



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Caracterización transcripcional de los genes
HR4 y *WRKYs* de *Arabidopsis thaliana* en la
interacción con *Trichoderma atroviride*”**

Tesis que presenta

Jorge Sáenz Mata

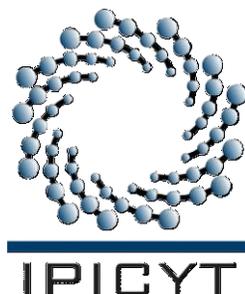
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2012



Constancia de aprobación de la tesis

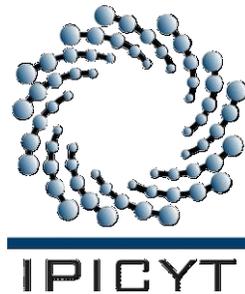
La tesis “**Caracterización transcripcional de los genes *HR4* y *WRKYs* de *Arabidopsis thaliana* en la interacción con *Trichoderma atroviride*”** presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jorge Sáenz Mata** y aprobada el **1 de agosto de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Miembro del Comité Tutorial)

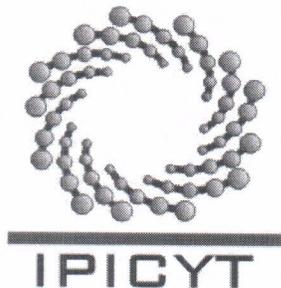
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 223328) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 046 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 9 días del mes de agosto del año 2012, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jorge Sáenz Mata

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización transcripcional de los genes HR4 y WRKYs de Arabidopsis thaliana en la interacción con Trichoderma atroviride

que se desarrolló bajo la dirección de

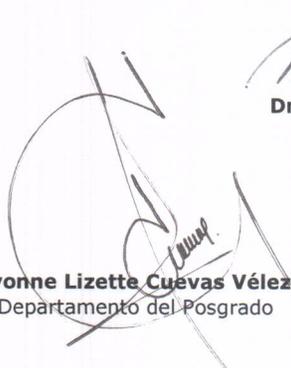
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

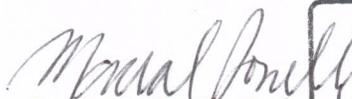
El Jurado, después de deliberar, determinó

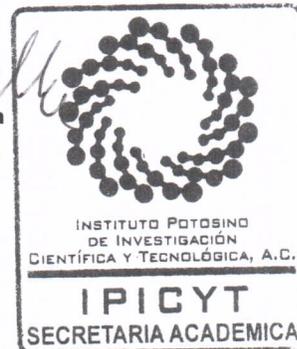
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 9 días del mes de agosto de 2012.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Con mucho amor y cariño...

A mis Padres, José Luis y Ramona

A mi compañera de vida y futura esposa, Zazil

A mis hermanos y sus familias, Francisco, José Luis y Yasmin

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por sus asesoría, consejos, confianza y apoyo en todo momento.

A los Dres. Ángel Gabriel Alpuche Solís, Gerardo Rafael Argüello Astorga y Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por sus valiosas aportaciones en mi trabajo y por su tiempo en la revisión de mi tesis.

A todos los profesores de la División de Biología Molecular por sus valiosas enseñanzas.

A la M.C. Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico y por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 7, muy especialmente a Silvia, Azucena, Fátima, Luz y Pablo por todos los gratos momentos compartidos y por su amistad.

A Zazil por todo lo compartido, por su amor y por su apoyo incondicional en todo momento. Así como a su familia por su apoyo desinteresado en todo momento.

A mi familia por su apoyo en todo momento, a amigos y a todas las personas que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada 223328.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por la oportunidad y apoyo institucional.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Interacción planta-microorganismo	2
1.2. Microorganismos benéficos.	2
1.3. Respuesta de la planta hacia los microorganismos benéficos	4
1.4. Hongos biocontroladores	5
1.5. <i>Trichoderma</i> spp.	6
1.5.1. Efecto de <i>Trichoderma</i> en plantas	7
1.6. Establecimiento de la interacción Planta- <i>Trichoderma</i>	8
1.6.1. Respuesta de la planta a <i>Trichoderma</i> spp.	11
1.6.2. Mejora del crecimiento y resistencia a estrés abiótico en plantas	12
1.7. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	13
1.8. Transcriptómica para el estudio de la interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Trichoderma</i>	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GENERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3. METODOLOGÍA (Sección Microarreglo)	20
3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	20
3.2. Condiciones de crecimiento del hongo e inoculación de plántulas	20
3.3. Extracción de RNA total de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.4. Preparación de RNA para el envío	21

3.5. Microarreglo	21
4. RESULTADOS	24
Capítulo 1. Microarreglos de la interacción de <i>Arabidopsis thaliana</i> con el hongo benéfico <i>Trichoderma atroviride</i>	24
Capítulo 2. HR4 Gene Is Induced in the <i>Arabidopsis-Trichoderma atroviride</i> Beneficial Interaction	32
Capítulo 3. Evaluación de la expresión de factores de transcripción de tipo WRKY en la interacción benéfica <i>Arabidopsis thaliana-Trichoderma atroviride</i>	43
5. CONCLUSIONES	59
6. REFERENCIAS	61

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Efectos de los hongos biocontroladores (BFC) en plantas	5
Figura 2. Interacción de <i>Trichoderma</i> con la raíz y otros organismos en la rizósfera	10
Figura 3. Esquema de un típico microarreglo de cDNA para el análisis de expresión de genes	23
Capítulo 1	
Figura 4. Interacción <i>Arabidopsis-Trichoderma</i>	25
Figura 5. Diagrama de Venn de los resultados de los microarreglos	26
Figura 6. Vista global de los genes involucrados en estrés biótico usando el programa Mapman	29
Figura 7. Diagramas de Mapman de respuesta celular	30
Capítulo 3	
Figura 1. interacción <i>Arabidopsis-Trichoderma</i>	56
Figura 2. Análisis transcripcional de los genes <i>WRKY8</i> , <i>WRKY33</i> y <i>WRKY57</i>	59
Figura 3. Análisis transcripcional de los genes <i>WRKY42</i> y <i>WRKY60</i>	61
Figura 4. Análisis transcripcional de los genes <i>WRKY38</i> , <i>WRKY54</i> y <i>WRKY70</i>	64

Resumen

“Caracterización transcripcional de los genes *HR4* y *WRKYs* de *Arabidopsis thaliana* en la interacción con *Trichoderma atroviride*”

En el presente trabajo se analizó la respuesta de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* a la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*. Para ello se realizaron microarreglos de la interacción *in vitro* de plántulas de *A. thaliana* con *T. atroviride*. De los resultados de los microarreglos de *Arabidopsis* seleccionamos al gene *HR4* y a ocho factores de transcripción del tipo *WRKY* para estudiar sus patrones transcripcionales durante dicha interacción.

El gen *HR4* es homólogo de los genes *RPW8.1* y *RPW8.2* presentes en *A. thaliana* ecotipo Ms-0, los cuales son genes *R* que confieren resistencia al “powdery mildew” por medio de la activación de la ruta del ácido salicílico (SA). Como resultado de la caracterización transcripcional de este gen, observamos que el transcrito se incrementa en respuesta a la colonización del hongo, tanto en interacción directa como en interacción a distancia. Además se caracterizaron los genes *RPW8.1* y *RPW8.2* (Ms-0), observando una fuerte inducción del gen *RPW8.1*, siendo éste el primer reporte de los genes *RPW8* bajo una interacción benéfica.

Continuando con la caracterización del gen *HR4* se midieron los niveles de transcripción en plántulas de *Arabidopsis* en interacción con otros microorganismos tanto benéficos (*Pseudomonas fluorescens*) como patogénicos (*Pseudomonas syringae*) así como en tratamiento con diversas hormonas. A pesar que el ecotipo Col-0 de *Arabidopsis thaliana* es el más estudiado, el gen *HR4* no había sido previamente caracterizado, así los datos obtenidos aquí sobre este gen proveen importante información de su regulación en interacciones benéficas.

En relación a los factores de transcripción se analizaron: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*. La mayoría de estos genes respondieron incrementando su transcripción a medida que se establecía la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*. En contraste el gen *WRKY8* disminuyó fuertemente su transcrito en la interacción. Algunos de estos factores de transcripción han sido caracterizados en interacciones con microorganismos patógenos, pero poco se sabe de su comportamiento en interacciones benéficas.

El modelo de estudio *Arabidopsis-Trichoderma* es muy interesante debido a que se caracterizar molecular y funcionalmente genes involucrados en la respuesta de la planta a este hongo benéfico. Los datos presentados en este trabajo, son relevantes ya que es el primer reporte de caracterización transcripcional de genes *R* y factores de transcripción *WRKY* de *Arabidopsis* en interacción con el microorganismo benéfico *Trichoderma atroviride*.

Palabras Clave: *Arabidopsis thaliana*; *HR4*; *RPW8*; *WRKYs*; *Trichoderma atroviride*

Abstract

“Transcriptional characterization of *HR4* and *WRKY* genes of *Arabidopsis thaliana* in interaction with *Trichoderma atroviride*”

In this study, we investigated the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* in interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. For this purpose microarrays were performed of *Arabidopsis-Trichoderma* interaction. From the microarrays data the *HR4* gene and eight *WRKY* genes were selected for their transcriptional characterization.

The *HR4* gene is homologous to *RPW8.1* and *RPW8.2* genes in *Arabidopsis thaliana* ecotype Ms-0, which confer resistance to Powdery mildew fungi. *HR4* gene was selected for transcriptional characterization in *Arabidopsis* seedlings interacting with the beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. We observed the induction of the *HR4* gene mainly at 96 hpi when the fungus interaction was established. Furthermore, we found that the *HR4* gene was differentially regulated in interactions with the beneficial bacterium *Pseudomonas fluorescens* and the pathogenic bacterium *P. syringae*. When hormone treatments were applied to *A. thaliana* (Col-0), each hormone treatment induced changes in *HR4* gene expression. On the other hand, the expression of the *RPW8.1* and *RPW8.2* genes of *Arabidopsis* ecotype Ms-0 in interaction with *T. atroviride* was assessed. Interestingly, these genes are interaction-responsive; in particular, the *RPW8.1* gene shows a very high level of expression in the later stages of interaction. These results indicate that *HR4* and *RPW8* genes could play a role in the establishment of *Arabidopsis* interactions with beneficial microbes.

In relation to transcription factors were analyzed: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* and *WRKY70*. Most of these genes respond by increased its transcription, as the *Arabidopsis-Trichoderma* interaction was development. In contrast *WRKY8* strongly decreased its transcription in the interaction. Some of these transcription factors have been characterized in interactions with pathogens, but little is known about their behavior in beneficial interactions.

The *Arabidopsis-Trichoderma* study model has advanced considerably at last years, but much still remains to be elucidated, the data presented here are relevant because it is the first report of transcriptional characterization of *R* gene and *WRKY* transcription factors in *Arabidopsis* interaction with beneficial microbe *Trichoderma atroviride*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; *HR4*; *RPW8*; *WRKYs*; *Trichoderma atroviride*

1. INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la vida sobre la tierra los organismos fotosintéticos han moldeado la atmosfera del planeta, al fijar el dióxido de carbono y enriquecer el ambiente con oxígeno, permitiendo el desarrollo de otros organismos tanto fotosintéticos como no fotosintéticos. De las plantas como productores primarios, dependen directa o indirectamente los organismos heterótrofos. Desde el inicio de la historia del hombre se ha utilizado a las plantas para diversos fines tales como vivienda, vestido, alimentación y medicinas. Desde los inicios de la agricultura hasta nuestros tiempos, las plantas han sido y seguirán siendo la principal fuente de alimentación para la humanidad. Por lo anterior es de gran importancia el estudio de las condiciones que afectan a estos organismos, su biología y la interacción con otros organismos.

Las plantas, al ser organismos sésiles se encuentran sometidos frecuentemente a condiciones de estrés biótico y abiótico. Dentro del estrés biótico los organismos patógenos de plantas representan una de las condiciones adversas más desafiantes para las plantas. Por otro lado también existe una gran diversidad de organismos que les aportan un beneficio. Las plantas han desarrollado diversas herramientas que le permiten distinguir entre organismos que causan daño y los que aportan beneficios, lo que le permite evadir o establecer interacciones entre estos organismos.

Los microorganismos pueden encontrarse en casi todos los nichos ecológicos. Las plantas pueden proveer una variedad de nutrientes y de esta manera son hospederos atractivos para los microorganismos. Los microorganismos son encontrados sobre la superficie de las plantas (epífitos) o dentro de los tejidos de las plantas (endófitos). Las plantas proporcionan tres ambientes muy diferentes para la microbiota, como la rizósfera, donde los microorganismos están asociados con las raíces o suelo, esta contiene una gran cantidad de exudados de la planta; por otro lado esta la endósfera, en esta los microorganismos se encuentran dentro de los tejidos de la planta, y por último, la filósfera la cual es un ambiente hostil para los microorganismos, debido a la

limitada disponibilidad de nutrientes, la exposición a radiaciones solar y la variable disponibilidad de agua (Walker et al. 2003; Berlec 2012).

1.1. Interacción planta-microorganismo

Los microorganismos asociados a plantas generalmente se consideran en tres grupos: patógenos, mutualistas y comensales. Los microorganismos patógenos son los que han sido más estudiados debido a su importancia económica en la agricultura por los daños que estos ocasionan (Stukenbrock & McDonald 2008). Los comensales por definición no le causan ningún daño ni beneficio a la planta, sin embargo, en estudios recientes se muestra que los comensales no son una colección al azar de microorganismos, sino que son regulados por las plantas (Gottel et al. 2011; Redford et al. 2010). Las interacciones mutualistas o benéficas son aquellas en las que los microorganismos ejercen un efecto positivo en la planta. Las interacciones benéficas entre plantas y microorganismos son muy frecuentes en la naturaleza, estas a menudo ocurren en la rizósfera, y mejoran el crecimiento o ayudan a la planta a contrarrestar y superar diversos agobios. Debido a lo anterior la investigación y la aplicación en la agricultura de estos organismos esta creciendo rápidamente por sus diversas ventajas en comparación a los fertilizantes y pesticidas químicos (Berg 2009).

1.2. Microorganismos benéficos

Nuestra comprensión de la biología, bioquímica y genética de las interacciones benéficas se ha incrementado considerablemente durante los últimos años debido a que la investigación se ha dirigido a selectos modelos de estudio. Ejemplos bien conocidos de microorganismos benéficos son las micorrizas que pueden establecer simbiosis con aproximadamente el 80% de todas las especies de plantas terrestres (Selosse & Rousset 2011). Las micorrizas adquieren nutrientes y agua del suelo, y la entregan a las raíces de las plantas por

medio de estructuras tipo arbusculares en las células corticales, a cambio de compuestos fotosintéticos (Harrison 2005; Uehlein et al. 2007). Las bacterias del género *Rhizobium* establecen una relación simbiótica íntima con plantas leguminosas, la cual culmina en un reconocimiento mutuo, y el desarrollo de estructuras simbióticas llamadas nódulos, en las cuales estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico, el cual incrementa el contenido de clorofila, el crecimiento y la productividad de la planta, además de ser una alternativa a los fertilizantes químicos nitrogenados que son costosos y generan diversos problemas ambientales (Spaink 2000; Mia & Shamsuddin 2010). Las asociaciones benéficas también incluyen interacciones no simbióticas de PGPR o PGPF (por sus siglas en inglés, que significan Plant Growth Promoting Rhizobacteria o Plant Growth Promoting Fungi, es decir rizobacterias y hongos promotores de crecimiento vegetal, respectivamente) de diversos géneros, los cuales pueden estimular el crecimiento de las plantas a través de la degradación de contaminantes del suelo a través de la fitoestimulación, la producción de fitohormonas o suprimiendo las enfermedades y plagas en plantas (Harman et al. 2004; Kloepper et al. 2004; Pozo & Azcón-Aguilar 2007; Shores et al. 2010). Dentro de los PGPF encontramos los hongos biocontroladores de los cuales trataremos más adelante.

El establecimiento de una asociación benéfica requiere un mutuo reconocimiento y una coordinación muy precisa de la respuesta de la planta y el microorganismo. La simbiosis de rizobios y micorrizas comparten una vía de señalización simbiótica en común (Sym), la cual es activada en las células de la planta con la percepción de los factores de nodulación (Nod) de rizobios y los factores Myc de micorrizas (Bonfante & Requena 2011; Oldroyd et al. 2009). Interesantemente, parece que ciertos componentes de la vía Sym pueden también ser activados por microorganismos benéficos no simbióticos, tal como las PGPR, sugiriendo que las vías de señalización en la planta activadas por diferentes microorganismos benéficos son parcialmente convergentes (Arnould et al. 2005; Zamioudis & Pieterse 2012).

1.3. Respuesta de la planta hacia los microorganismos benéficos

Tanto los microorganismos simbióticos como los no simbióticos son inicialmente reconocidos como organismos extraños a la planta. Por consiguiente, es fundamental una activa interferencia con el sistema inmune de la planta para el establecimiento de una relación mutualista íntima (Jones & Dangl 2006). Dos estrategias han sido descritas en plantas para detectar microorganismos; la primera involucra los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y en la segunda encontramos las proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) (Tör et al. 2009). En plantas la señalización de la respuesta inmune es iniciada con la percepción mediada por receptores (PRRs y R) de moléculas ajenas que son a menudo conservadas entre diferentes clases de microorganismos, tanto benéficos como patógenos. Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) (Dodds & Rathjen 2010). Las plantas también responden a moléculas endógenas liberadas en el proceso de invasión de los microorganismos, tales como fragmentos de pared celular o cuticular, estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs) (Lotze et al. 2007). Las PAMPs, MAMPs o DAMPs son reconocidas por PRRs, el reconocimiento de patrones moleculares culmina en la respuesta denominada inmunidad activada por MAMPs (MTI). La segunda estrategia de percepción de microorganismos involucra el reconocimiento de efectores de microorganismos, llevado a cabo por receptores intracelulares (proteínas R). Este reconocimiento induce la inmunidad activada por efectores (ETI), la cual ha llevado a una co-evolución dinámica entre la planta y el microorganismo. Los efectores son particularmente variables y prescindibles en contraste con PAMPs y MAMPs (Zamioudis & Pieterse 2012; Gururani et al. 2012).

1.4. Hongos biocontroladores

Los hongos biocontroladores (BCF) son organismos benéficos que reducen los efectos negativos de patógenos de plantas y promueven una respuesta positiva en la planta hacia distintas adversidades. Actualmente se sabe que la habilidad de controlar enfermedades es solo uno de los beneficios que puede ejercer estos hongos sobre las plantas. Además de la actividad biocontroladora, también pueden ayudar a romper la latencia de las semillas e incrementan la tasa de germinación (Delgado-Sánchez et al. 2011), mejoran la eficiencia fotosintética, especialmente en plantas expuestas a varios estreses (Mastouri et al. 2010), mejoran la eficiencia en el uso del nitrógeno, también pueden inducir una resistencia local y sistémica a una gran variedad de patógenos de plantas (Figura 1) (Shoresh et al. 2010).

