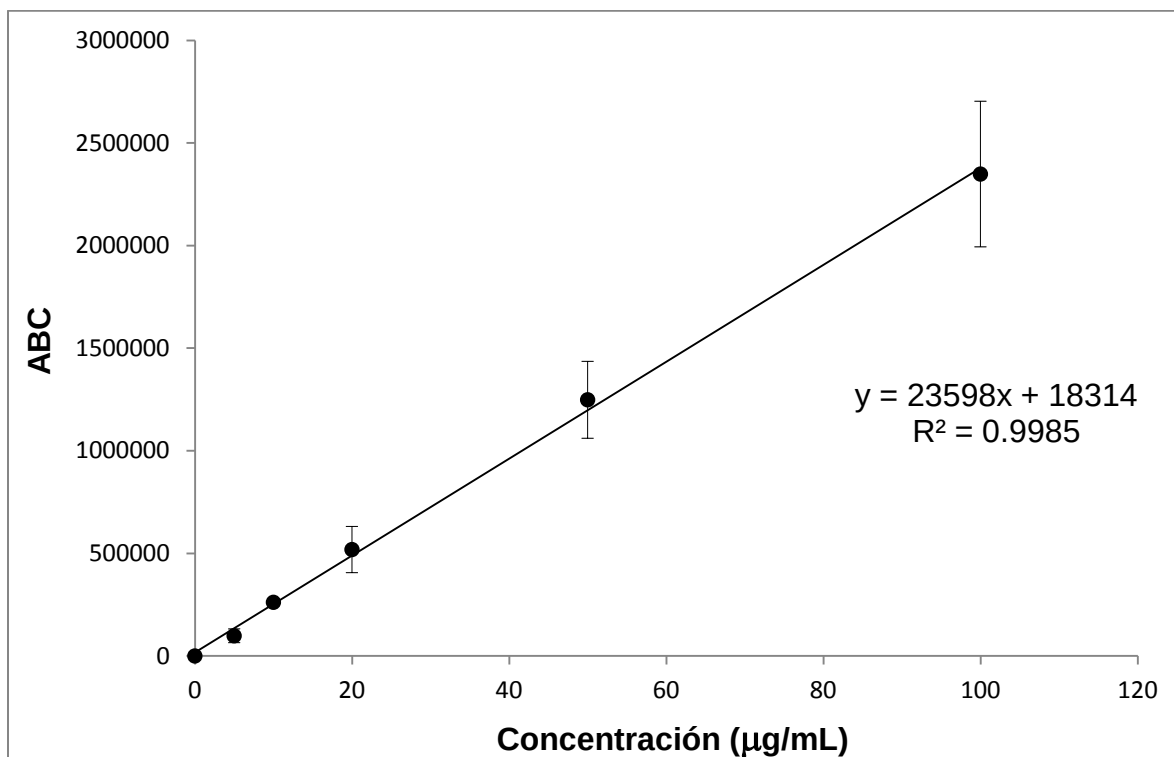


Figura 25. Curva patrón de GA_3 . Luna-Loaiza (comunicación personal).