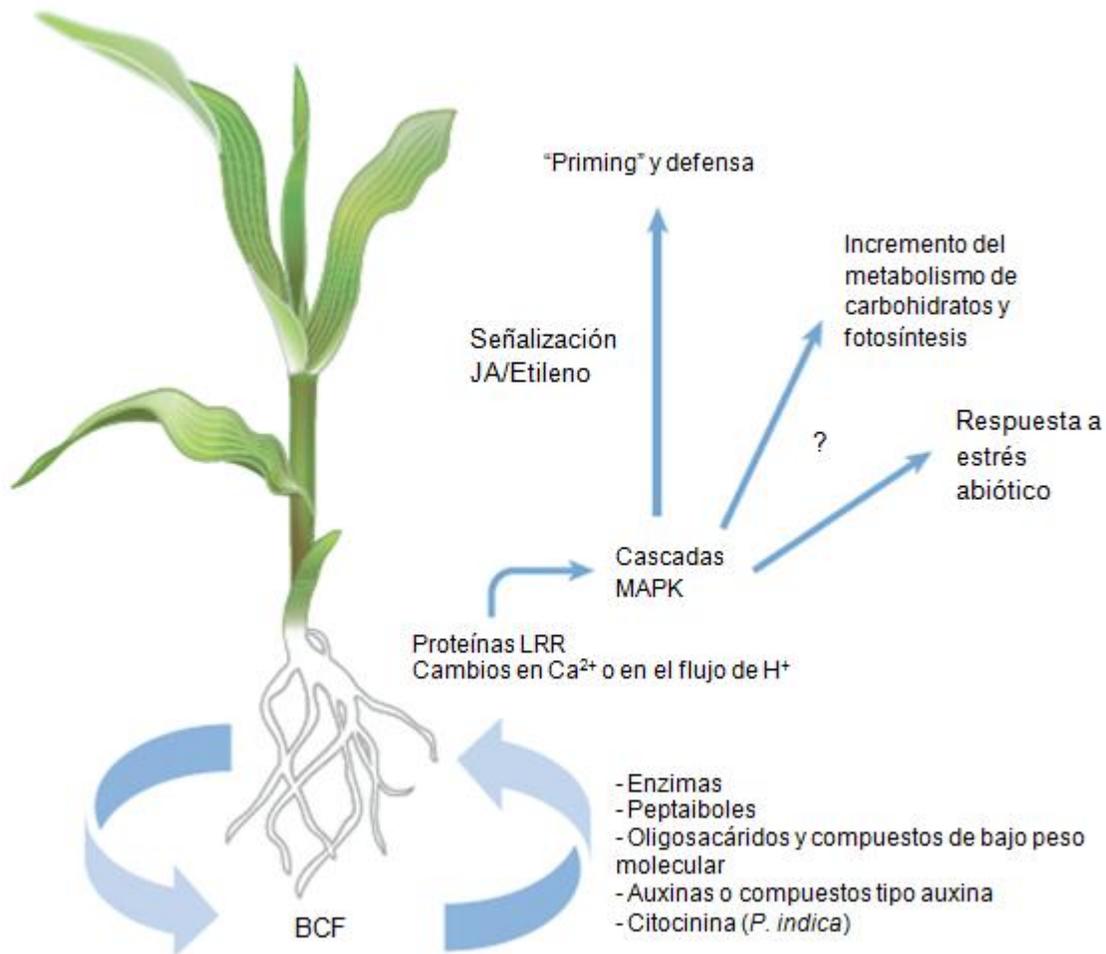


Figura 1. Efectos de los hongos biocontroladores (BFC) en plantas. En primer termino, los BCF y las plantas liberan una gran variedad de compuestos que permiten el reconocimiento mutuo de los organismos para el establecimiento de la interacción. La planta reconoce las señales de BCF por medio de receptores como las proteínas con repetidos ricos en leucina (LRR), este reconocimiento genera grandes cambios en la planta, como variación en los niveles de Ca^{2+} y flujo de H^+ , también hay una activación de las cascadas de las MAPK (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos) que culmina en la activación de la respuesta de defensa y “priming”, además incrementa el metabolismo de carbohidratos y la fotosíntesis, así como la respuesta al estrés biótico. Imagen tomada y modificada de Shores et al. 2010.

1.5. *Trichoderma* spp.

La necesidad por incrementar la productividad y calidad en la agricultura ha llevado a un excesivo uso de productos químicos como los fertilizantes y pesticidas, creando serios problemas de contaminación ambiental. El uso de biofertilizantes y biopesticidas es una alternativa para incrementar la producción con bajo impacto ecológico. El potencial de los microorganismos biocontroladores se ha subestimado en las actividades agrícolas, y a pesar que su uso en la actualidad se ha incrementado en gran medida, aun se puede mejorar e incrementar. Una de las opciones más usadas y con gran potencial en la aplicación en cultivos por su amplio espectro y por los diversos beneficios que aportan a las plantas son los hongos del genero *Trichoderma* (Harman et al. 2004). *Trichoderma* (Teleomorfo *Hypocrea*) es un género de hongos que con frecuencia es encontrado en el suelo, creciendo sobre madera, corteza, en otros hongos y muchos otros sustratos, demostrando su alto potencial oportunista y su adaptabilidad a innumerables condiciones ecológicas (Lorito et al. 2010; Druzhinina et al. 2011). Han pasado 80 años desde el descubrimiento de la habilidad de *Trichoderma* de atacar y controlar hongos patógenos. Los mecanismos involucrados en el biocontrol de patógenos de plantas por

Trichoderma son: micoparasitismo, producción de antibióticos y competencia por nutrientes en la rizósfera (Lorito et al. 2010). Durante el proceso de micoparasitismo, el hongo primero explora su alrededor para localizar su blanco, por medio de la producción constitutiva de enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs) acoplado con un sistema de detección muy sensitivo de fragmentos de pared celular liberados por la presa. La expresión de CWDEs fungitóxicas es inducida y estas se difunden hacia la presa. Esta detección estimula el crecimiento hacia el hongo a atacar. Una vez que los hongos entran en contacto, *Trichoderma* spp. se enreda y formar apresorios en la superficie del huésped (Grondona et al. 1997). Además se producen enzimas y antibióticos que matan o degradan la hifa blanco y permiten la penetración de *Trichoderma* (Adams 1990; Howell 2003).

1.5.1. Efecto de *Trichoderma* en plantas

Además de la habilidad de *Trichoderma* spp. de atacar o inhibir directamente el crecimiento de patógenos de plantas, también se ha reportado que estos activan una resistencia localizada y sistémica a una gran variedad de patógenos de plantas (Shoresh et al. 2005; Yedidia et al. 2003). Por otra parte, ciertas cepas tienen substancial influencia en el crecimiento y desarrollo de diversas especies vegetales. Este incremento en el crecimiento de las plantas se conoce desde hace algunos años y puede ocurrir tanto en sistemas axénicos (Yedidia et al. 2001; Contreras-Cornejo et al. 2009) como en sistemas de suelos en campo (Harman 2000). Estos descubrimientos relativamente nuevos están cambiando dramáticamente nuestro conocimiento de los mecanismos de acción y usos de estos hongos en la agricultura, además nos permite entender los roles de *Trichoderma* en la naturaleza y en el manejo de los ecosistemas (Harman et al. 2004).

1.6. Establecimiento de la interacción Planta-*Trichoderma*

Es muy común encontrar cepas de *Trichoderma* en ecosistemas de raíces (Tsahouridou & Thanassouloupoulos 2002). De la misma manera que en las micorrizas, los exudados de las raíces, como los polisacáridos, mono y disacáridos fomentan el crecimiento de los hongos en la rizósfera. Se ha observado que la sacarosa derivada de la planta es un recurso muy importante para las células de *Trichoderma*, facilitando la colonización, coordinando el mecanismo de defensa e incrementando la fijación de CO₂ en hojas (Vargas et al. 2009), además se han descrito transportadores de solutos, así como un sistema intracelular invertasa-permeasa, los cuales están involucrados en la adquisición de exudados de raíz de las plantas (Figura 2) (Vizcaíno et al. 2006). Las cepas de *Trichoderma* con la habilidad de colonizar raíces de plantas, tienen un amplio espectro de hospederos ya que son capaces de colonizar las raíces de las plantas tanto dico como monocotiledóneas (Shoresh et al. 2010). Durante este proceso las hifas de *Trichoderma* se enredan en las raíces y forman estructuras tipo apresorios para finalmente penetrar hasta el córtex de la raíz. Una vez dentro de la raíz, el hongo tiene acceso a los nutrientes de la planta, los cuales le permiten proliferar, además incrementan el crecimiento de la raíz significativamente, proveyendo así más nichos para la colonización y crecimiento del hongo (Brotman et al. 2008). La colonización involucra la habilidad para reconocer, adherirse y penetrar a las raíces, resistir metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión y establecerse (Druzhinina et al. 2011). En *Trichoderma* la adherencia a la superficie de la raíz puede ser mediada por hidrofobinas, las cuales son pequeñas proteínas hidrofóbicas de la capa más externa de la pared celular que protege la superficie celular del hongo. Las proteínas tipo expansinas, están involucradas en el desarrollo de la pared celular en el hongo y además tienen un dominio de unión a celulosa que facilita la colonización de la raíz (Viterbo & Chet 2006). Después de 72 horas de la colonización de las raíces, como resultado del establecimiento del hongo en la planta, se observan células levaduriformes de *Trichoderma*, junto con un reforzamiento de las paredes celulares corticales y

epidermales en la raíz de la planta, así como la deposición de nuevas barreras formadas con grandes cantidades de callosa y celulosa (Chacón et al. 2007). Este reforzamiento de las paredes celulares en las células de la raíz, son eficientes en la restricción del crecimiento del hongo en los espacios intercelulares de la epidermis y córtex de la raíz, previniendo la entrada de *Trichoderma* a los haces vasculares (Yedidia et al. 1999). Las plantas también responden a la invasión del hongo por medio de la síntesis y acumulación de compuestos antimicrobianos. La habilidad de las cepas de *Trichoderma* para colonizar las raíces de las plantas depende en gran medida en tolerar estos compuestos antimicrobianos. Esta resistencia a sido asociada a la presencia de sistemas de transportadores ABC (Ruocco et al. 2009), con una rápida degradación de compuestos fenólicos exudados de las plantas (Chen et al. 2011), y con la supresión de la producción de fitoalexinas (Masunaka et al. 2011). También se ha identificado en *T. harzianum* y *T. atroviride* una proteína pequeña rica en cisteína secretada (SSCP) (Fig. 2), la cual es homóloga a la proteína de avirulencia Avr4 de *Cladosporium fulvum* y ha sido propuesto que la unión de Avr4 a quitina puede proteger a *Trichoderma* contra las quitinasas de la planta (Harman et al. 2004; Stergiopoulos & de Wit 2009).

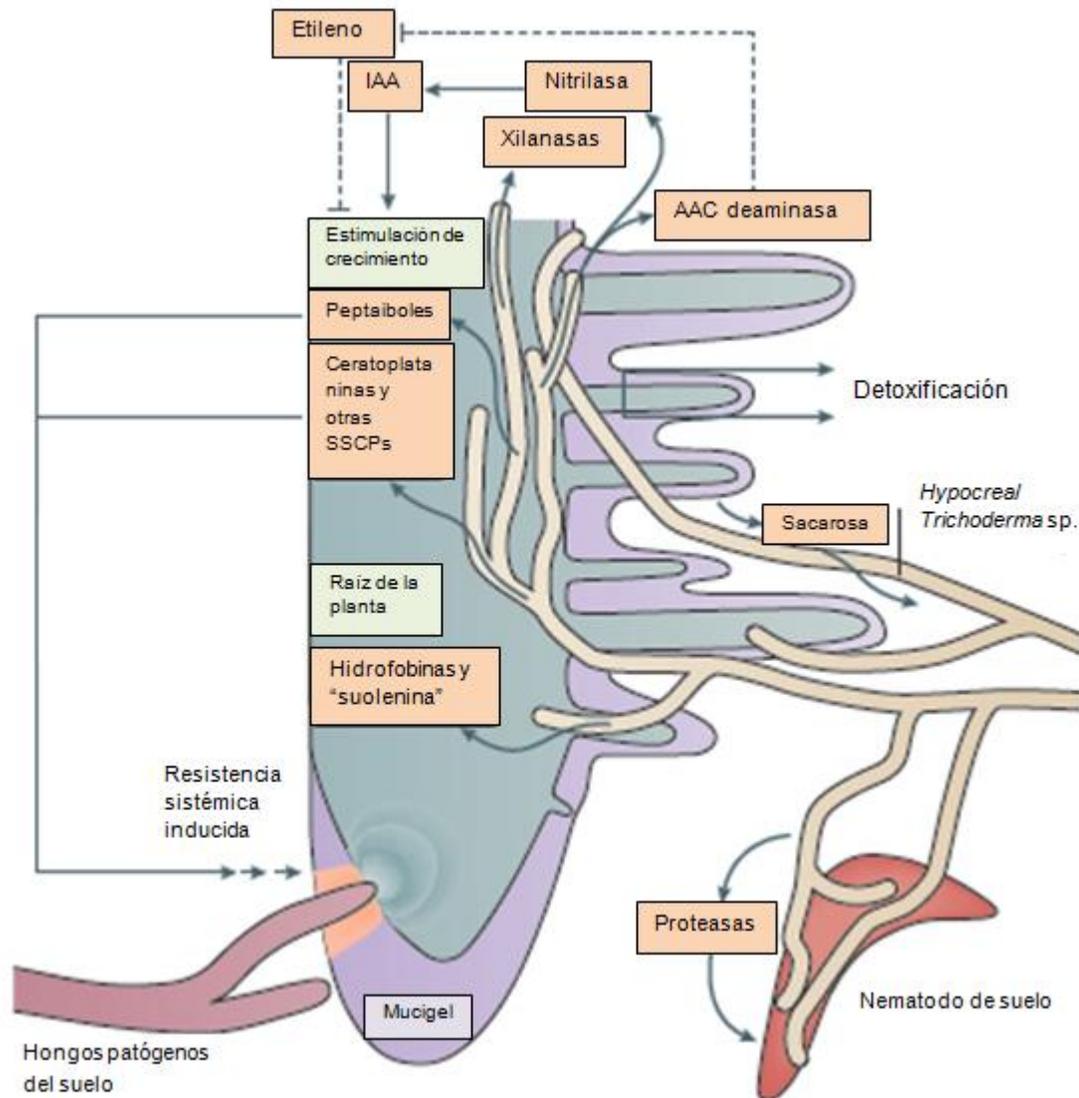


Figura 2. Interacción de *Trichoderma* con la raíz y otros organismos en la rizósfera. Las hifas de *Trichoderma* spp. liberan componentes que activan la resistencia sistémica en la planta que la protege contra el ataque de microorganismos patógenos. La deaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) liberada por el hongo inhibe la formación de etileno en la planta y esto permite un incremento en el crecimiento de la raíz, una secreción constitutiva de nitrilasa por el hongo puede ayudar en la formación de la auxina ácido 3-indol acético (IAA) implicada en el desarrollo de la raíz. Finalmente el hongo se beneficia de las raíces de la planta recibiendo sacarosa como fuente de carbón. El hongo por su actividad biocontroladora también ataca otros

microorganismos patógenos y nematodos, los cuales son habitantes de la rizósfera. Imagen tomada y modificada de Druzhinina et al. 2011.

1.6.1. Respuesta de la planta a *Trichoderma* spp.

Las plantas responden a la interacción con microorganismos activando vías hormonales que le permiten afrontarlos apropiadamente de acuerdo al estilo de vida del microorganismo. De esta manera las plantas activan una respuesta sistémica adquirida (SAR) inducida principalmente por microorganismos patógenos de plantas y en la cual el ácido salicílico (SA) funge como molécula señalizadora y de activación de respuesta de defensa. Por otro lado se ha reportado que *Trichoderma* spp. al igual que otros microorganismos no patógenos de plantas, activa una resistencia sistémica inducida (ISR) la cual culmina en la acumulación de componentes asociados a las vías de señalización de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Como ya se mencionó antes, las plantas tienen dos estrategias para reconocer y responder a los microorganismos (las cuales han sido mejor descritas para patógenos), como en otros microorganismos benéficos se espera que *Trichoderma* no active la segunda etapa de la respuesta inmune innata, asociada a la SAR. Sin embargo, existen reportes de la activación de SAR por *T. asperellum* en plantas de pepino, siendo está de manera dependiente de la concentración del hongo y puede ocurrir en las etapas tempranas de la interacción con el hongo (Segarra et al. 2007). Cabe señalar que estos efectos han sido estudiados sólo en pocas especies y cepas de *Trichoderma*, aún falta mucho por dilucidar acerca de los mecanismos de señalización que activa este hongo benéfico en las plantas. Hasta ahora se han reportado diversas respuestas de la plantas como consecuencia de la colonización de *Trichoderma*. Recientes trabajos reportan estas respuestas: 1) la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *T. atroviride* activa una expresión retrasada o sobrelapada de genes relacionados a defensa de las vías de SA y JA/ET contra fitopatógenos biotróficos y necrotróficos, de manera local y sistemáticamente (Salas-Marina et al. 2011), 2) *Trichoderma* es capaz de desencadenar una sobrerregulación duradera de genes marcadores de

SA en plantas no expuestas a patógenos, sin embargo cuando las plantas son infectadas por un patógeno como *Botrytis cinerea*, el pre-tratamiento con *Trichoderma* puede modular la expresión de genes dependientes de SA e inmediatamente después de la infección ocurre la inducción de genes de defensa por medio de la vía de transducción de señales de JA, causando una respuesta de ISR que se incrementa con el tiempo (Tucci et al. 2011), 3) las raíces de *Arabidopsis* colonizadas por *T. asperellum* SKT-1 producen una clara ISR en la que se incrementa la expresión de genes inducidos por SA como *PR-1*, *PR-2* y *PR-5*, por otro lado la expresión de genes inducidos por JA/ET como *PDF1.2*, *PR-3* y *PR-4* también se inducen aunque en niveles menores a los genes inducidos por SA. También se ensayaron filtrados de cultivos de *T. asperellum* SKT-1 en plantas de *Arabidopsis*, observándose que estos filtrados activan la ISR por medio del incremento de los genes inducidos por SA, así como de genes inducidos por JA/ET en niveles similares (Yoshioka et al. 2012).

1.6.2. Mejora del crecimiento y resistencia a estrés abiótico en plantas

Como ya se mencionó antes, ciertas especies de *Trichoderma* tienen efectos benéficos en el crecimiento de las plantas y además mejoran la resistencia a estreses bióticos y abióticos. Los primeros trabajos donde se reportó que *Trichoderma* promueve el crecimiento fueron en plantas de rábano, chile, pepino y tomate (Baker et al. 1984). Estudios posteriores demostraron que *Trichoderma* incrementa el desarrollo de las raíces y el rendimiento de los cultivos, la proliferación de raíces secundarias y el peso fresco en plántulas y área foliar (Harman 2000). Se ha reportado que *T. harzianum* puede solubilizar varios nutrientes para las plantas. Además se sabe que la colonización de raíces de pepino por *T. asperellum* incrementó la disponibilidad de Fe y P, con significantes incrementos en el peso seco y la parte aérea de las plantas (Yedidia et al. 2001). Recientemente se demostró el efecto del fondo genético de las plantas en la interacción entre diferentes líneas de tomates (cuatro cultivares y una silvestre) y dos cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. harzianum*), y aunque en algunas

líneas de tomates el efecto de crecimiento era más que evidente, en al menos un cultivar de tomate los tratamientos de *Trichoderma* no ejercieron ninguna promoción de crecimiento e incluso fue disminuido (Tucci et al. 2011). La actividad de promoción de crecimiento de *T. atroviride* en plántulas de tomate ha sido sugerida que está asociada con la reducida producción de ET de la planta, resultado de la disminución de su precursor el ácido 1-amiciiclopropano-1-carbocílico (ACC), a través de la actividad de la ACC deaminasa (ACCD) presente en el microorganismo (Viterbo et al. 2010; Gravel et al. 2007). Además se ha reportado que diversas especies de *Trichoderma* producen auxinas que son capaces de estimular el crecimiento de la planta y el desarrollo de la raíz (Fig. 2) (Contreras-Cornejo et al. 2009; Gravel et al. 2007). En plantas de maíz colonizadas por *T. virens* también se incrementa las tasas fotosintéticas y la toma de CO₂ en hojas (Vargas et al. 2009).

El efecto benéfico de *Trichoderma* en el estrés abiótico ya ha sido documentado (Donoso et al. 2008; Bae et al. 2009), aunque el mecanismo para aminorar el estrés en plantas es aún desconocido. Recientemente Mastouri et al. 2010 reportaron que el tratamiento de semillas de tomate con *T. harzianum* acelera la germinación de las semillas, incrementa el vigor de las plantas y aminora los estreses por sequía, choque osmótico, salinidad, frío y calor, induciendo la protección fisiológica en plantas contra el daño oxidativo. También se ha reportado la influencia de *T. koningii* y *T. harzianum* en el rompimiento de la dormancia y la germinación de semillas de especies de Opuntias (*O. streptacantha* y *O. leucotricha*). Las semillas inoculadas con *Trichoderma* incrementaron su tasa de germinación hasta un 91% comparado a las semillas no inoculadas, (Delgado-Sánchez et al. 2011; Delgado-Sánchez et al. 2010).

1.7. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es una planta pequeña de la familia de las mostazas (*Brassicaceae*) que ha llegado a ser el sistema modelo de elección para la investigación en biología de plantas. Se han realizado significantes avances en el

entendimiento de procesos como el crecimiento y desarrollo, dirigiendo la investigación en la genética molecular de esta simple angiosperma. *Arabidopsis* fue originalmente adoptada como un organismo modelo debido a su utilidad para experimentos genéticos. Características importantes como un ciclo de vida corto (seis semanas) y un tamaño pequeño (15-20 cm) que facilita crecerla en espacios reducidos, además puede crecer en placas de Petri o macetas bajo luces fluorescentes o en condiciones de invernadero, sus flores se autopolinizan naturalmente produciendo una prolífica cantidad de semillas (aproximadamente 5000 semillas por planta), entre otras ventajas. Aunque las características anteriores siguen siendo importantes para el estudio de esta planta, otras características a nivel genético también sobresalen; tiene uno de los genomas más pequeños de plantas con 125 Mb organizado en cinco cromosomas que contienen un aproximado de 29,454 genes predichos. Se han desarrollado métodos que facilitan el estudio de *Arabidopsis*, estos incluyen procedimientos para mutagénesis insercional y química, eficientes métodos para realizar cruces e introducir DNA a través de transformación de plantas usando a *Agrobacterium*, extensivas colecciones de mutantes insercionales y bases de datos donde se concentra información del genoma, genes y proteínas (TAIR) (Meinke 1998; Koornneef & Meinke 2010; Alonso 2003). Los estudios de expresión génica global por medio del uso de microarreglos de *Arabidopsis* son otra herramienta muy importante que ha facilitado el estudio del transcriptoma de esta planta modelo y de otras plantas relacionadas o de interés agronómico (Aharoni & Vorst 2002).

Arabidopsis thaliana ha facilitado en gran medida la disección genética de las bases de la patogenicidad microbiana y de las interacciones benéficas de microorganismos en plantas. Aunque se conoce mucho más sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción planta-patógeno, también se ha avanzado en el estudio de interacciones benéficas usando como modelo de estudio a *Arabidopsis*. La incursión en el modelo *Arabidopsis*-*Trichoderma* ha incrementado el conocimiento acerca de los mecanismos fisiológicos y moleculares por medio de los cuales *Trichoderma* modula el crecimiento y desarrollo en las plantas, mejora la resistencia a estreses abióticos y bióticos y

cómo establece la interacción con las plantas (Contreras-Cornejo et al. 2011; 2009).

1.8. Transcriptómica para el estudio de la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*

Se ha reportado que el transcriptoma y el proteoma de las plantas sufren cambios como consecuencia de la colonización de la raíz por *Trichoderma*. Así, el hongo reprograma la expresión génica de la planta, resultando en cambios en la respuesta hacia el ambiente y otros organismos (Morán-Diez et al. 2012; Alfano et al. 2007; Segarra et al. 2007; Shores & Harman 2008; Bae et al. 2011). Los perfiles de expresión génica por medio del uso de microarreglos ha sido reconocida como una poderosa herramienta para obtener una vista global de la expresión de genes y de procesos fisiológicos involucrados en la respuesta a un estímulo particular. En años recientes pocos estudios han reportado cambios en el transcriptoma o proteoma global de plantas colonizadas por especies de *Trichoderma*. *T. hamatum* 382 induce cerca de 40 genes en plantas de tomate, estos genes están asociados con estrés biótico y abiótico, así como metabolismo de RNA, DNA y proteínas (Alfano et al. 2007). En otro estudio proteómico, un total de 205 proteínas expresadas diferencialmente en raíz y parte aérea fueron identificadas en plantas de maíz inoculadas con *T. harzianum* T22 (Shores & Harman 2008). Recientemente se publicó un trabajo donde se reporta el análisis transcripcional global de *Arabidopsis* después de 24 h de incubación en presencia de *T. harzianum* T34, encontraron que genes relacionados a JA y SA disminuyeron su expresión, mientras varios genes relacionados a la respuesta a estrés abiótico (ABA y Auxinas) incrementaron su expresión (Morán-Diez et al. 2012).

En el presente trabajo se analizó la respuesta de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* a la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*. Para obtener una visión general del transcriptoma se realizaron microarreglos de

la interacción *in vitro* de plántulas de 25 días de edad de *A. thaliana* con el hongo benéfico *T. atroviride*, a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación (hpi). De los resultados de los microarreglos se seleccionaron genes con cambios notables en la expresión, para caracterizarlos transcripcionalmente.

Dentro de los genes seleccionados por su incremento en la expresión como respuesta al estímulo del hongo benéfico encontramos el gen *HR4*. Este gen es Homólogo a los genes *RPW8*. El loci *RPW8* (comprende los genes *RPW8.1* y *RPW8.2*) fue primero identificado en el ecotipo Ms-0 de *A. thaliana* que es resistente a los patógenos del “powdery mildew” y el ecotipo susceptible Col-0 contiene el gen *HR4* en lugar de los genes *RPW8.1* y *RPW8.2*. Los genes *RPW8s* confieren resistencia al “powdery mildew” por medio de la activación de la ruta del ácido salicílico, estos genes codifican para proteínas de resistencia (R) atípicas que contiene un dominio “coiled-coil” y un dominio transmembrana al extremo N-terminal. Como resultado de la caracterización transcripcional de este gen, observamos que el transcrito se incrementa en respuesta a la colonización del hongo en especial a las 96 hpi que es cuando se observa la mayor inducción del gen, tanto en interacción directa como en interacción a distancia. Además se caracterizaron los genes *RPW8.1* y *RPW8.2* en el ecotipo Ms-0 de Arabidopsis en interacción con *Trichoderma*, observando una fuerte inducción del gen *RPW8.1* en especial a las 96 hpi. Continuando con la caracterización del gen *HR4* se midieron los niveles de transcripción en plántulas de Arabidopsis en interacción con otros microorganismos tanto benéficos (*Pseudomonas fluorescens*) como patogénico (*Pseudomonas syringae*). También se analizó la transcripción del gen *HR4* en plántulas tratadas con las hormonas SA, Metil Jasmonato (MeJA) y el precursor de ET, etefón.

Además del gen *HR4*, otros genes fueron seleccionados de los microarreglos para caracterizarlos transcripcionalmente, como los genes *WRKY*'s los cuales son un grupo de genes que codifican para factores de transcripción, que se han visto involucrados en la respuesta de las plantas en distintas interacciones con microorganismos. Los genes *WRKY*'s codifican para un grupo mayoritario de

factores de transcripción restringidos al reino vegetal. En *A. thaliana* la familia consiste de 72 miembros, los cuales se dividen en tres familias de acuerdo al número y tipo de dominio WRKY (Thomas Eulgem & Imre E Somssich 2007). Los miembros del grupo I típicamente contienen dos dominios WRKY, mientras la mayoría de las proteínas con un dominio WRKY pertenecen al grupo II. El grupo III también tiene un simple dominio WRKY, pero el patrón del dedo de zinc es único (Kalde et al. 2003). Los genes de este grupo que se caracterizaron transcripcionalmente en *Arabidopsis* durante la interacción con *Trichoderma* fueron: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*. Estos genes se midieron por medio de qRT-PCR en plántulas de 20 días de edad de *Arabidopsis* en interacción a distancia con el hongo *Trichoderma atroviride* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi. Los resultados obtenidos de los qRT-PCR nos permitieron observar distintas tendencias transcripcionales. La mayoría de los genes respondieron incrementando su transcripción a medida que se establecía la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*. Mientras que en uno de los genes cuantificados se observó un comportamiento opuesto, a medida que la interacción se establecía, el nivel del transcrito disminuyó fuertemente. Algunos de estos factores de transcripción han sido caracterizados en interacciones con microorganismos patógenos, pero poco se sabe de su comportamiento en interacción benéficas, por lo que resulta interesante estudiar el comportamiento transcripcional de estos FT en la interacción *A. thaliana-T. atroviride*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

2.1.1 Caracterizar la regulación transcripcional de genes de *Arabidopsis thaliana* en interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Realizar microarreglos de *Arabidopsis thaliana* en interacción con el hongo *Trichoderma atroviride*.

2.2.1.1. Analizar los datos obtenidos del microarreglo por medio del programa Mapman.

2.2.1.2. Identificar y seleccionar genes de *A. thaliana* que modifiquen su expresión en respuesta a la interacción con *T. atroviride*.

2.2.2. Caracterizar transcripcionalmente genes seleccionados de los datos de los Microarreglos.

2.2.2.1. Analizar la expresión de los transcritos del gen *HR4* de *A. thaliana* Ecotipo Col-0 en distintos tiempos de la interacción con *T. atroviride*.

2.2.2.2. Determinar los niveles de expresión del gen *HR4* de *A. thaliana* en interacción con bacterias benéficas (*Pseudomonas fluorescens*) y patogénicas (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000).

2.2.2.3. Evaluar la expresión del gen *HR4* de *Arabidopsis* en tratamientos con las fitohormonas Ácido Salicílico, Metil Jasmonato y Etefon.

2.2.2.4. Determinar la expresión de los genes homólogos al gen *HR4* (*RPW8.1* y *RPW8.2*) en *A. thaliana* Ecotipo Ms-0 en interacción con *T. atroviride*.

2.2.2.5. Analizar transcripcionalmente genes de factores de transcripción *WRKYs* seleccionados de los resultados de los microarreglos.

3. METODOLOGÍA (Sección Microarreglo)

3.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0 fueron esterilizadas y puestas en cajas Petri conteniendo 0.5X de medio Murashige and Skoog (MS) [1.4% de agar (p/v). 0.75% de sacarosa (p/v)], las placas con las semillas se pusieron a 4 °C por dos días para vernalización. Después fueron pasadas a cámaras de crecimiento a 22 ± 1 °C por 10 días. Seis plántulas fueron transferidas a cajas Petri conteniendo medio MS al 1X con 1.4% de agar (p/v), 1.5% de sacarosa (p/v), las plántulas fueron crecidas por 16 días más en cámara de crecimiento a 22 ± 1 °C con un ciclo de 16-h-luz/8-h-oscuridad.

3.2. Condiciones de crecimiento del hongo e inoculación de plántulas

Trichoderma atroviride (IMI206040) fue crecido en placas Petri con PDA por 8 días a 28 °C. Las esporas fueron colectadas en agua destilada estéril y ajustadas a una densidad de 1×10^3 esporas por mL, de esta suspensión se tomaron 10 µL y se aplicaron cinco gotas entre las raíces de las seis plántulas de *A. thaliana* crecidas en placas de MS. Después de la inoculación con la suspensión de esporas se cultivaron por diferentes períodos de tiempos: 24, 48 y 72 h post-inoculación (hpi), también las plántulas control sin inocular fueron cultivadas hasta los correspondientes tiempos. Cumplidos los tiempos de interacción planta-hongo (24, 48 y 72 hpi) se congelaron las plántulas con nitrógeno líquido.

3.3. Extracción de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

Después que se congelaron las plántulas completas con nitrógeno líquido se pulverizaron en un mortero y se pasó el tejido molido a tubos Eppendorf de 1.5 mL hasta la marca de 0.5 mL sin permitir que se descongelara, se añadió 500 µL

del reactivo para extracción de RNA (Concert™ Plant RNA Reagent; Invitrogen, 2001), mezclándose con vórtex hasta homogenizar la mezcla y se dejó reposando 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 4 min a 13,400 rpm. Después, se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de RNAsas, se agregaron 100 µL de NaCl 5 M y 300 µL de cloroformo, se mezclaron por inversión. Después se centrifugaron durante 13 min a 13,400 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo libre de RNAsas. Para precipitar el RNA se le adicionó un volumen equivalente de isopropanol y se dejó 10 min. a temperatura ambiente, después se centrifugó durante 12 min a 13,400 rpm. Para lavar la pastilla, se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugo 1 min a 13,400 rpm. Finalmente, se agregaron de 10 a 30 µL de agua libre de RNAsas, mezclando por inversión para disolver el RNA. El RNA se almacenó a -70 °C hasta que se envió para la realización de los microarreglos.

3.4. Preparación de RNA para el envío

Después de que se extrajo el RNA, este se preparó para enviarse a la Unidad de Microarreglos del instituto de Fisiología Celular – UNAM. La muestra de RNA se llevó a un volumen de 50 µL con agua libre de RNAsas, se adicionó 5 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.7 y se mezcló en vórtex. A la mezcla se le agregó 140 µL de etanol 96% frío y se mezcló por inversión. Se dejó a -70 toda la noche. Después de este tratamiento el RNA se envió a la Unidad de Microarreglos de la UNAM.

3.5. Microarreglo

El microarreglo fue realizado en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular – UNAM (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>). Se usó una laminilla de vidrio para realizar la impresión con oligonucleótidos de un tamaño de 70 mer, los cuales contienen 29,110 sondas y representan 26,173 genes que codifican para proteínas y 87 genes de microRNA de *A. thaliana* (Array-Ready Oligo Set™ versión 3.0.2 Operon Company). Para el marcado del RNA (10 µg) se utilizó la

síntesis de cDNA de cadena sencilla. Se utiliza una porción de deoxinucleotido T marcado con una moléculas fluorescentes (dUTP-Cy3 y dUTP-Cy5), a la mezcla se le agregó transcriptasa inversa que sintetiza el cDNA a partir de mRNA, incorporando el fluoroforo marcador correspondiente para cada muestra. El fluoroforo Cy3 (verde) con el que se marcó el cDNA correspondió a la condición control o RNA de plantas no inoculadas y el fluoróforo Cy5 (rojo) correspondió al cDNA de la condición problema, en este caso proviene del RNA de Arabidopsis en interacción con *Trichoderma*. Una vez que se hizo el marcado, se hace la hibridación en el chip y la lectura de los resultados. Las lecturas de los microarreglos se realizaron en un escáner ScanArray 4000 Microarray Acquisition System (Packard BioChip Technologies, Billerica, MA). Este procedimiento se hizo para cada uno de los fluoróforos obteniéndose dos imágenes: una para el fluoróforo Cy3 y una para el Fluoróforo Cy5. Estas imágenes se combinaron para obtener un aspecto visual del microarreglo (Fig. 3). El análisis de los datos de cada punto del microarreglo se realizó con el programa Array Pro analyzer versión 4.5 (Media Cybernetics, Gleichen, Alemania). El cálculo del valor de la intensidad neta se realizó para cada punto, restando el valor de fondo del valor de la intensidad de la señal. Las proporciones de expresión (“expression ratios”) se calcularon para cada uno de los puntos y se realizó la transformación logarítmica usando el logaritmo base 2 de las proporciones de expresión (\log_2 (expression ratio)). Para facilitar la visualización y análisis de los resultados de los microarreglos, los datos fueron exportados al software MapMan (<http://mapman.gabipd.org/>).

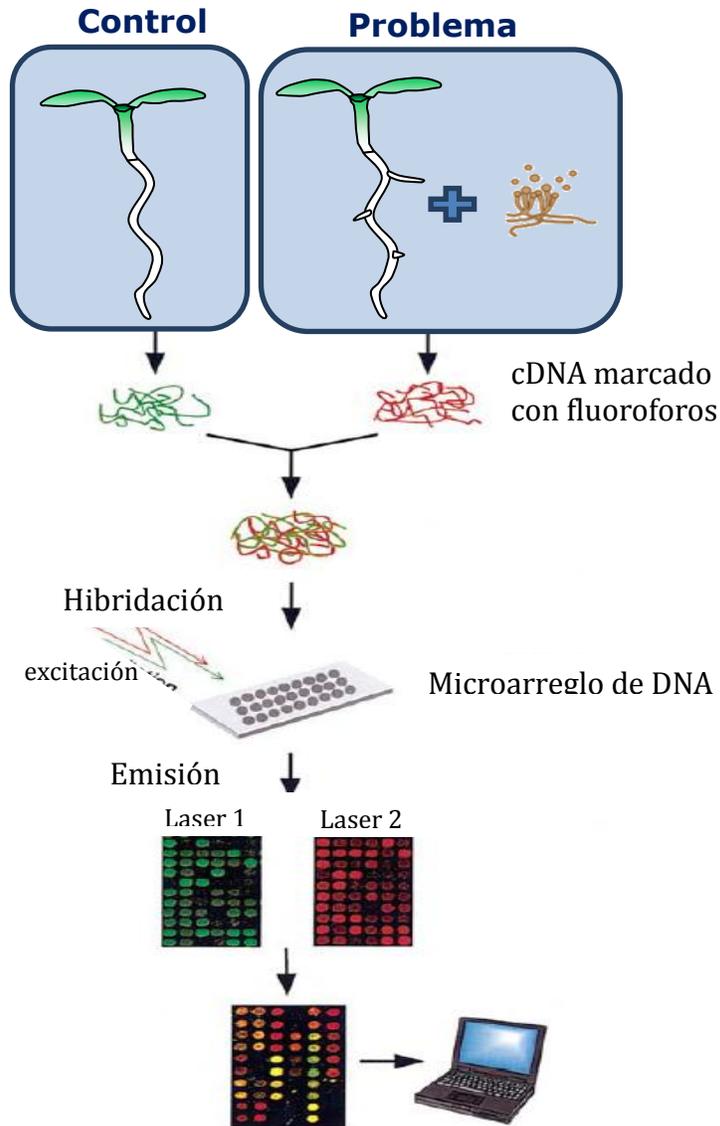


Figura 3. Esquema de un típico microarreglo de cDNA para el análisis de expresión de genes. El RNA aislado de las plántulas es transcrito a cDNA en presencia de marcadores fluorescentes, enseguida los dos cDNAs marcados son mezclados para realizar la hibridación en el microarreglo. Después se hacen las lecturas de los microarreglos por medio de un escáner con emisión láser a dos longitudes de onda correspondientes a la excitación de cada marcador fluorescente. Se obtienen dos imágenes correspondientes a cada fluoróforo, las cuales se superponen para determinar las intensidades de cada punto que representan cada gene. Por ultimo los datos de las lecturas se procesan por medio de software. Imagen modificada de Aharoni & Vorst 2002.

4. RESULTADOS

Capítulo 1

Microarreglos de la interacción de *Arabidopsis thaliana* con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*.

Los estudios transcripcionales a nivel global de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la interacción con microorganismos son una excelente herramienta para la identificación de genes involucrados en la respuesta de reconocimiento del microorganismos y el establecimiento de la interacción. Haciendo uso de esta herramienta se realizaron microarreglos de *Arabidopsis* de distintas etapas de la interacción benéfica con *Trichoderma*. Del análisis de los resultados de los microarreglos se seleccionaron algunos genes de la planta que fueron caracterizados transcripcionalmente a lo largo de la evolución de la interacción.

Con el objetivo de identificar genes de *Arabidopsis thaliana* involucrados en la respuesta a la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*, se realizaron estudios globales de expresión génica de *Arabidopsis* en tres tiempos de interacción, 24, 48 y 72 hpi. La inoculación con esporas se realizó en las raíces de plántulas de *Arabidopsis* de 25 días de edad crecidas en placas Petri con medio MS. En la figura 4, se pueden observar el efecto del crecimiento y desarrollo sobre las plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con el hongo a las 48 y 72 hpi, en donde se puede apreciar un mayor desarrollo de raíces y parte aérea, así como una coloración verde oscura en las hojas de las plántulas inoculadas comparada con la coloración verde-amarillo en las plántulas no inoculadas. Además el desarrollo también se aceleró ya que en las plántulas inoculadas se observa la emergencia de la inflorescencia desde las 48 hpi.

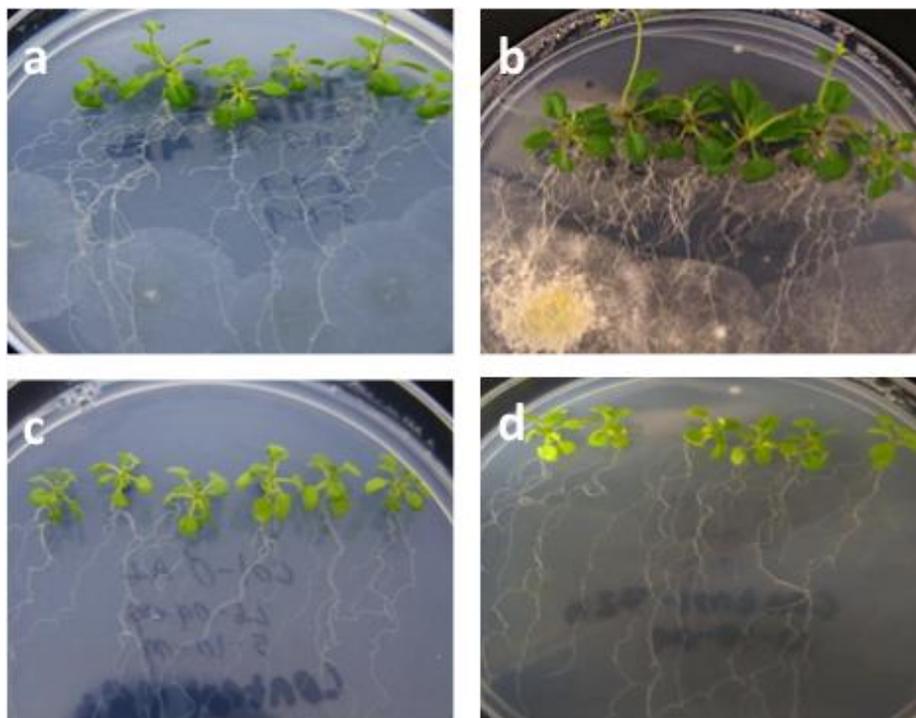


Figura 4. Interacción Arabidopsis-Trichoderma. Las fotografías son de las plántulas de Arabidopsis inoculadas con *Trichoderma* de las cuales se extrajo el RNA para realizar los experimentos de Microarreglos. **a** y **b** corresponde a las plántulas problema o inoculadas con el hongo, en las que se puede observar el efecto del hongo en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, mientras que **c** y **d** a las plántulas control no inoculadas.

Los resultados de los experimentos de microarreglos fueron transferidos al programa Mapman (<http://mapman.gabipd.org/>; Thimm et al. 2004; Rotter et al. 2007; Nagel et al. 2005) el cual es un programa diseñado para facilitar la visualización y el manejo de los datos obtenidos de microarreglos en diagramas o rutas metabólicas.