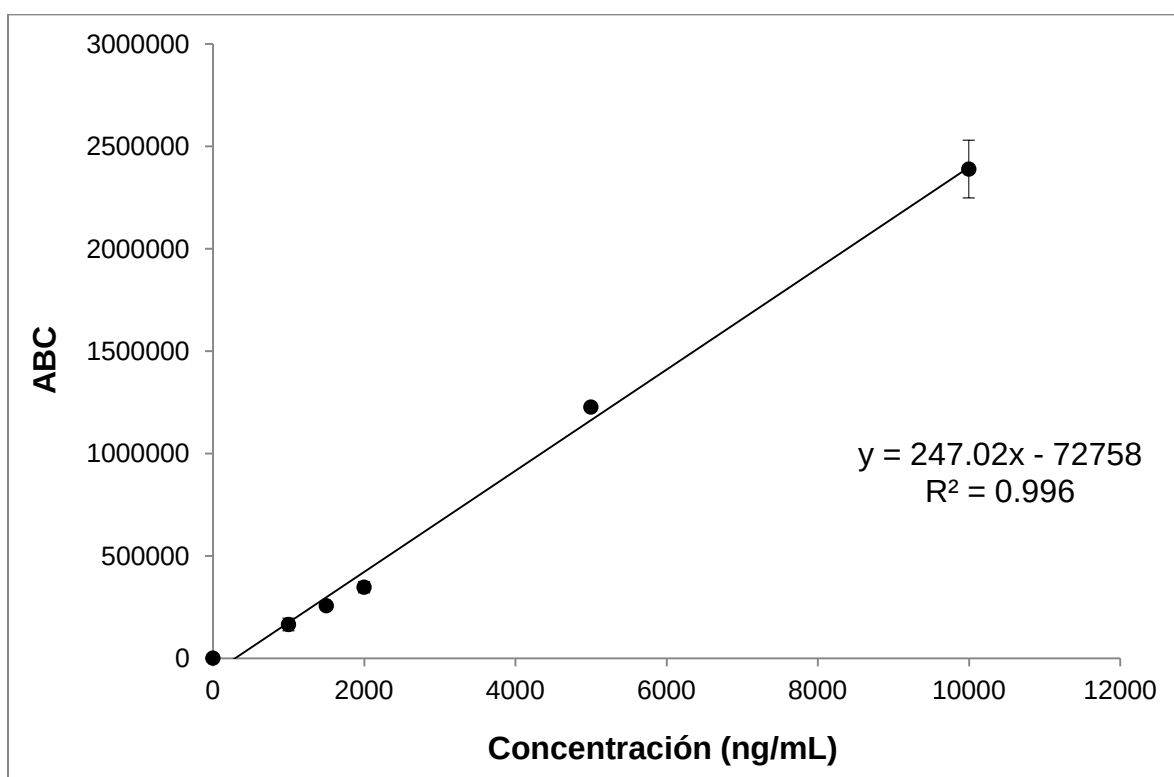


Figura 26. Curva patrón de IAA. Luna-Loaiza (comunicación personal).

Apéndice 3: Curva estándar de ABA y cálculos para determinar el contenido de hormonal g tejido

1. Se realizó la detección de ABA mediante un kit que utiliza anticuerpos monoclonales (Phytodetek® ABA Test Kit).
2. Después se calculó el % de unión de la muestra o estándar al anticuerpo.

$$\%Unión = \frac{(Media\ D.O. - D.O.\ UNE)}{D.O.\ B_o - D.O.\ UNE} * 100$$

Donde:

D.O. = Densidad Óptica ó valor de Absorbancia

UNE = Unión no específica = 0% Unión = 1000 pmoles/mL [ABA]

B_o = 100% Unión = 0 pmoles/mL [ABA]

3. Con el valor de % Unión se obtiene el valor de Logit, con la siguiente ecuación:

$$Logit = Ln \left[\frac{\%Unión}{100 - (\%Unión)} \right]$$

Donde:

Ln = logaritmo natural

4. Para determinar el contenido de hormona en la muestra Se realizó una gráfica teniendo en el eje de las ordenadas el valor obtenido de Logit para las soluciones estándar y en el eje de las abscisas el logaritmo natural de la concentración de ABA en el estándar (figura 27).

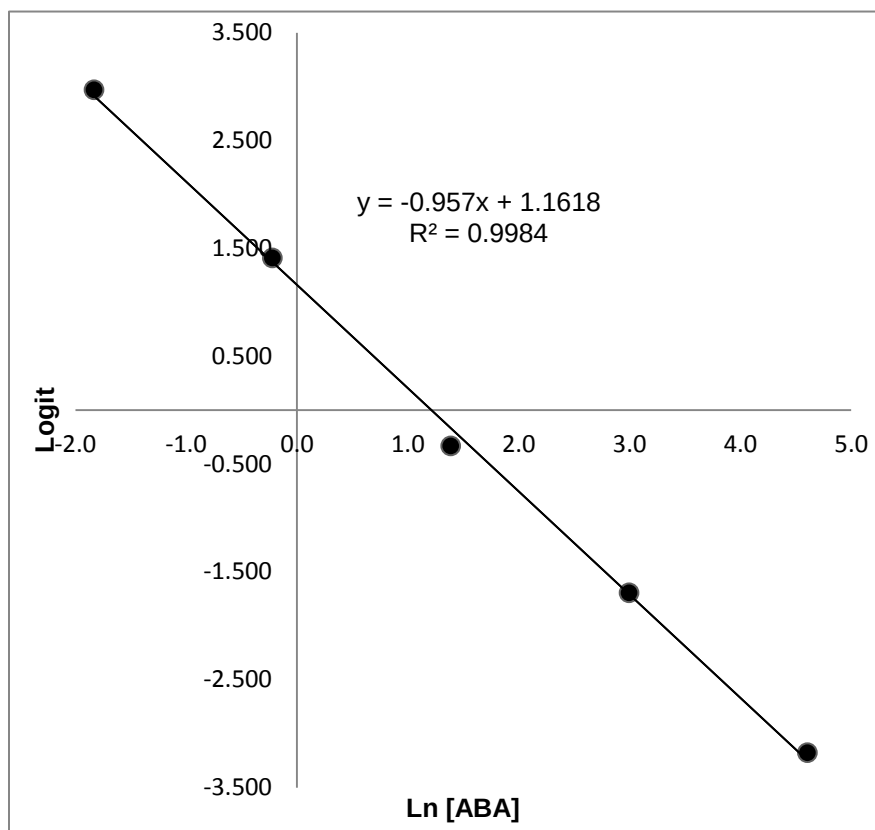


Figura 27. Curva patrón de ABA. Curva patrón de ABA obtenida mediante la unión de éste a anticuerpos monoclonales según Phytodetek® ABA Test Kit.

- Tomando en cuenta la ecuación de la recta, sustituyendo el valor de Logit obtenido previamente y tomando en cuenta que la cantidad de extracto fue de 0.5 mL, se obtiene la concentración de ABA en la muestra tomando en cuenta la siguiente ecuación:

$$\frac{ABA \text{ (pmoles)}}{g \text{ tejido fresco}} = \frac{e^{[(logit-1.1618)/-0.957]} * 0.5}{cantidad \text{ de tejido fresco}}$$

Donde **e** es el valor de la constante e

0.5 es la cantidad de extracto

-0.957 es la pendiente de la curva patrón