Cuando analizamos el número total de genes que muestran inducción, con un umbral mayor a uno ($\log_2(\text{expression ratio})$), en cada tiempo de interacción, se puede observar que el tiempo mayor de interacción a las 72 hpi muestra el mayor número de genes inducidos (906) en comparación a los tiempos menores con 196 genes inducidos a las 24 hpi y 101 genes inducidos a las 48 hpi (Fig. 5). Otro dato interesante que se puede observar en el diagrama de Venn de la Figura 5, es que

la mayoría de los genes inducidos en el tiempo intermedio (48 hpi) continuaron siendo inducidos a las 72 horas. Además se identificaron 20 genes que se comparten en los tres tiempos de interacción, los cuales están involucrados en transducción de señales, transcripción, unión a proteínas, transporte y algunos de ellos son proteínas de función desconocida. Entre los 70 genes inducidos que se comparten entre los tiempos 48 y 72 hpi se encuentran algunos genes que se caracterizaron transcripcionalmente (ej. *HR4*).

El total del número de genes involucrados en los tres tiempos de interacción con un umbral mayor a uno, se muestran en el diagrama de Venn de la figura 5. Como se muestra en el diagrama de Venn los genes que se comparten en los tres tiempos de interacción son 20, estos genes están involucrados en transducción de señales, transcripción, unión a proteínas, transporte y algunos de ellos son proteínas hipotéticas.

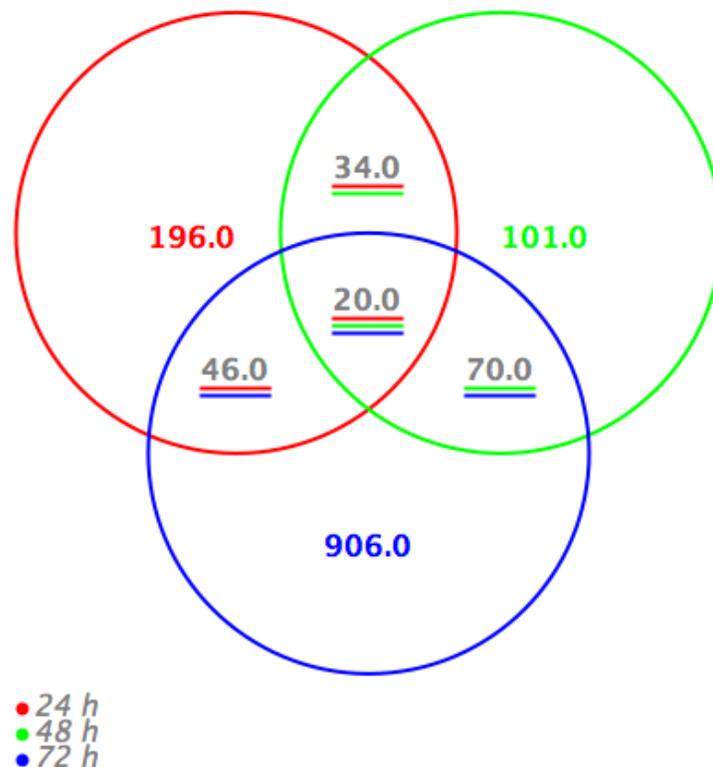


Figura 5. Diagrama de Venn de los resultados de los microarreglos.

Muestra los genes de *Arabidopsis* sobreexpresados con valores mayores a 1 (\log_2 (expression ratio)) que se comparten entre los tres tiempos de los microarreglos de la interacción con *Trichoderma* (24, 48 y 72 hpi).

Por otro lado, con la ayuda del programa Mapman se puede observar globalmente el movimiento de los genes a medida que la interacción se desarrolla, cada gen está agrupado por categorías en las cuales se ha reportado su participación. Por ejemplo dentro del diagrama de respuesta al estrés biótico encontramos grupos de genes que se encuentran involucrados en el reconocimiento, señalización, transcripción, rutas hormonales, genes de defensa, etc (Fig. 6).

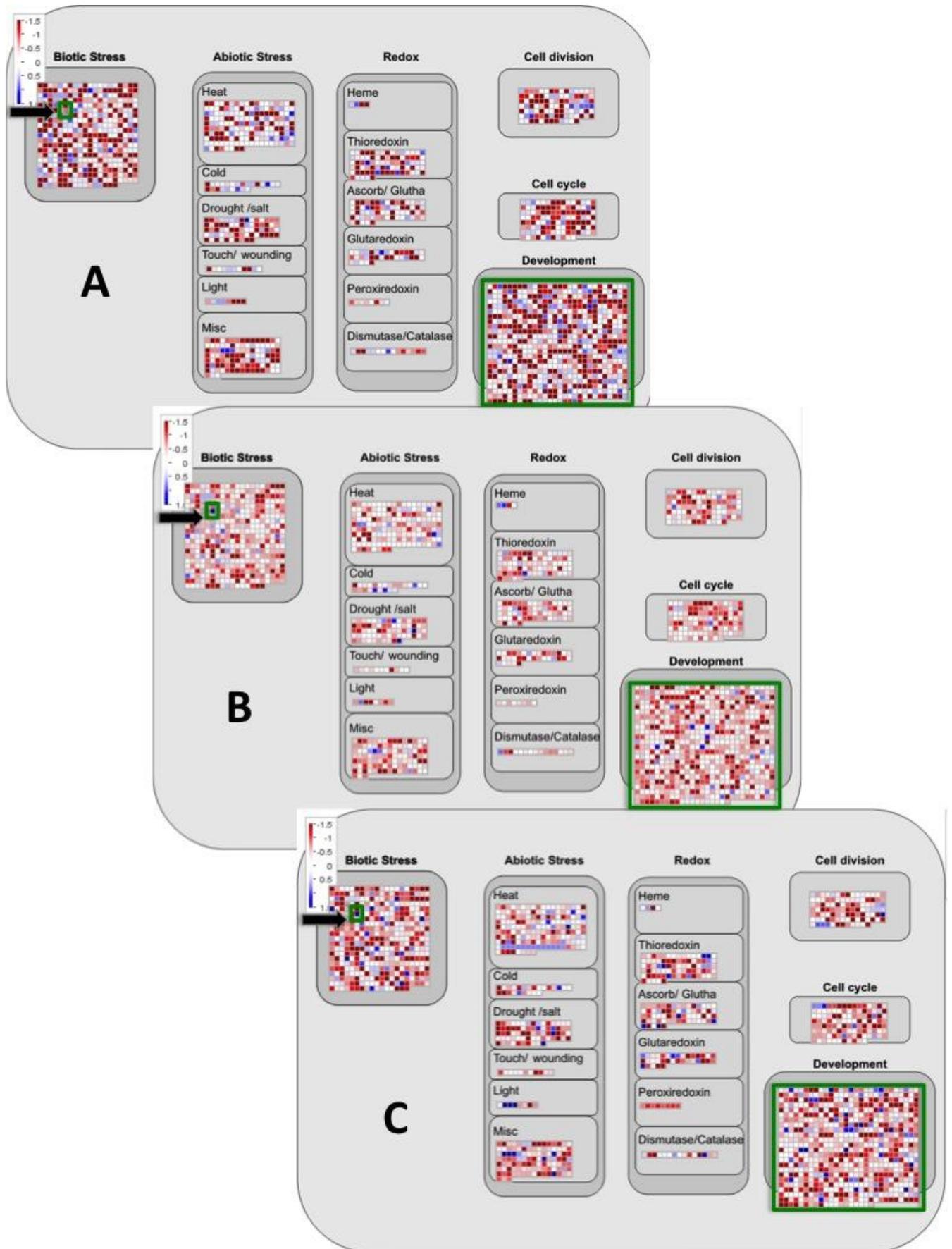
Cuando estudiamos a los genes de respuesta celular, mediante el programa Mapman, observamos se puede tener una vista global de la respuesta celular, nos permiten observar como se mueven los genes desde el inicio de la interacción (24 hpi) hasta que el hongo se establece (72 hpi) en la raíz. Dentro del diagrama de respuesta celular hay sub-clasificación de genes en distintas categorías, como división celular, ciclo celular, estrés biótico y abiótico, y desarrollo. En esta última categoría, la de desarrollo se puede observar que a las 24 hpi la gran mayoría de los genes de *A. thaliana* representados aquí se encuentran reprimidos, a las 48 hpi hay una disminución en la intensidad de la represión y empiezan a aparecer algunos genes inducidos; en contraste, a las 72 hpi se incrementa el número y la intensidad de genes inducidos de la planta (Fig. 7, Recuadro verde grande). Lo anterior puede responder a que en un inicio de la interacción la planta detiene su desarrollo debido al establecimiento de la interacción, y ya establecida está, retoma e incrementa su desarrollo influenciada por el hongo *Trichoderma*.

Continuando con la caracterización de la interacción *Arabidopsis-Trichoderma* se seleccionaron algunos genes inducidos en los resultados del microarreglo. Uno de estos genes seleccionado fue el gen *HR4*, el cual fue uno de

los más inducidos en los datos de los microarreglos a las 48 y 72 hpi, con un valor de 1.9 y 4.1 de inducción, respectivamente. Dentro de este mismo diagrama encontramos la categoría de respuesta a estrés biótico, donde encontramos el gen *HR4* el cual es resaltado con un recuadro verde pequeño, indicado con una flecha en la figura 7.

↑ **Figura 6. Vista global de los genes involucrados en estrés biótico usando el programa Mapman.** En el diagrama se agrupan todos los genes involucrados en la respuesta a patógenos, cada cuadro pequeño esta agrupado en una categoría y representa un gen en una escala de -1.5 hasta 1.5, donde los cuadros azules representa inducción y los rojos represión. **A, B** y **C** representan los distintos tiempos de interacción a las 24, 48 y 72 hpi, respectivamente.

↓ **Figura 7. Diagramas de Mapman de respuesta celular.** En las figuras se encuentran agrupados los genes de respuesta celular en tres tiempos de la interacción *A. thaliana* con el hongo benéfico *T. atroviride* a las 24 (**A**), 48 (**B**) y 72 hpi (**C**). Se resalta la categoría de desarrollo por medio de un cuadro verde grande y el gen *HR4* con un cuadro verde pequeño y es indicado con una flecha.



Capítulo 2

HR4 Gene Is Induced in the Arabidopsis-Trichoderma atroviride Beneficial Interaction

Article

***HR4* Gene Is Induced in the *Arabidopsis-Trichoderma atroviride* Beneficial Interaction**

Jorge Sáenz-Mata and Juan Francisco Jiménez-Bremont *

Division of Molecular Biology, Institute Potosino of Scientific and Technological Research, Camino a la Presa de San José 2055, Col. Lomas 4 sección, C.P. 78216, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, San Luis Potosí, San Luis Potosí 78395, Mexico; E-Mail: jorge.saenz@ipicyt.edu.mx

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jbremont@ipicyt.edu.mx; Tel.: +52-444-834-2000; Fax: +52-444-834-2010.

Received: 8 May 2012; in revised form: 28 June 2012 / Accepted: 12 July 2012 /

Published: 20 July 2012

Abstract: Plants are constantly exposed to microbes, for this reason they have evolved sophisticated strategies to perceive and identify biotic interactions. Thus, plants have large collections of so-called resistance (R) proteins that recognize specific microbe factors as signals of invasion. One of these proteins is codified by the *Arabidopsis thaliana HR4* gene in the Col-0 ecotype that is homologous to *RPW8* genes present in the Ms-0 ecotype. In this study, we investigated the expression patterns of the *HR4* gene in *Arabidopsis* seedlings interacting with the beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. We observed the induction of the *HR4* gene mainly at 96 hpi when the fungus interaction was established. Furthermore, we found that the *HR4* gene was differentially regulated in interactions with the beneficial bacterium *Pseudomonas fluorescens* and the pathogenic bacterium *P. syringae*. When hormone treatments were applied to *A. thaliana* (Col-0), each hormone treatment induced changes in *HR4* gene expression. On the other hand, the expression of the *RPW8.1* and *RPW8.2* genes of *Arabidopsis* ecotype Ms-0 in interaction with *T. atroviride* was assessed. Interestingly, these genes are interaction-responsive; in particular, the *RPW8.1* gene shows a very high level of expression in the later stages of interaction. These results indicate that *HR4* and *RPW8* genes could play a role in the establishment of *Arabidopsis* interactions with beneficial microbes.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Col-0; Ms-0; *HR4*; R genes; *RPW8*; *Trichoderma atroviride*

1. Introduction

Interactions between plants and microbes result in pathogenic or in beneficial associations. It has been revealed that in both interactions a common panel of signaling pathways might participate in the establishment of the equilibrium between plant and microbes or their break-up. Plants appear to detect both pathogenic and symbiotic microbes by a similar set of genes [1]. Beneficial microbes are initially recognized as strange organisms activating the plant's immune system, which culminates in the establishment of intimate mutualistic relationships. Two strategies have been described to detect microbes, the first involves pattern recognition receptors (PRRs) and the second one disease resistance (R) proteins. Immune signaling in plants is initiated upon perception of non-self molecules or elicitors that are often conserved among different classes of microbes, called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or microbe-associated molecular patterns (MAMPs) [2]. Plants also respond to endogenous molecules released by microbe invasion, such as cell wall or cuticular fragments called danger-associated molecular patterns (DAMPs) [3–5]. PAMPs, MAMPs or DAMPs are recognized by PRRs. The PRRs are divided into two classes: transmembrane receptor kinases (RKs) and transmembrane receptor-like proteins (RLPs). The stimulation of PRRs leads to MAMP-triggered immunity (MTI) [6,7]. The second strategy of perception involves recognition by plant intracellular receptors (R proteins) of the microbe's effectors; this recognition induces effector-triggered immunity (ETI), and has led to co-evolutionary dynamics between the plant and the microbe. The effectors are characteristically variable and dispensable in contrast to PAMPs and MAMPs [6,8,9].

The R proteins detect the microbe's effectors and activate strong defenses. Recently, plant R genes have been classified into eight groups based on their amino acid motif organization and their membrane spanning domains. In particular, the Arabidopsis RPW8 proteins are an example of the sixth class of R genes, which contains a coiled coil domain (CC), and an N-terminal transmembrane domain (TrD) helix that is assumed to localize RPW8 proteins to the endomembrane [8,10]. The two paralogous Arabidopsis Ms-0 R genes, *RPW8.1* and *RPW8.2*, confer broad spectrum resistance to multiple powdery mildew isolates that belong to distinct *Erysiphe* spp., and cause diseases in numerous plant species [11]. In contrast, most characterized R genes confer resistance to one or a few isolates of a particular pathogen. All tested Arabidopsis accessions contain three homologs of *RPW8*, (*HR1*, *HR2* and *HR3*) that are closely linked to the *RPW8* locus [11,12]. Two basic Arabidopsis haplotypes have been identified at the *RPW8* locus based on the presence or absence of *RPW8.1* and *RPW8.2* genes: One comprises both *RPW8.1* and *RPW8.2* genes and the other is found in susceptible ecotypes that contain the *HR4* gene instead of the *RPW8.1* and *RPW8.2* genes [13,14].

Trichoderma species are soil-borne fungi that present a high activity of interaction with soil pathogens and plant roots. *Trichoderma* spp. can reduce the severity of plant diseases by inhibiting plant pathogens in the soil through their highly potent antagonistic activity [15,16]. Moreover, some *Trichoderma* strains can interact directly with roots; as a result, they increase plant growth, resistance to disease and tolerance to abiotic stresses. Like other beneficial microbes, *Trichoderma* elicits Induced Systemic Resistance (ISR) by jasmonic acid/ethylene (JA/ET) dependent pathways and triggers priming responses in the plant. However, the *Trichoderma*-plant cross-talk is dynamic and the expression of defense-related genes of the JA/ET and/or salicylic acid (SA) pathways may overlap, depending on several conditions [17,18]. *Trichoderma* also produces the phytohormones ET and

indole-3-acetic acid (IAA), which play roles in interconnecting plant development and defense response [19,20]. Considering the large number of metabolites secreted and the intimate contact with the root epidermis by *Trichoderma*, as well as the expanding list of diverse elicitors produced by fungi, *Trichoderma*'s elicitors may be part of a signaling cascade resulting in greater colonization or plant resistance induction [21].

For a better understanding of plant-microbe interactions, it is essential to study the molecular recognition events. In this sense, we selected the *HR4* gene for this study. Here, we analyzed the gene expression patterns of the *Arabidopsis thaliana* *HR4* gene under different conditions of interaction with the beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. Furthermore, *RPW8.1* and *RPW8.2* genes (from Ms-0 ecotype) paralogs of the *HR4* gene (Col-0 ecotype) were examined during the interaction with *T. atroviride*. Moreover, the analysis of *HR4* gene was extended to bacterial interactions, using beneficial *Pseudomonas fluorescens* and the plant-pathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000). Finally, *HR4* gene transcriptional profiling in response to hormones such as ET, SA and methyl jasmonate (MeJA) was carried out in order to determine the response to hormones. Despite the fact that the ecotype Col-0 of *A. thaliana* is one of the more studied, the *HR4* gene has not been previously characterized. Thus the data obtained on the *HR4* gene provides valuable information regarding this type of R proteins in Col-0 background.

2. Results

2.1. The *HR4* Gene (Ecotype Col-0) Expression in Interaction with *Trichoderma*

The *HR4* gene was selected from a cDNA microarray experiment obtained after 48 h of interaction of 25-day-old *A. thaliana* roots with *T. atroviride*. From the results of microarray bioinformatics analysis, we focused on *R* genes that showed a significant induction during this interaction. From ten induced *R* genes, the *HR4* gene showed the highest Z-score (5.1) on the microarray experiment.

qRT-PCR analyses were performed to corroborate the microarray data on *HR4* expression after 48 h of interaction, using 25-day-old plants grown on MS (Figure 1B). An induction of 1.4 times of the *HR4* gene was observed in *A. thaliana* roots after 48 h post-inoculation (hpi) with *Trichoderma* spores, in comparison to control plants without fungus.

Our next step was to analyze additional times of interaction (72, 96 and 120 hpi) when the fungus is more grown and developed (Figure 1A). The results showed that *HR4* highest induction was at 96 hpi, reaching a relative expression of 4.2-fold change (Figure 1B), when the fungus is already well established and beginning to sporulate (Figure 1A).

We further examined the effect of distance between the *Arabidopsis-Trichoderma* interaction. For this, an experiment where *T. atroviride* was inoculated at 3 cm distance from the root tips was carried out. As with the previous interactions, the expression levels for the *HR4* gene were higher at the later stages (96 and 120 hpi) evaluated, when the fungus was more established, and contact was already evident in the *Arabidopsis* roots (Figure 2A). The maximum expression was at 96 hpi, reaching 1.9-fold in comparison to the control plants (Figure 2B). All these results suggest that the contact of the fungus with the plant roots could activate the recognition system and/or could promote a beneficial interaction establishment in the plant.

Complementary to this, we examined the *HR4* expression of the *Arabidopsis-Trichoderma* interaction in soil. *Arabidopsis* plants in pots with soil were inoculated and the aerial part was used for expression studies at 2, 4, and 6 days post-inoculation (dpi) (Figure 3). Plants inoculated with *T. atroviride* increased aerial parts in comparison to the control plants (Figure 3A). The *HR4* gene expression was measured at these points in time, observing a slight increase in gene transcription at 2 and 6 dpi (Figure 3B).

Figure 1. Direct Interaction. Time course development of direct interaction between *Arabidopsis thaliana* plantlets and *Trichoderma atroviride* in MS plates. (A) Photographs were taken for 25-day-old *Arabidopsis* (Col-0) plants inoculated with *T. atroviride* at different time points of interaction: 48 h (a), 72 h (b), 96 h (c) and 120 h (d) post-inoculation. Photographs of 25-day-old *Arabidopsis* (Col-0) control non-inoculated plantlets at different times are indicated: 48 h (e), 72 h (f), 96 h (g) and 120 h (h); (B) Expression analysis of *HR4* gene in direct interaction. Quantification of *HR4* gene by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with control conditions, was calculated after normalization to the *Arabidopsis actin 8* gene using the comparative threshold method. Analyses were performed by triplicate. Control conditions or non-inoculated plantlets (light grey bars) and tester conditions or inoculated plantlets (dark bars) at 48, 72, 96 and 120 hpi, respectively.

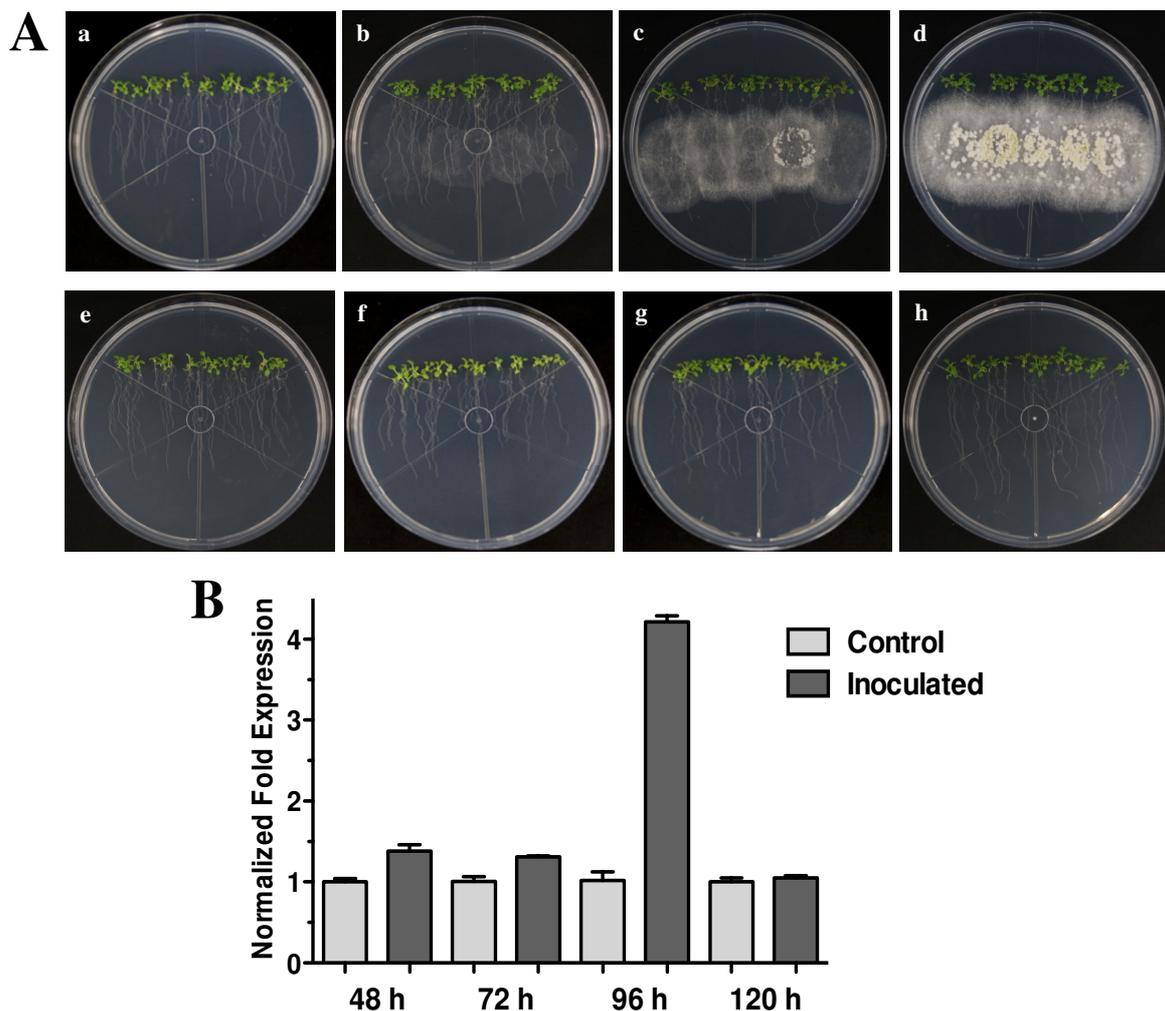


Figure 2. Distant interaction. (A) Development of distant interaction of *Arabidopsis thaliana* plantlets with *Trichoderma atroviride*. (a), (b), (c) and (d) photographs of 17-day-old *Arabidopsis* (Col-0) plantlets inoculated with *T. atroviride*, the plantlets were photographed at 48 h (a), 72 h (b), 96 h (c) and 120 h (d) post-inoculation. (e), (f), (g) and (h) photographs of 17-day-old *Arabidopsis* (Col-0) control non-inoculated plantlets of 48 h (e), 72 h (f), 96 h (g) and 120 h (h); (B) Induction of *HR4* gene by *T. atroviride* at a distance. Quantification of *HR4* gene by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with control conditions, was calculated after normalization to the *Arabidopsis actin 8* gene using the comparative threshold method. Analyses were performed by triplicate. Control conditions or non-inoculated plantlets (light grey bars) and tester conditions or inoculated plantlets (dark bars) at 48, 72, 96 and 120 hpi, respectively.

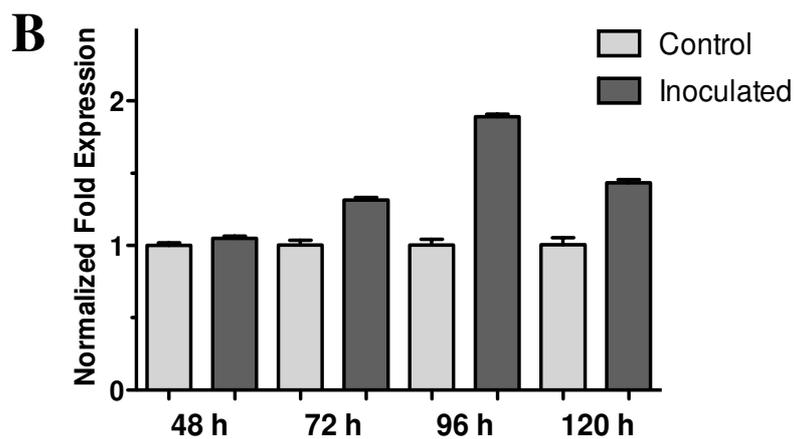
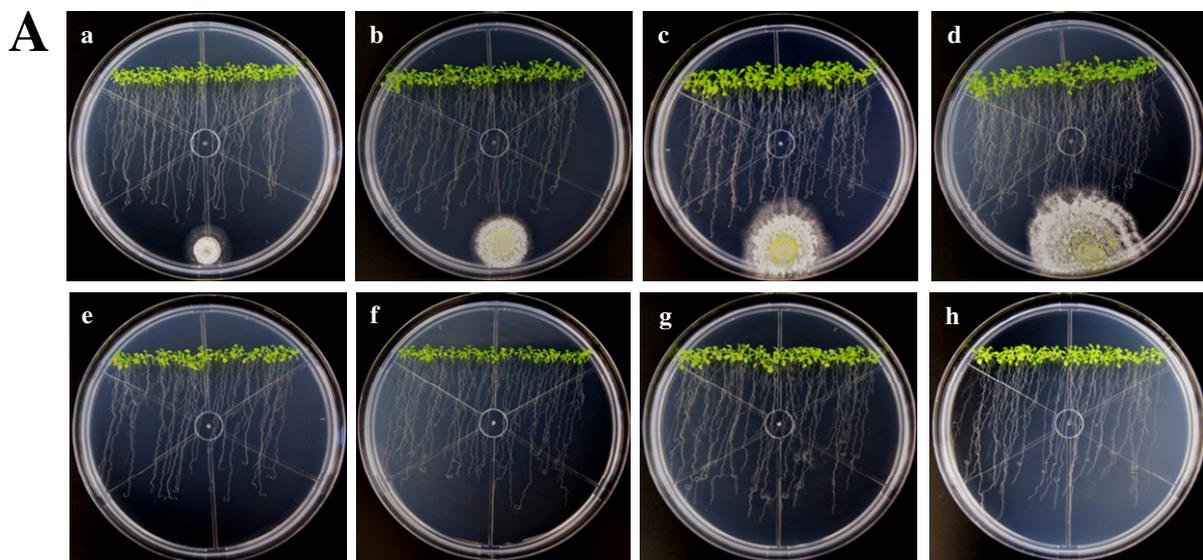
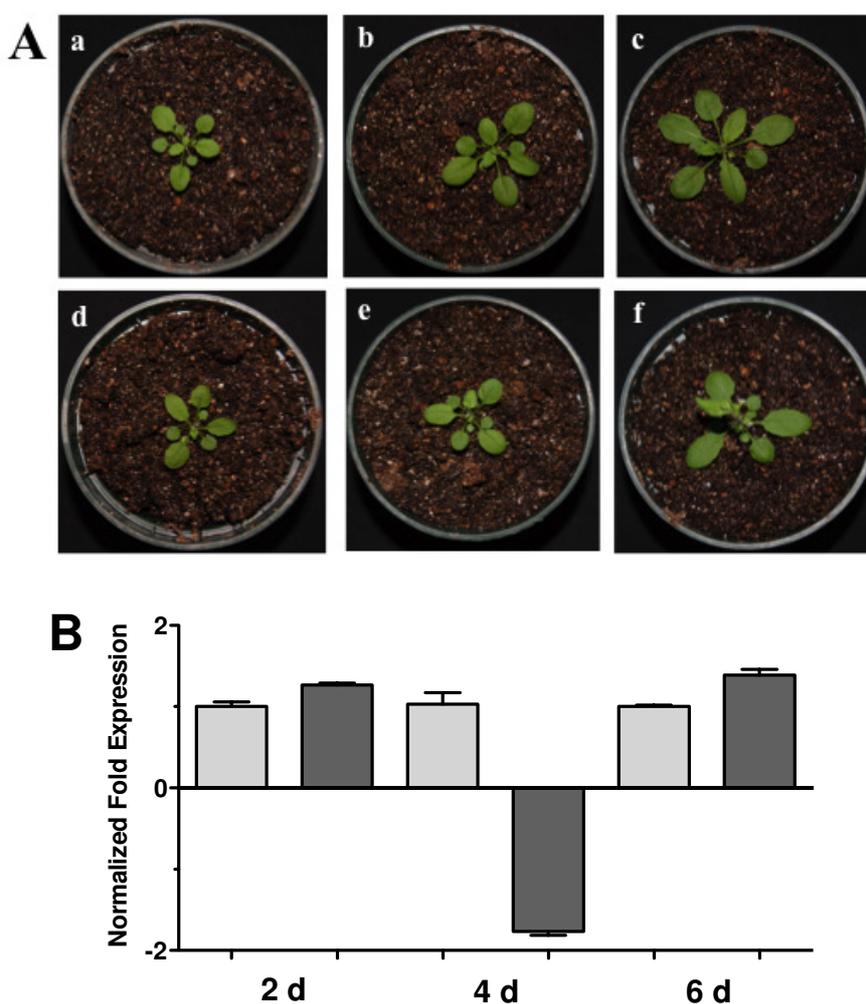


Figure 3. Soil interaction. (A) Photographs of Arabidopsis plants inoculated with *Trichoderma* in pots. (a), (b) and (c), 1 month-old Arabidopsis plants in pots inoculated with *Trichoderma atroviride*, the plants were photographed at (a) 2 days, (b) 4 days, and (c) 6 days post-inoculation. (d), (e) and (f), 1 month-old Arabidopsis control non-inoculated plants of (d) 2 days, (e) 4 days, and (f) 6 days; (B) Expression analysis of *HR4* gene from Arabidopsis plants grown in soil pots. Quantification of *HR4* gene from aerial part of plants by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with control conditions, was calculated after normalization to the Arabidopsis *actin 8* gene using the comparative threshold method. Analyses were performed by triplicate. Control conditions or non-inoculated plants (light grey bars) and tester conditions or inoculated plants (dark bars) at 2, 4, and 6 dpi, respectively.



2.2. The *RPW8.1* and *RPW8.2* Genes (*Ecotype Ms-0*) Expression in Interaction with *Trichoderma atroviride*

The *A. thaliana* *RPW8* locus from ecotype *Ms-0* contains two paralogous genes, *RPW8.1* and *RPW8.2*, both of which confer resistance to powdery mildew fungi [14]. These genes have been extensively studied in interactions with pathogenic fungus (Powdery Mildew), but nothing is known about beneficial fungus interaction. According to the above, we used the *A. thaliana* ecotype *Ms-0* in

interaction with *T. atroviride* for the transcriptional characterization of the *HR4* homologues genes, *RPW8.1* and *RPW8.2*. The *Trichoderma* inoculation was made at the lower end of the Petri dish closed to the plantlets roots, and the gene expression was measured at 48, 72, 96 and 120 hpi (Figure 4A). Both, *RPW8.1* and *RPW8.2* genes were up-regulated, but the maximum expression was observed in the *RPW8.1* gene reaching the highest expression level (155-fold) at 96 hpi, and the lowest expression level (1.67-fold) at 72 hpi. At 48 and 120 hpi the gene expression was 7.9 and 30.6-fold, respectively (Figure 4B *RPW8.1*). With respect to the *RPW8.2* gene, it was up-regulated less than the *RPW8.1*, reaching the induction levels 1.7, 2.0, 1.8 and 1.3-fold at 48, 72, 96 and 120 hpi, respectively (Figure 4B *RPW8.2*). The inoculation with the beneficial fungus resulted in an increase in the lateral roots formation and growth of the aerial part in *Arabidopsis* seedlings ecotype Ms-0 (Figure 4A), this observation is consistent with that observed with Col-0 ecotype (Figure 2A).

Figure 4. Expression of *RPW8.1* and *RPW8.2* genes from *Arabidopsis thaliana* ecotype Ms-0 in interaction with *Trichoderma atroviride*. (A) Development of interaction of *Arabidopsis thaliana* ecotype Ms-0 plantlets with *Trichoderma atroviride*. (a), (b), (c) and (d) photographs of 15-day-old *Arabidopsis* (Ms-0) plantlets inoculated with *T. atroviride*, the plantlets were photographed at (a) 48 h, (b) 72 h, (c) 96 h and (d) 120 h post-inoculation. (e), (f), (g) and (h), photographs of 15-day-old *Arabidopsis* (Ms-0) control non-inoculated plantlets of (e) 48 h, (f) 72 h, (g) 96 h and (h) 120 h; (B) Induction of *RPW8.1* and *RPW8.2* genes by *T. atroviride* interaction. Quantification of *RPW8.1* and *RPW8.2* genes by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with a control conditions, was calculated after normalization to the *Arabidopsis actin 8* gene using the comparative threshold method. Analyses were performed by triplicate. Control conditions or non-inoculated plantlets (light grey bars) and tester conditions or inoculated plantlets (dark bars) at 48, 72, 96 and 120 hpi, respectively.

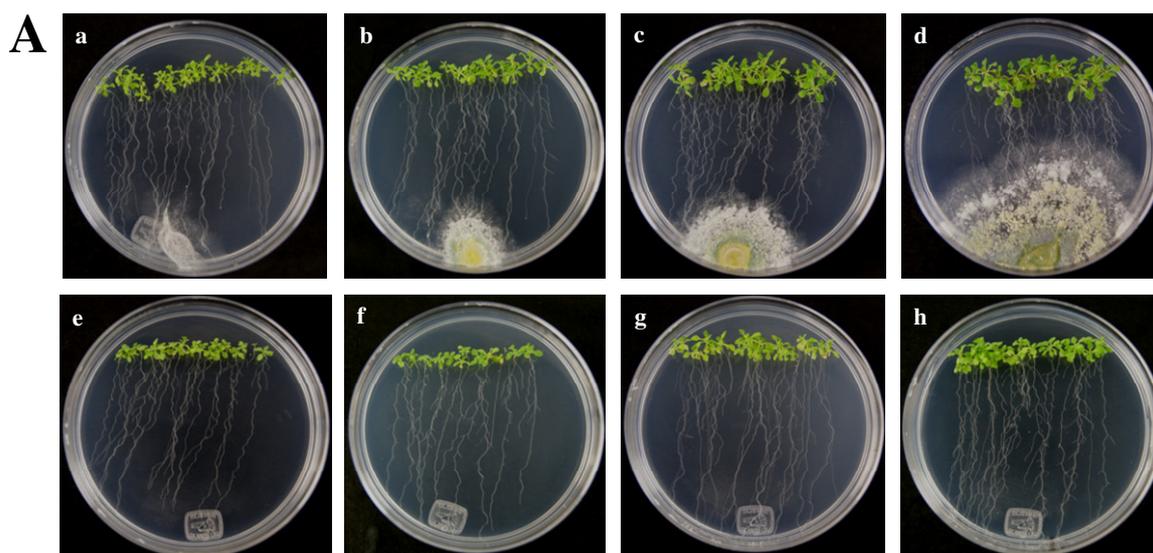
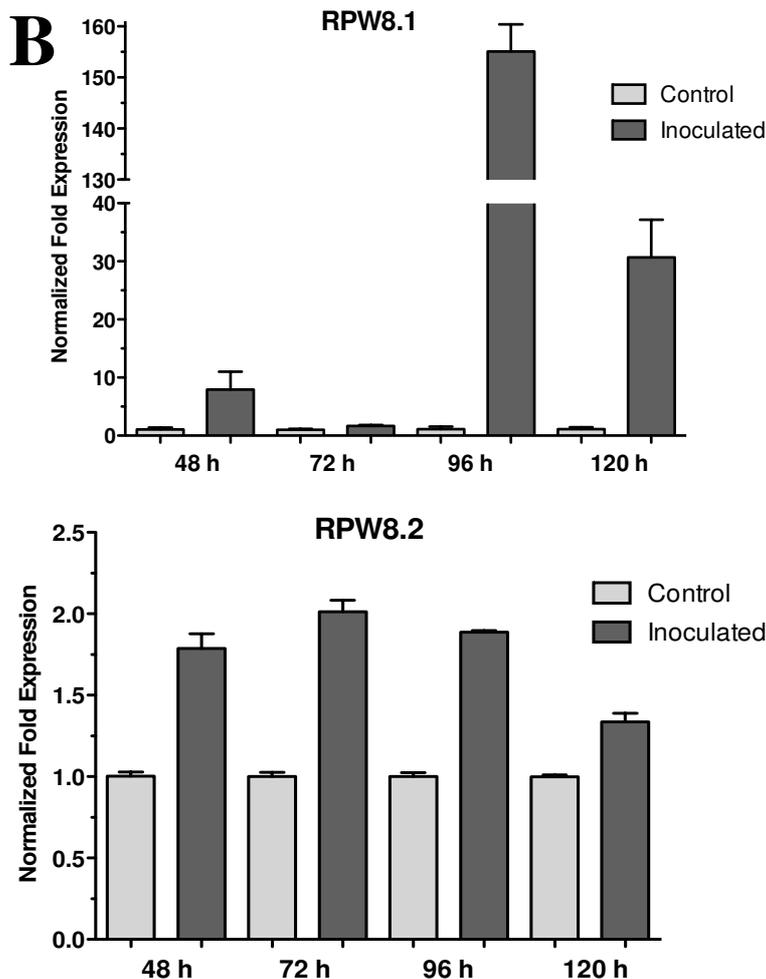


Figure 4. Cont.



2.3. HR4 Gene Is Induced by Bacterial Interactions

The effect of plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* on Arabidopsis (Col-0) 20-day-old seedlings was assessed (Figure 5A). We tested the expression of the Arabidopsis *HR4* gene in interaction with *P. fluorescens* roots inoculated at 72, 96 and 120 hpi. As shown in Figure 5B, a gradual increase of the *HR4* mRNA level with the progress of the interaction was observed, beginning with a repression at 72 h (−1.46), followed by inductions of 1.49 and 2.88-fold at the later stages of interaction.

On the other hand, when Arabidopsis (Col-0) seedlings were inoculated with bacterial pathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 a significant increase of *HR4* gene expression was observed at 48 h (13.54-fold) (Figure 6B). In this interaction, bacteria were inoculated in foliar area of 20-day-old seedlings, and initial characteristic symptoms of the *P. syringae* infection were observed at 72 h, with initial chlorosis and anthocyanin production in the center of the rosette seedlings (Figure 6A).

Figure 5. *Pseudomonas fluorescens* interaction. (A) Development of the interaction of *Arabidopsis* with *P. fluorescens*. (a), (b), and (c), photographs of 20-day-old *Arabidopsis* (Col-0) plantlets inoculated with *P. fluorescens*, the plantlets were photographed at (a) 72 h, (b) 96 h, and (c) 120 h post-inoculation. (d), (e) and (f), photographs of 20-day-old *Arabidopsis* (Col-0) control non-inoculated plantlets of (d) 72 h, (e) 96 h and (f) 120 h; (B) Expression analysis of the *HR4* gene of *Arabidopsis* in interaction with beneficial bacterium *P. fluorescens*. Quantification of *HR4* gene by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with a control condition, was calculated after normalization to the *Arabidopsis actin 8*. Control conditions or non-inoculated plantlets (light grey bars) and tester conditions or inoculated plantlets (dark bars) at 72, 96 and 120 hpi, respectively.

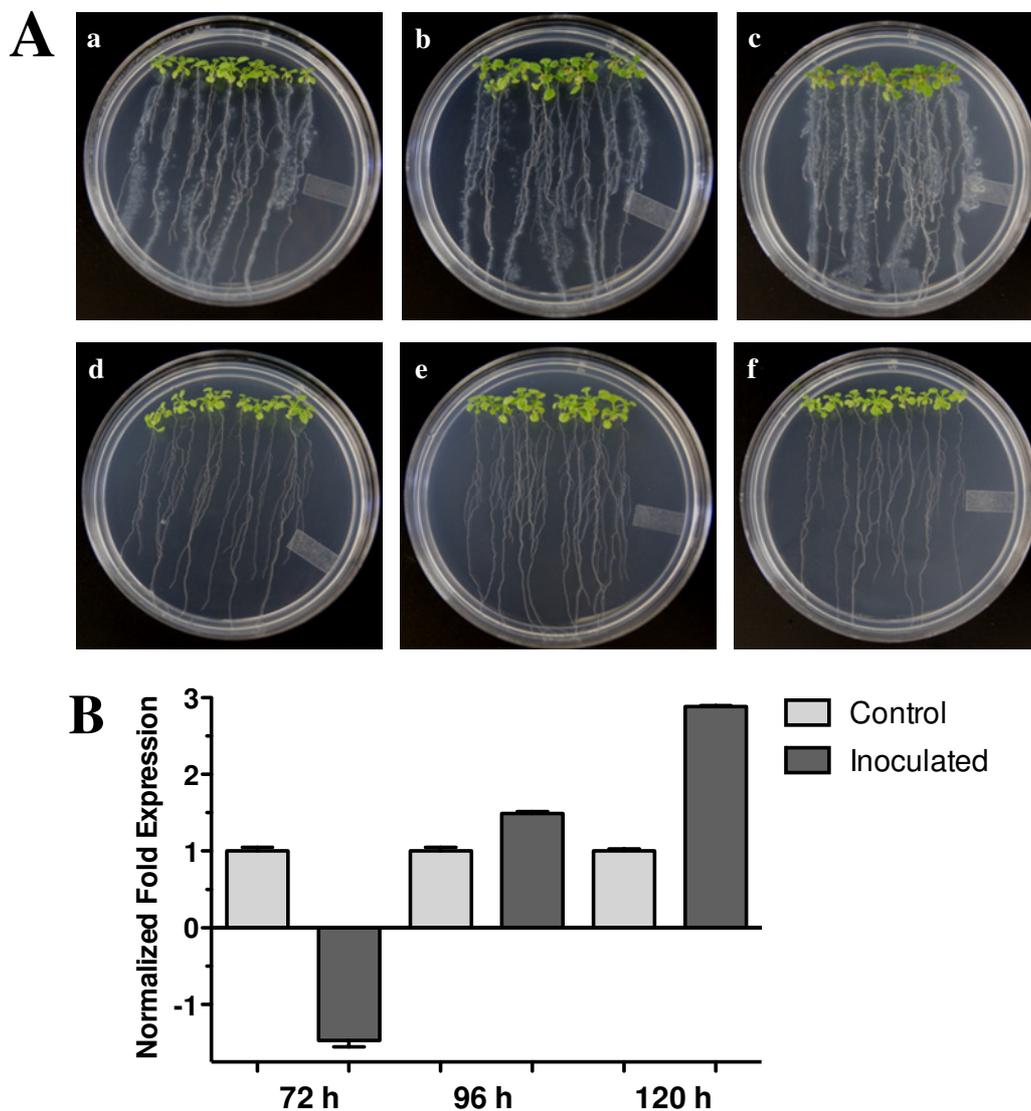
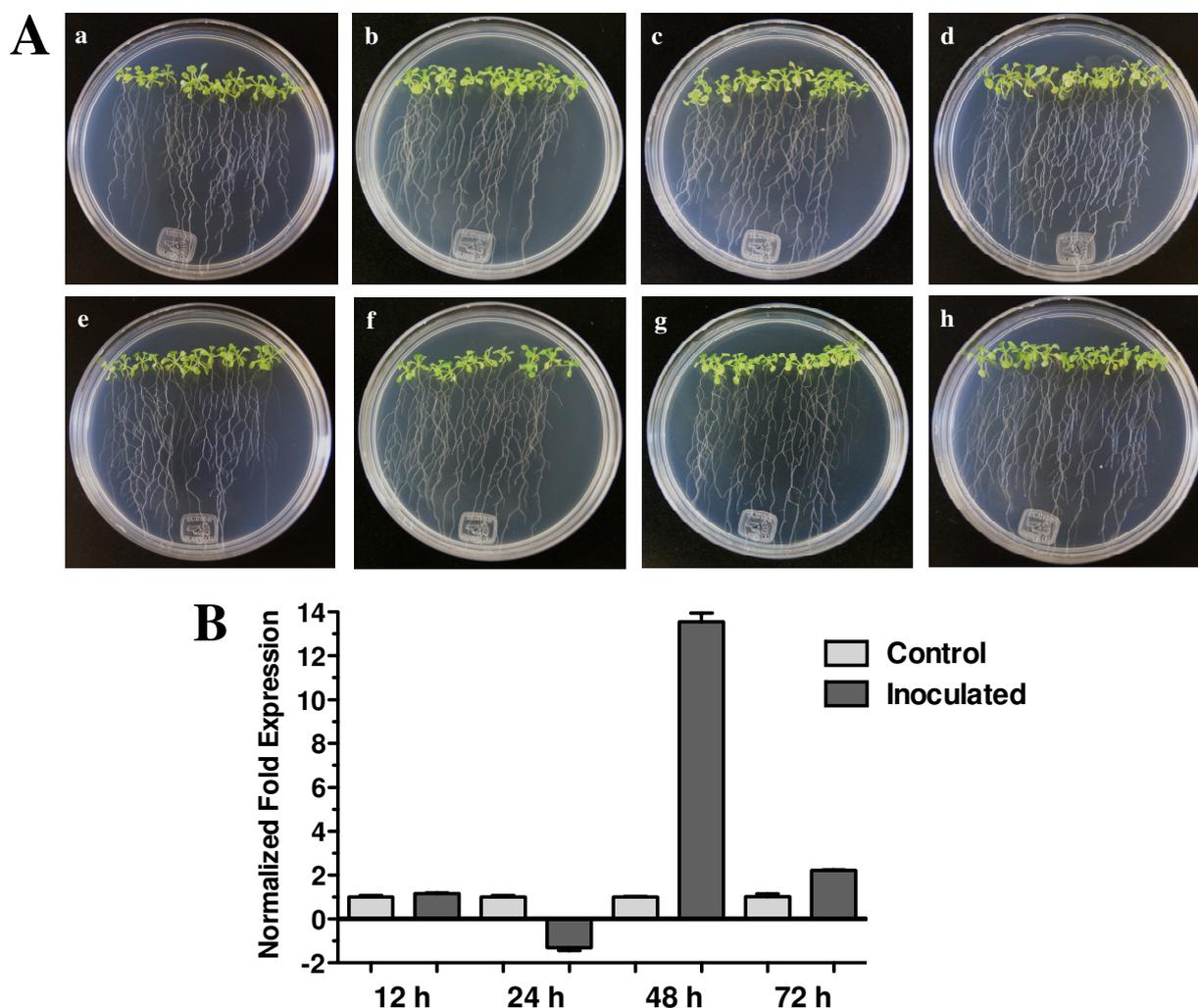


Figure 6. *Pseudomonas syringae* interaction. (A) Development of the interaction of Arabidopsis with *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. (a), (b), (c) and (d) photographs of 20-day-old Arabidopsis (Col-0) plantlets inoculated with *P. syringae*, the plantlets were photographed at 12 h (a), 24 h (b), 48 h (c) and 72 h (d) post-inoculation. (e), (f), (g), and (h), photographs of 20-day-old Arabidopsis (Col-0) control non-inoculated plantlets of 12 h (e), 24 h (f), 48 h (g) and 72 h (h); (B) Expression analysis of the *HR4* gene of Arabidopsis in interaction with plant-pathogenic *P. syringae*. Quantification of the *HR4* gene by qRT-PCR, expressed as relative mRNA level compared with a control condition, was calculated after normalization to the Arabidopsis *actin 8*. Control condition or non-inoculated plantlets (light grey bars) and tester conditions or inoculated plantlets (dark bars) at 12, 24, 48 and 72 hpi, respectively.

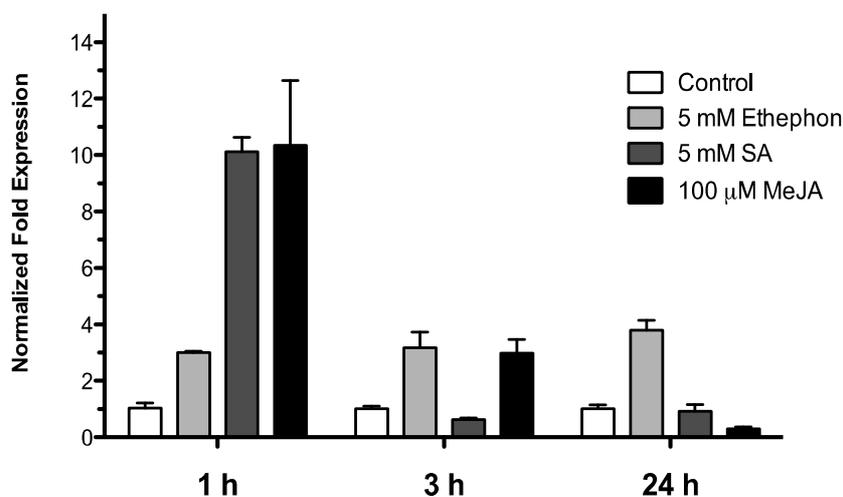


2.4. Effect of Phytohormones on the Expression of HR4 Gene

To examine the effect of phytohormones involved in biotic stress signaling on the *HR4* gene expression, 15-day-old Arabidopsis (Col-0) seedlings were treated by spraying with 5 mM ethephon, 5 mM salicylic acid and 100 μM methyl jasmonate in a MS solution, control seedlings were treated with an equivalent amount of MS solution. The treated seedlings and controls were harvested at 1, 3, and 24 h after sprayed. As show in Figure 6, with ethephon (ET) treatment the *HR4* gene was induced

in early times at 1 and 3 h with 3.00 and 3.18-fold, respectively, and this induction was maintained at 24 h (3.79-fold). For SA and MeJA treatment, we observed a strong initial induction at 1 h of 10.1- and 10.3-fold, respectively. The next times, at 3 and 24 h, the level of expression was down-regulated for the two hormones (Figure 7).

Figure 7. Phytohormonal treatment effects. Expression analysis of the *HR4* gene from *Arabidopsis* by the addition of phytohormones, 5 mM ethephon, 5 mM SA, and 100 μ M MeJA. Control conditions or without phytohormones (white bars) and tester conditions with 5 mM of ethephon (light grey bars), 5 mM SA (dark grey bars), and 100 μ M MeJA (black bars) at 1, 3, and 24 h post sprayed, respectively.



3. Discussion

Plants have evolved in constant interaction with beneficial microorganisms, which influence plant growth and development and also plant health. These beneficial microorganisms are indispensable for a sustainable agriculture and environment. Although the plant-pathogen interaction is better understood, the plant-beneficial interaction is less known; hence, it is necessary to understand what is happening at the molecular level between plant and beneficial microorganisms [7]. It is a critical point for providing new strategies to improve plant productivity, while protecting the environment and biodiversity.

Some *Trichoderma* rhizosphere-competent strains have been shown to have direct effects on plants. These effects are: (i) the promotion of plant growth and development, and thus increased yields [22,23]; (ii) breaking seed dormancy and enhanced rates of seed germination [24–26]; (iii) improved tolerance to abiotic stresses during plant growth, in part due to improved root growth, and enhanced water-holding capacity of plants or enhanced nutrient uptake (phosphorus and several micronutrients) [26–29]; (iv) increased photosynthetic capacity [27]; and (v) systemic induction of plant defenses towards attack by pathogenic microorganisms [22,30]. Several global analyses have been published of the alteration of proteome [31–33] and transcriptome [30,34–36] of plants as a consequence of *Trichoderma* colonization.

Arabidopsis thaliana represents a functional system to study beneficial plant-microbe interactions. In particular, Contreras-Cornejo *et al.* in 2009 [19] reported the beneficial effects of *Trichoderma* species on plant growth and the development of *A. thaliana*. It has also been reported that the presence

of Trichoderma primes the systemic resistance system, a complex signaling mechanism involving diverse hormones pathways. This complex signaling mechanism involving JA/ET-induced systemic resistance (ISR) and/or SA-dependent systemic acquired resistance (SAR) pathways [37]. The activation of ISR and/or SAR in plants is part of the response to microbes by the plants. In order to recognize microbes, plants have a large collection of *R* genes, which directly or indirectly recognize effectors from beneficial and pathogenic fungi or bacteria.

In a microarray of the interaction *A. thaliana* (Col-0)-*T. atroviride* [38] we analyzed the expression of *R* genes, where the *HR4* gene was one of the most strongly induced. For this reason, in this study we focused on *HR4* gene expression during the interaction with this beneficial fungus. At 48 hpi an induction of the *HR4* gene was found; however, at 96 hpi the *HR4* gene showed the highest peak of expression in comparison with the *A. thaliana* seedlings without fungus. The same behavior was observed when the fungus was inoculated at the end of the petri dishes (distance interaction), where the maximum peak of *HR4* gene expression was also at 96 hpi. At this point in time, the fungus development was more evident and the interaction was established in both interactions. When the aerial part of 27-day-old Arabidopsis inoculated with Trichoderma in pots was analyzed transcriptionally, we observed a cyclic behavior of the *HR4* gene with alternated transcript induction (2 and 6 dpi) and repression (4 dpi).

There are only a few reports about the *HR4* gene. Xiao *et al.* [13] reported that the transcription of the *HR4* gene from *A. thaliana* ecotype Col-0 was induced by powdery mildew and *Peronospora parasitica*. In another study, the *HR4* gene induction from an interaction of *A. thaliana* (Col-0) with *Botrytis cinerea* was observed at 12 and 24 hpi [39]. In the present study, we report the first transcriptional regulation of the *HR4* gene in interaction with a beneficial microbe.

The *A. thaliana HR4* gene (ecotype Col-0) is homologue to *RPW8* genes (ecotype Ms-0). The *RPW8* locus from accession Ms-0 confers broad-spectrum resistance to powdery mildew. This locus contains two paralogous genes, *RPW8.1* and *RPW8.2*, both of which contribute to resistance [12,13]. The origin of the *RPW8* locus is relatively recent, probably after the separation of Arabidopsis from the Brassica lineages, and that *RPW8.1* and *RPW8.2* have evolved from an *HR3*-like predecessor gene by duplication and functional diversification. The *HR4* gene is probably of most recent origin, which appears to have arisen from *RPW8.1* [13,14].

Based on particular differences between Arabidopsis haplotypes (*RPW8* locus and *HR4*), the expression of the *RPW8.1* and *RPW8.2* genes of Arabidopsis ecotype Ms-0 in interaction with *T. atroviride* was assessed. An important finding in the present study was the increased expression of *RPW8.1* and *RPW8.2* genes from Arabidopsis ecotype Ms-0 during the interaction with Trichoderma. The up-regulation of *RPW8.2* gene was maintained in for the first three times with similar levels, which were similar to *HR4* gene levels of ecotype Col-0. Furthermore, the expression profile of *RPW8.1* was like that of *HR4* gene, where at later stages there was an evident increase in mRNA level, especially at 96 hpi with a strong increase in both genes (Figures 1B and 3B). Xiao *et al.* [40] proposed that the increased transcription of *RPW8*s formed part of an amplification circuit that lead to the accumulation of SA. Therefore, SA formed during the expression of resistance to different pathogens also would induce the accumulation of transcripts of *RPW8.1* and *RPW8.2* via a feedback amplification circuit. Although there is much information about *R* genes in plant-pathogen interactions (e.g., *RPW8* genes), only little is known about *R* genes in beneficial interactions.

In addition to fungal interactions, we analyzed the interaction between *A. thaliana* (Col-0) and bacteria. When the beneficial bacterium, the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Pseudomonas fluorescens*, was inoculated into the Arabidopsis roots, an induction of the *HR4* gene specifically in the later stages (120 hpi) was noticed. This result is consistent with that reported by Wang *et al.* [41], who found using microarray analysis that the *HR4* gene was up-regulated in the interaction *A. thaliana*-*P. fluorescens* (FPT9601-T5). On the other hand, in response to the infection by the pathogenic bacterium *P. syringae* pv *tomato* DC3000 on Arabidopsis seedling leaves (Col-0), the *HR4* gene markedly increased the mRNA level at 48 hpi.

Plant hormones are essential for the regulation of plant defense, the importance of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) as primary signals is well established [42–44]. The interaction of plants with diverse microbes results in changes in the level of these phytohormones, which are positive regulators of defense genes (PRs), transcription factors (WRKYs) and receptors (*R* genes). The *R* genes are the activators of immune response, and simultaneously the *R* gene promoters have *cis*-elements that increase the amplification by feedback positive regulation circuits stimulated by hormonal action [44]. Cross-talk among SA, JA and ET signaling pathways has emerged as an important regulatory mechanism of plant immunity [42,43]. There are different reports about what the hormonal activated pathway in the interaction *Arabidopsis*-*Trichoderma* [20] is. *T. atroviride* induces a delay and overlapping activation of the defense-related genes of the SA and JA/ET pathways against biotrophic and necrotrophic phytopathogens [19,45]. *T. atroviride* P1 and *T. harzianum* T22 are able to induce a long-lasting up-regulation of SA gene markers, after the infection with *Botrytis cinerea* the expression of defense genes increases induced through the JA pathway, culminating in ISR [17], and *T. asperellum* produces a clear ISR through SA signaling cascade [18]. In order to determinate the transcriptional response of the *HR4* gene, expression was measured under hormonal treatment of Arabidopsis seedlings with the exogenous application of SA, MeJA and ethephon phytohormones, which have been implicated in the response to *Trichoderma*. The *HR4* gene expression was up-regulated with SA and MeJA treatments observing an abrupt induction 1 h post-treatment, and a decrease in expression at later times. On the other hand, the ethephon treatment constantly maintained the up-regulated mRNA level three times. *RPW8.1* and *RPW8.2* genes involved a self-amplification mechanism via the SA-feedback circuit for activation of HR and resistance [40,46]. The response of the *HR4* gene by SA reported in this study, and what was reported for *RPW8.1* and *RPW8.2* genes [40], could be due to *W*-box elements within their regulatory regions.

In the interaction of *T. harzianum* T34 with Arabidopsis plants, a transcriptional regulation of SA-related genes, such as Enhanced Disease Susceptibility 1 (EDS1) and PR-1, was reported [35]. At an early stage (4 h), a strong down-regulation of EDS1 and PR-1 genes was detected, but after 48 h of Arabidopsis root colonization by *T. harzianum* an increase in the expression of these genes was reported [35]. Interestingly, RPW8-mediated resistance is associated with the expression of *PR* genes, and signaling in RPW8-mediated resistance occurs through a feedback amplification loop in the SA pathway, and requires signaling components such as *EDS1*, *EDS5*, *PHYTOALEXIN DEFICIENT 4* (*PAD4*), and *NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1* (*NPRI*) [11,40,46,47].

The *HR4* gene is classified as an early SA induced gene (early SAIG), as reported by Blanco *et al.* in 2009 [48], who analyzed the early genetic response to SA of Arabidopsis seedlings. Using microarray analysis, they identified 217 genes rapidly induced after 2.5 h SA treatment; 193 by a

NPR1-dependent and 24 by a NPR1-independent pathway. The *HR4* gene with a 3.0-fold-change ratio was included in the NPR1-dependent group. In another study by Galon, *et al.* in 2008 [49], they reported the elevated expression of 32 genes related to defense against pathogens in transcriptomic analysis using microarrays from *A. thaliana* and *camta3* (insertion mutants in the Calmodulin binding transcription activators 3 gene) plants, amongst these genes there was the *HR4* gene with a 6.7-fold change ratio, suggesting that CAMTA3 normally suppresses biotic defense responses. In accordance with these findings, our transcription data of *HR4* and *RPW8* genes support the idea that the SA pathway is a key player in the recognition, establishment and/or activation of plant systemic defense by the beneficial fungus *T. atroviride*.

4. Experimental Section

4.1. Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana (Col-0) seeds were surface-sterilized and sown on Petri dishes containing 0.5× Murashige and Skoog (MS) medium [1.4% (w/v) agar, 0.75% (w/v) sucrose] and placed at 4 °C for 2 days for vernalization, they then were placed in growth cabinets at 22 ± 1 °C for 7 days. Fifteen seedlings were transferred to Petri dishes containing 1× MS with 1.5% (w/v) sucrose, 1.4% (w/v) agar, the pH of the medium was adjusted to 7.0 and the seedlings were grown at 22 ± 1 °C for 16 days in a 16-h-light/8-h-dark cycle. After that period of time, *Trichoderma atroviride* was inoculated on the MS media as described below.

For *Trichoderma* distant interaction, pot interactions, ecotype Ms-0, and others microbe interactions, *A. thaliana* (Col-0 and Ms-0) seeds were surface-sterilized and sown on Petri dishes containing 0.2× MS medium [1% (w/v) agar, 0.75% (w/v) sucrose, the pH of the medium was adjusted to 7.0] and placed at 4 °C for 2 days for vernalization, they then were placed in growth cabinets at 22 ± 1 °C in a 16-h-light/8-h-dark cycle for 15–20 days. After that period of time, seedlings were inoculated with the respective culture of microbes on the MS media as described below.

4.2. Microorganism Growth Conditions and Seedling Inoculations

In a direct interaction experiment, *T. atroviride* (IMI206040) was grown on PDA plates for 8 days at 28 °C. Conidia were collected in distilled water and adjusted to a density of 1 × 10³ spores per mL. Then 10 µL of the spore suspension were applied on roots of 25-day-old *A. thaliana* plantlets grown in Petri dishes with MS medium and cultured for different periods: 48, 72, 96 and 120 h post-inoculation (hpi), control non-inoculated plants were cultured at the same times points. On the other hand, in a distant interaction experiment, 10 µL of a suspension of 1 × 10⁶ spores were applied at 3 cm of distance from the roots at the opposite ends of MS plates. Inoculated and non-inoculated plants were cultured for 48, 72, 96 and 120 h. After each treatment, plants were harvested and frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. In soil experiments the *Arabidopsis* seedlings were sown in pots containing a soil mixture (one plant per pot). Each pot was maintained in a growth chamber (22 ± 1 °C) under a photoperiod of 16 h light/8 h dark until the plants were 1 month old. Then, three plants were inoculated with 1 mL of 1 × 10⁶ spore suspension of *T. atroviride* and 1 mL of water was

added to three uninoculated control plants. Aerial parts were harvested and frozen in liquid nitrogen at 2, 4 and 6 dpi.

For *A. thaliana* Ms-0 interaction with *T. atroviride*, the 15-day-old plantlets were inoculated with 10 μ L of the spore suspension (1×10^6 spores) at the bottom of the plates close to the plantlets roots, inoculated, and control plantlets were harvested and frozen in liquid nitrogen at 48, 72, 96 and 120 h.

The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 was cultivated on King's B medium [50] with appropriate antibiotics at 28 °C, when bacterial culture reached mid to late log phase growth ($OD_{600} = 0.6$ to 1.0) the bacteria from liquid culture were harvested. Cells were washed once and resuspended in 10 mM $MgCl_2$ solution, the OD_{600} was adjusted to 0.002 (1×10^6 cfu/mL) and 10 μ L of bacterial suspensions were added to each of the 20-day-old seedlings on the foliar area. Then the plantlets were harvest and frozen at different times (12, 24, 48 and 72 hpi) of interaction for RNA extraction.

The plant growth-promoting rhizobacterium *P. fluorescens* was isolated in our research group from sugar cane rhizosphere, the bacterium was grown on LB medium at 28 °C until the early stationary phase. Just before inoculation, cells were washed once and resuspended in 10 mM $MgCl_2$ solution; the OD_{600} was adjusted to 0.002 (1×10^6 cfu/mL), and 10 μ L bacterial suspension were added to the roots of each of the 20-day-old plantlets. At different time points post-inoculation (72, 96 and 120 h) the plants were harvested and frozen; similarly, uninoculated control plants were harvest at the same times for RNA extraction.

4.3. Phytohormone Application

Phytohormones were applied as a spray to 15-day-old plantlets with 0.5 \times MS solution containing ethephon, SA and MeJA at the rate of 5 mM, 5 mM and 100 μ M, respectively. The MS plates with treated seedlings were sealed and the plantlets were harvested at 1, 3 and 24 h after each treatment. Control plants were sprayed with 0.5 \times MS solution and sealed and harvest at the same time points as the treatment plants.

4.4. RNA Extraction and Real-Time qRT-PCR

Total RNA was extracted from inoculated and non-inoculated plants using the Concert™ Plant RNA reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR was performed in 10 μ L of reaction mixture made up of 5 μ L of Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2 \times), 200 nM of each oligonucleotide, 50 ng of RNA template and 0.08 μ L of RT Enzyme Mix (125 \times) for one-step RT-PCR, using an StepOne Real-Time PCR Detection System and StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions consisted of 30 min at 48 °C (cDNA synthesis), 10 min at 95 °C (Activation of AmpliTaq Gold® DNA polymerase), followed by 40 cycles for PCR cycling of 15 s at 95 °C for denature and anneal/extend of 1 min at 60 °C. These PCR reactions were repeated by triplicate for each condition. Quantification of *HR4*, *RPW8.1* and *RPW8.2* gene expression was based on a cycle threshold value and normalized to the *actin 8* (At1g49240) gene values. Absence of contaminant genomic DNA was confirmed by reactions in which no RT Enzyme Mix reverse transcriptase was added, and also primers for the *actin 8* gene were designed between two exons. The primers used were: 5'-CATCTCGAGAGACGAGAGCTAA-3' and 5'-CTGAAGCCGTCGTAAATGACTT-3'

for *HR4* (At3g50480) transcript, 5'-GGACACTAAACTTGCTGAAGTTA-3' and 5'-CAATAAT TATGGGGAATAAGAGAGA-3' for *RPW8.1* transcript, 5'-ACAAAATAATGCCTCAACCGAAG-3' and 5'-TGAGTCGTTTGACACAATTGGG-3' for *RPW8.2* transcript and 5'-GCCAGTGGTCGT ACAACCG-3' and 5'-TCATGAGGTAATCAGTAAGGTCAC-3' for *actin 8*.

5. Conclusions

Whereas many *R* genes have been characterized in plant-pathogen interactions, such as *RPW8* genes, little is known about *R* genes involved in mutualistic interactions. Our results indicate that the *HR4* gene modulates their expression in interaction with the tested microbes. It was induced in particular in *Trichoderma atroviride* interaction, suggesting that it plays a role in the process of recognition and/or establishment of the interaction. When analyzing the *Arabidopsis* ecotype Ms-0, which has *RPW8* genes instead of *HR4*, it was observed that these genes are also responsive to *T. atroviride*, suggesting that this type of *R* genes is regulated in beneficial interactions.

Acknowledgments

We are grateful to Jorge Ramírez-Salcedo, José L. Santillán-Torres, Simón Guzmán-León, and Lorena Chávez-González from the Unidad de Microarreglos de DNA-IFC-UNAM for Microarray hybridization assays. We would also like to acknowledge Shunyuan Xiao and Robert Berkey for providing the seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotype Ms-0. This work was supported by grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Fondos Sectoriales de Ciencia Básica 2008-1, México, grant no. 103106).

References

1. Zhao, S.; Qi, X. Signaling in plant disease resistance and symbiosis. *J. Integr. Plant Biol.* **2008**, *7*, 799–807.
2. Jones, J.D.; Dangl, J.L. The plant immune system. *Nature* **2006**, *444*, 323–329.
3. Lotze, M.T.; Zeh, H.J.; Rubartelli, A.; Sparvero, L.J.; Amoscato, A.A.; Washburn, N.R.; Devera, M.E.; Liang, X.; Tör, M.; Billiar, T. The grateful dead: Damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol. Rev.* **2007**, *220*, 60–81.
4. Tör, M.; Lotze, M.T.; Holton, N. Receptor-mediated signalling in plants: Molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3645–3654.
5. Zipfel, C.; Robatzek, S. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 551–554.
6. Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 539–548.
7. Zamioudis, C.; Pieterse, C.M.J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2012**, *25*, 139–150.
8. Gururani, M.A.; Venkatesh, J.; Upadhyaya, C.P.; Nookaraju, A.; Pandey, S.K.; Park, S.W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2012**, *78*, 51–65.

9. Bent, A.F.; Mackey, D. Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2007**, *1*, 399–436.
10. Xiao, S.; Wang, W.; Yang, X. Evolution of resistance genes. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **2008**, *21*, 1–25.
11. Micali, C.; Göllner, K.; Humphry, M.; Consonni, C.; Panstruga, R. The Powdery Mildew Disease of Arabidopsis: A Paradigm for the Interaction Between Plants and Biotrophic Fungi. In *The Arabidopsis Book*; American Society of Plant Biology: Rockville, MD, USA, 2008; Volume 6, pp. 1–19.
12. Xiao, S.; Ellwood, S.; Calis, O.; Patrick, E.; Li, T.X.; Coleman, M.; Turner, J.G. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* **2001**, *291*, 118–120.
13. Xiao, S.; Emerson, B.; Ratanasut, K.; Patrick, E.; O'Neill, C.; Bancroft, I.; Turner, J.G. Origin and maintenance of a broad-spectrum disease resistance locus in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21*, 1661–1672.
14. Orgil, U.; Araki, H.; Tangchaiburana, S.; Berkey, R.; Xiao, S. Intraespecific genetic variations, fitness cost and benefit of *RPW8*, a disease resistance locus in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **2007**, *176*, 2317–2333.
15. Hoyos-Carvajal, L.; Ordua, S.; Bissett, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biol. Control* **2009**, *51*, 409–416.
16. Moran-Diez, E.; Hermosa, R.; Ambrosino, P.; Cardoza, R.E.; Gutiérrez, S.; Lorito, M.; Monte, E. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2009**, *22*, 1021–1031.
17. Tucci, M.; Ruocco, M.; de Masi, L.; de Palma, M.; Lorito, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, *12*, 341–354.
18. Yoshioka, Y.; Ichikawa, H.; Naznin, H.A.; Kogure, A.; Hyakumachi, M. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest Manag. Sci.* **2012**, *68*, 60–66.
19. Contreras-Cornejo, H.A.; Macías-Rodríguez, L.I.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1579–1592.
20. Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **2012**, *158*, 17–25.
21. Viterbo, A.; Wiest, A.; Brotman, Y.; Chet, I.; Kenerley, C. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8*, 737–746.
22. Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56.
23. Lorito, M.; Woo, S.L.; Harman, G.E.; Monte, E. Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 395–417.
24. Delgado-Sánchez, P.; Ortega-Amaro, M.A.; Rodríguez-Hernández, A.A.; Jiménez-Bremont, J.F.; Flores, J. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5*, 1229–1230.
25. Delgado-Sánchez, P.; Ortega-Amaro, M.A.; Jiménez-Bremont, J.F.; Flores, J. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biol.* **2011**, *13*, 154–159.

26. Mastouri, F.; Björkman, T.; Harman, G.E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* **2010**, *100*, 1213–1221.
27. Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 377–393.
28. Bae, H.; Sicher, R.C.; Kim, M.S.; Kim, S.H.; Strem, M.D.; Melnick, R.L.; Bailey, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3279–3295.
29. Yildirim, E.; Taylor, A.G.; Spittler, T.D. Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Sci. Hortic. (Amst.)* **2006**, *111*, 1–6.
30. Alfano, G.; Ivey, M.L.L.; Cakir, C.; Bos, J.I.B.; Miller, S.A.; Madden, L.V.; Kamoun, S.; Hoitink, H.A.J. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology* **2007**, *97*, 429–437.
31. Marra, R.; Ambosino, P.; Carbone, V.; Vinale, F.; Woo, S.L.; Ruocco, M.; Ciliento, R.; Lanzuise, S.; Ferraioli, S.; Soriente, I.; *et al.* Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens using a proteome approach. *Curr. Genet.* **2006**, *50*, 307–321.
32. Segarra, G.; Casanova, E.; Bellido, D.; Odena, M.A.; Oliveira, E.; Trillas, I. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **2007**, *7*, 3943–3952.
33. Shores, M.; Harman, G.E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: A proteomic approach. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 2147–2163.
34. Moreno, C.A.; Castillo, F.; González, A.; Bernal, D.; Jaimes, Y.; Chaparro, M.; González, C.; Rodríguez, F.; Restrepo, S.; Cotes, A.M. Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2009**, *74*, 111–120.
35. Morán-Diez, E.; Rubio, B.; Domínguez, S.; Hermosa, R.; Monte, E.; Nicolás, C. Transcriptional response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Plant Physiol.* **2012**, *169*, 614–620.
36. Brotman, Y.; Lisec, J.; Méret, M.; Chet, I.; Willmitzer, L.; Viterbo, A. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology* **2012**, *158*, 139–146.
37. Shores, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2010**, *48*, 21–43.
38. Sáenz-Mata, J.; Jiménez-Bremont, J.F. Institute Potosino of Scientific and Technological Research, San Luis Potosí, SLP, México. Unpublished work, 2009.
39. Mulema, J.M.K.; Denby, K.J. Spatial and temporal transcriptomic analysis of the *Arabidopsis thaliana*-*Botrytis cinerea* interaction. *Mol. Biol. Rep.* **2012**, *39*, 4039–4049.
40. Xiao, S.Y.; Brown, S.; Patrick, E.; Brealey, C.; Turner, J.G. Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes *RPW8.1* and *RPW8.2* occurs via a salicylic acid-dependent amplification circuit and is required for hypersensitive cell death. *Plant Cell* **2003**, *15*, 33–45.

41. Wang, Y.; Ohara, Y.; Nakayashiki, H.; Tosa, Y.; Mayama, S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2005**, *18*, 385–396.
42. Verhage, A.; van Wees, S.C.M.; Pieterse, C.M.J. Plant immunity: It's the hormones talking, but what do they say? *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 536–540.
43. Pieterse, C.M.J.; Leon-Reyes, A.; van der Ent, S.; van Wees, S.C.M. Networking by small-molecules hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 308–316.
44. Bari, R.; Jones, J.D.G. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **2009**, *69*, 473–488.
45. Salas-Marina, M.A.; Silva-Flores, M.A.; Uresti-Rivera, E.E.; Castro-Longoria, E.; Herrera-Estrella, A.; Casas-Flores, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant. Pathol.* **2011**, *131*, 15–26.
46. Xiao, S.; Calis, O.; Patrick, E.; Zhang, G.; Charoenwattana, P.; Muskett, P.; Parker, J.E.; Turner, J.G. The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* **2005**, *42*, 95–110.
47. Feys, B.J.; Moisan, L.J.; Newman, M.A.; Parker, J.E. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* **2001**, *20*, 5400–5411.
48. Blanco, F.; Garreton, V.; Frey, N.; Dominguez, C.; Perez-Acle, T.; van der Straeten, D.; Jordana, X.; Holuigue, L. Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *59*, 927–944.
49. Galon, Y.; Nave, R.; Boyce, J.M.; Nachmias, D.; Knight, M.R.; Fromm, H. Calmodulin-binding transcription activator (CAMTA) 3 mediates biotic defense responses in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 943–948.
50. King, E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **1954**, *44*, 301–307.

Capítulo 3

Evaluación de la expresión de factores de transcripción de tipo WRKY en la interacción benéfica *Arabidopsis thaliana*-*Trichoderma atroviride*

RESUMEN

Los genes *WRKY*'s son un grupo de genes que codifican para factores de transcripción, que se han visto involucrados en la respuesta de las plantas en distintas interacciones con microorganismos. Los genes de este grupo que se caracterizaron transcripcionalmente en *Arabidopsis* durante la interacción con *Trichoderma* fueron: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*. Estos genes se midieron por medio de qRT-PCR en plántulas de 20 días de edad de *Arabidopsis* en interacción a distancia con el hongo *Trichoderma atroviride* a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi. Los resultados obtenidos de los qRT-PCR nos permitieron observar distintas tendencias transcripcionales. La mayoría de los genes respondieron incrementando su transcripción a medida que se establecía la interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma*. Mientras que en uno de los genes cuantificados se observó un comportamiento opuesto, a medida que la interacción se establecía, el nivel del transcrito disminuyó fuertemente. Algunos de estos factores de transcripción han sido caracterizados en interacciones con microorganismos patógenos, pero poco se sabe de su comportamiento en interacción benéficas, por lo que resulta interesante estudiar el comportamiento transcripcional de estos Factores de Transcripción en la interacción *A. thaliana*-*T. atroviride*.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*; *WRKY*; *Trichoderma atroviride*

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas por su naturaleza sésil se encuentran expuestas a una gran variedad de condiciones adversas. Para poder lidiar con todas estas condiciones las plantas han desarrollado un fino sistema de reconocimiento y respuesta a estas condiciones. Entre las condiciones hostiles las plantas se enfrentan constantemente a una gran cantidad de microorganismos patógenos que afectan su desarrollo, crecimiento y productividad. Por otro lado, las plantas también establecen interacciones con microorganismos que le aportan beneficios en su crecimiento desarrollo y le ayudan a soportar las condiciones adversas.

Las interacciones entre plantas y microorganismos resultan en asociaciones patogénicas o benéficas. Se sabe que en ambas interacciones se comparten vías de señalización que pueden participar en el establecimiento de una interacción positiva o bien una negativa. Las plantas reconocen tanto a los microorganismos patógenos como benéficos por medio de un conjunto de genes muy similares (Zhao & Qi 2008). Dos estrategias han sido descritas en plantas para detectar microorganismos; la primera involucra los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y en la segunda encontramos las proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) (Tör et al. 2009). En plantas la señalización de la respuesta inmune es iniciada con la percepción mediada por receptores (PRRs y R) de moléculas ajenas que son a menudo conservadas entre diferentes clases de microorganismos, tanto benéficos como patógenos. Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) (Dodds & Rathjen 2010; Jones & Dangl 2006). Las plantas también responden a moléculas endógenas liberadas en el proceso de invasión de los microorganismos, tales como fragmentos de pared celular o cuticular, estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociadas a peligro (DAMPs) (Lotze et al., 2007). Las PAMPs, MAMPs o DAMPs son reconocidas por PRRs, el reconocimiento de patrones moleculares culmina en la respuesta denominada inmunidad activada por MAMPS (MTI). La segunda estrategia de percepción de microorganismos involucra el reconocimiento de

efectores de microorganismos, llevado a cabo por receptores intracelulares (proteínas R). Este reconocimiento induce la inmunidad activada por efectores (ETI), la cual ha llevado a una co-evolución dinámica entre la planta y el microorganismo. Los efectores son característicamente variables y prescindibles en contraste con PAMPs y MAMPs (Zamioudis & Pieterse 2012; Gururani et al. 2012).

El control transcripcional de genes que responden a estrés biótico es una parte crucial de la respuesta de la planta a estas adversidades. La expresión espacial y temporal de genes de respuesta a microorganismos tiene un rol muy importante en esta respuesta (Rushton & Somssich 1998; Singh 2002). Los factores de transcripción junto con las hormonas vegetales orquestan la respuesta de las plantas a la interacción con otros organismos. Varios miembros de diversas familias de factores de transcripción tales como TGA-bZIP, ERF, Myb, Whirly y WRKY se encuentra involucrados con la respuesta de defensa de la planta y la regulación genética específica (Eulgem et al. 2000; Koornneef & Pieterse, 2008).

En *Arabidopsis thaliana* las proteínas WRKY están clasificadas en una de las mayores familias de factores de transcripción, la cual comprende 72 miembros (Eulgem & Somssich 2007). Las proteínas WRKY son específicas del reino vegetal (Pandey & Somssich 2009) y se caracterizan por tener uno o dos dominios WRKY (el cual le da el nombre de WRKYs) con una secuencia peptídica de 60 aminoácidos que abarca un motivo dedo de Zn. El dominio WRKY muestra una alta afinidad de unión a distintos elementos de DNA que actúan en *cis* llamados cajas W con el motivo característico TTGAC(T/C) (Dong et al. 2003). Debido a sus características estructurales, esta familia de proteínas puede ser dividida en tres grupos en *Arabidopsis*. Esta clasificación se basa en el número de dominios WRKY y en ciertas características del motivo dedo de Zn. Las proteínas AtWRKY con dos dominios WRKY pertenecen al grupo I, mientras la mayoría de las proteínas con un dominio WRKY pertenecen al grupo II. Los dominios WRKY del grupo I y II tienen el mismo tipo de motivo dedo de Zn (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X-H). El grupo III contiene un dominio WRKY y el motivo dedo de Zn se caracteriza por

tener un arreglo distinto a los dos primeros grupos (C-X₇-C-X₂₃-H-X-C) (Eulgem et al. 2000).

El género *Trichoderma* con frecuencia es encontrado en suelo, pero también se puede desarrollar en muchos otros sustratos, demostrando su adaptabilidad a innumerables condiciones ecológicas (Druzhinina et al., 2011; Lorito et al. 2010). Además de la habilidad de *Trichoderma* spp. de atacar o inhibir directamente el crecimiento de patógenos de plantas, recientes descubrimientos indican que estos también activan una resistencia localizada y sistémica a una gran variedad de patógenos de plantas (Shoresh et al. 2010; Yedidia et al. 2003). Por otra parte, ciertas cepas también tienen substancial influencia en el crecimiento y desarrollo de diversas especies vegetales. Este incremento en el crecimiento de las plantas se conoce desde hace algunos años y puede ocurrir tanto en sistemas axénicos (Yedidia et al. 2001; Contreras-Cornejo et al. 2009) como en sistemas de suelos en campo (Harman 2000). Como otros microorganismo beneficios, *Trichoderma* induce una Resistencia Sistémica Inducida (ISR) por medio de las vías del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Sin embargo, se ha reportado que este hongo también se ha reportado un solapamiento entre las vías de señalización JA/ET y el ácido salicílico (SA) dependiendo de diversas condiciones (Tucci et al. 2011; Yoshioka et al. 2012).

Los genes WRKYs juegan una variedad de roles en el desarrollo y fisiología de las plantas. Muchos genes WRKYs están involucrados en la respuesta de la planta a retos ambientales tales como sequía, calor, frío o salinidad (Chen et al. 2010; Ramamoorthy et al. 2008). Diversos de los estudios referentes a los factores de transcripción WRKY se han desarrollado en torno a la respuesta de las plantas a microorganismos patógenos, pero casi nada se ha reportado del papel de estos genes en interacciones con microorganismos benéficos (Dong et al. 2003; Eulgem & Somssich 2007; Li et al. 2006; Pandey & Somssich 2009; Ramiro et al. 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre el papel de estos genes en interacciones con microorganismos benéficos.

En el presente trabajo se investigó los patrones de transcripción de varios

genes WRKYs de *Arabidopsis* en interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*. Los genes que se caracterizaron transcripcionalmente en la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*, fueron: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*, los cuales se seleccionaron de los resultados obtenidos de microarreglos de *Arabidopsis* en interacción con *Trichoderma atroviride*.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. interacción *A. thaliana* – *T. atroviride*

Los genes WRKYs fueron seleccionados de experimentos de microarreglos de la interacción *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis* con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*. La inoculación se realizó en la raíz de las plántulas de 25 días de edad de *Arabidopsis* y los tiempos a los que se realizaron los microarreglos fueron a las 24, 48 y 72 horas post-inoculación (hpi). De los resultados de los microarreglos se analizó el grupo de genes que codifica para factores de transcripción, enfocándonos en la familia de factores de transcripción WRKYs, los cuales se ha reportado que están involucrados en la respuesta de la planta a interacciones con microorganismos, entre otras funciones. Los genes seleccionados fueron: *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*, de acuerdo a los cambios de expresión que se observaron en los microarreglos (datos no mostrados).

La inoculación del hongo se realizó a una distancia de 3 cm de la raíz de las plantas de *A. thaliana*, y se midieron transcripcionalmente los genes WRKYs a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi, tres tiempos adicionales a los análisis de los microarreglos. Durante la interacción, en los primeros dos tiempos no existe un contacto físico entre la planta y el hongo (Fig. 1, a y b), los siguientes dos tiempos inicia el contacto entre las hifas del hongo y las puntas de las raíces de las plantas (Fig. 1, c y g), y en los dos últimos tiempos ya hay una interacción física entre *Trichoderma* y las raíces de las plántulas (Fig. 1 h y i). Lo anterior nos permitió dar

un seguimiento a estos genes WRKY en la evolución de la interacción, desde la etapas de pre-interacción hasta la etapa de establecimiento de la interacción.

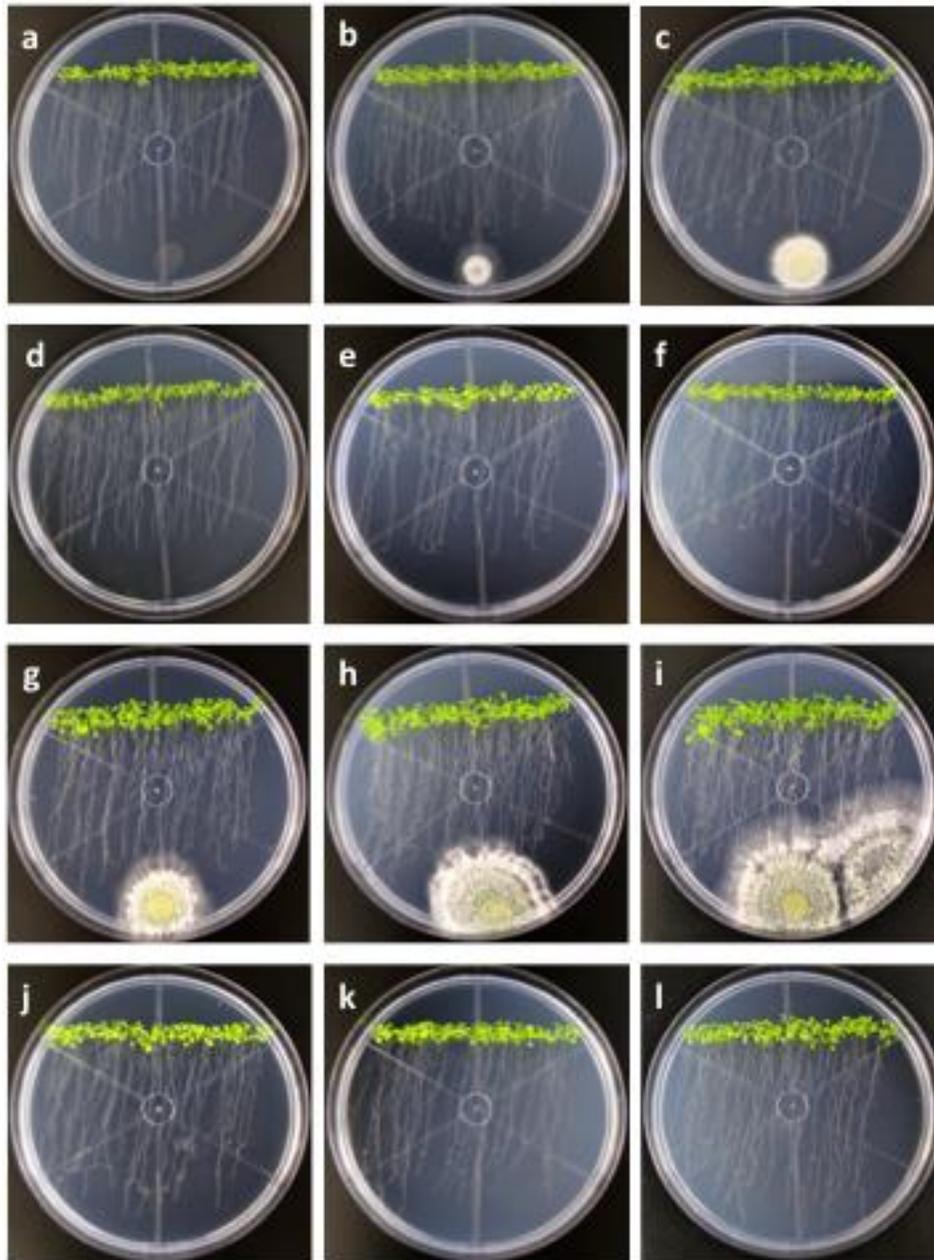


Figura 1. interacción *Arabidopsis-Trichoderma*. a, b, c, g, h y i, fotografías del desarrollo de la interacción de plántulas de *Arabidopsis* de 17 días de edad inoculadas con *T. atroviride*, las plántulas fueron fotografiadas a las 24 h (a), 48 h (b), 72 h (c), 96 h (g), 120 h (h) y 144 h (i) post-inoculación. d, e, f, j, k y l,

fotografías de plántulas control no inoculadas de *Arabidopsis* de 17 días de edad tomadas a los tiempos correspondientes de 24 h (d), 48 h (e), 72 h (f), 96 h (j), 120 h (k) y 144 h (l).

2.2. Perfil transcripcional de los genes *WRKY8*, *WRKY33* y *WRKY57* (Grupo I)

Los genes *WRKY* de *Arabidopsis* pertenecientes al grupo I (Wang et al. 2011) que se caracterizaron transcripcionalmente en la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma*, fueron el *WRKY8*, *WRKY33* y *WRKY57*.

El gen *WRKY8* fue el único que mostró un perfil de mayor inducción a menor conformó se daba la interacción (Fig. 2A). En los primeros tiempos a las 24 y 48 hpi, presentó una elevada inducción de 9.4 y 8.2 veces, respectivamente (Fig. 2A). En los tiempos posteriores cuando se da el contacto físico entre *Arabidopsis* y *Trichoderma*, el nivel del transcrito baja marcadamente a niveles de 4.5 veces a las 72 hpi e incluso se reprime -1.7 veces a las 96 hpi. En el último tiempo (144 hpi) de la interacción se observa una fuerte represión de -4.2 veces (Fig. 2A). El gen *WRKY8* se ha reportado que se induce fuertemente en hojas de *Arabidopsis* infiltradas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, sin embargo, cuando dicho gen se analizó con tratamientos con ácido salicílico (SA), no se detectó el transcrito, sugiriendo que dicho gen responde por una vía de señalización diferente a la del SA en respuesta de defensa en la planta (Dong et al. 2003). Por otro lado, Chen et al. en el 2010 reportan que el gen *WRKY8* es inducido en *Arabidopsis* por ácido abscísico (ABA), H_2O_2 , heridas y el daño producido por afidos y gusanos. Además se induce en respuesta a infecciones por *Botrytis cinerea*, por análisis en líneas mutantes insercionales y sobreexpresantes sugiere que este factor de transcripción regula la resistencia basal de manera negativa para *P. syringae* y de manera positiva para *B. cinerea* (Chen et al. 2010).

El perfil transcripcional del gen *WRKY33* en la interacción *Arabidopsis-Trichoderma* en contraste con el gen anterior, se encuentra reprimido a las 24, 48 y 72 hpi con valores de represión de -4.6, -1.1 y -2 veces, respectivamente (Fig.

2B). En los tiempos posteriores se observa una ligera inducción de 1.3, 1.3 y 1.6 veces. Se ha reportado que el gen *WRKY33* es inducido por la infección de patógenos, por tratamiento con ácido salicílico y con el herbicida paraquat el cual genera especies reactivas de oxígeno (Zheng et al. 2006). Una línea mutante insercional de este gen en *A. thaliana* aumenta la sensibilidad a los hongos necrotrofos *B. cinerea* y *Alternaria brassicicola*, mientras que la sobreexpresión de dicho gen incrementa la resistencia a estos hongos y la susceptibilidad a la bacteria *P. syringae* (Zheng et al. 2006). Este gen también se ha reportado que es inducido bajo estrés salino, dependiendo parcialmente de la biosíntesis de ABA para su expresión (Jiang & Deyholos 2009).

La caracterización transcripcional del gen *WRKY57*, al igual que el gen *WRKY33*, en el primer tiempo (24 hpi) se encuentra reprimido -4.9 veces (Fig. 2C), a las 48 hpi incrementa su transcripción a 1.7 veces, en los siguientes tiempos el transcrito es fuertemente inducido a partir de las 72 hpi (4.6 veces), llegando a su nivel más alto a las 144 hpi (7.6 veces) (Fig. 2C), los niveles de transcripción se incrementan con el inicio de contacto físico entre las hifas de *Trichoderma* y las raíces de *Arabidopsis*. Se conoce muy poca información acerca de la regulación transcripcional de este gen, únicamente se ha reportado que se induce poco en respuesta a la bacteria *P. syringae* (Dong et al. 2003).

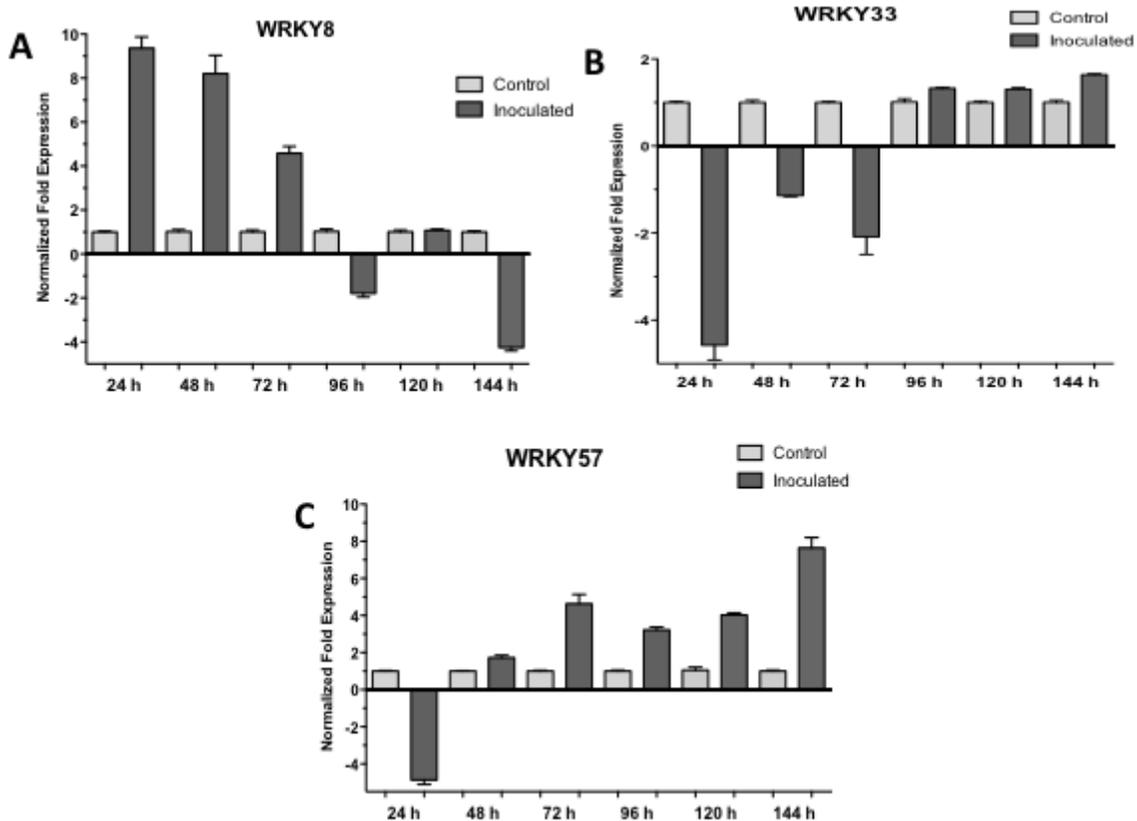


Figura 2. Análisis transcripcional de los genes *WRKY8*, *WRKY33* y *WRKY57*. Cuantificación de los genes *WRKY8* (A), *WRKY33* (B) y *WRKY57* (C) por medio de qRT-PCR, expresado como nivel de mRNA comparado con la condición control y normalizado al gen de *Actina8* de *Arabidopsis*, usando el método de umbral comparativo (“comparative treshold method”). Los análisis fueron realizados por triplicado. La condición control o plántulas no inoculada (barras color gris claro) y la condición problema o plántulas inoculadas (barras de color gris oscuro) a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi, respectivamente.

2.3. Perfil transcripcional de los genes *WRKY42* y *WRKY60* (Grupo II).

Los genes *WRKY42* y *60*, pertenecen al grupo II en la clasificación de estos factores de transcripción. Los resultados de la caracterización del gen *WRKY42* nos muestran que la activación transcripcional del gen es importante en

el establecimiento del hongo *Trichoderma*, ya que a medida que la interacción se desarrolla el aumento del transcrito es evidente. En los tiempos tempranos antes del contacto entre los organismos, el gen está reprimido con un valor de -4.8 y -2.2 veces (Fig 3A), a medida que la interacción se establece el transcrito se incrementa 1.4, 2.2 y 2.8 veces a las 72, 96 y 120 hpi, respectivamente, teniendo un pico de inducción muy fuerte en el último tiempo (144 hpi) con 10.5 veces (Fig. 3A). Se conoce poco en relación a este gen, pero por estudios dirigidos a su gen homólogo más cercano *WRKY6*, se sabe que el gen *WRKY6* actúa como regulador negativo de la expresión del gen *WRKY42* (Robatzek & Somssich 2002). Chen et al. en el 2009 determinaron por medio de la tecnología de dos híbridos que la proteína *WRKY6* interactúa con *WRKY42*, y además probaron que *WRKY42* igual que *WRKY6* se une a la región promotora del gen *PHO1* involucrado en la translocación de fosfatos (Pi) de la raíz a la parte aérea en *Arabidopsis*. Tanto *WRKY6* como *WRKY42* actúan como reguladores negativos de la transcripción del gen *PHO1* bajo condiciones normales de Pi, mientras que en condiciones de deficiencia de Pi liberan la transcripción del gen *PHO1*.

El patrón transcripcional del gen *WRKY60* es muy similar al observado en el gen *WRKY42*. Inicialmente el gen *WRKY60* se encuentra reprimido (24 hpi) -1.7 veces (Fig. 3B), al siguiente tiempo (48 hpi) ya se observa una pequeña inducción de 1.4 veces, a las 72 hpi se incrementa la inducción a 2.4 veces y en los dos siguientes tiempos 96 y 120 hpi, baja la inducción a niveles muy parecidos de 1.6 y 1.5 veces, respectivamente. En el último tiempo 144 hpi se observa su pico de inducción más alto con un valor de 6.2 veces (Fig. 3B). El gen *WRKY60* es homólogo a los genes *WRKY18* y *40*, los cuales se ha reportado que a nivel proteína interactúan físicamente entre ellos mismos y entre los tres, a través del motivo zipper de leucina en el extremo N-terminal (Xu et al. 2006). *WRKY60* es inducido en la respuesta de *Arabidopsis* a infección por patógenos y en tratamientos con SA (Dong et al. 2003). Por otro lado también se ha reportado que *WRKY60* al igual que *WRKY18* y *WRKY40*, responde positivamente a tratamientos con ABA. En tiempos cortos (1 hora) después del tratamiento con ABA no hay un significativo aumento en el transcrito de *WRKY60*, pero el nivel se

eleva arriba de 10 veces a las 12 h después del tratamiento y se mantiene inducido hasta las 24 h. Este gen también responde positivamente en tratamientos de salinidad y sequia. Además se ha reportado que *WRKY18* y *WRKY40* activan la expresión de *WRKY60* uniéndose a cajas W en la región promotora de *WRKY60* (Chen et al. 2010).

Los patrones transcripcionales de los genes *WRKY42* y *WRKY60* son parecidos en la respuesta de *Arabidopsis* a la interacción benéfica con el hongo *T. atroviride*, los dos genes se inducen fuertemente en el establecimiento de la interacción y esto nos permite sugerir que son importantes en la respuesta transcripcional de la planta al establecimiento de esta interacción benéfica. Por los trabajos reportados hasta el momento, la red de interacción con otros genes *WRKYs* es muy compleja y sería interesante estudiar los genes homólogos a *WRKY42* y *WRKY60*.

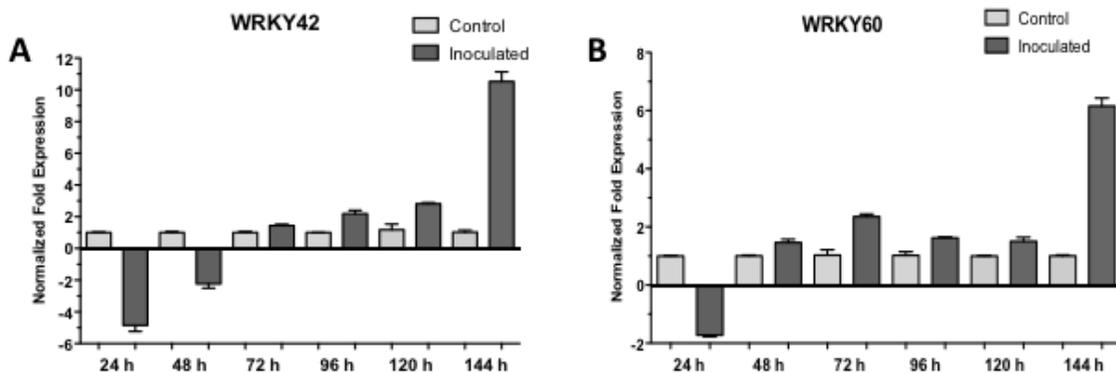


Figura 3. Análisis transcripcional de los genes *WRKY42* y *WRKY60*. Cuantificación de los genes *WRKY42* (A) y *WRKY60* (B) por medio de qRT-PCR, expresado como nivel de mRNA comparado con la condición control y normalizado al gen de *Actina8* de *Arabidopsis*, usando el método de umbral comparativo (“comparative threshold method”). Los análisis fueron realizados por triplicado. La condición control o plántulas no inoculada (barras color gris claro) y la condición problema o plántulas inoculadas (barras de color gris oscuro) a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi, respectivamente.

2.2. Perfil transcripcional de los genes *WRKY38*, *WRKY54* y *WRKY70* (Grupo III)

El factor de transcripción *WRKY38* se caracterizó por no tener cambios transcripcionales evidentes en los dos primeros tiempos (24 y 48 hpi), la inducción del gen se dio a las 72 y 96 hpi con niveles de inducción de 1.7 y 2.8 veces (Fig. 4A). Este incremento en la transcripción del gen concuerda con la etapa de contacto físico entre el hongo *Trichoderma* y las raíces de *Arabidopsis*. Después de esta inducción, a las 120 hpi los niveles de transcripción bajan casi a los valores constitutivos con un valor de 1.2 veces, y se incrementa un poco en el último tiempo a niveles de 1.6 veces (Fig. 4A). El gen *WRKY62* es el gen homólogo de *WRKY38* y se ha reportado que ambos responden incrementando su transcripción en plantas infiltradas con *P. syringae* y tratadas con la hormona SA, esta inducción es dependiente de NPR1 (Nonexpressor of PR Gene1; regulador positivo de la Respuesta Sistémica Adquirida o SAR) (Dong et al. 2003). En otro estudio se reportó que tanto *WRKY38* como *WRKY62* funcionan como reguladores negativos de la defensa basal de la planta, activando la expresión de genes desconocidos que a su vez reprimen genes de defensa como *PR1*, esta represión de la respuesta de defensa es eliminada por la intervención de la histona deacetilasa 19 (HDA19), la cual funciona como un regulador positivo de la resistencia basal a enfermedades en plantas (Kim et al. 2008).

El perfil transcripcional del gen *WRKY54* llama la atención ya que a medida que la interacción *A. thaliana-T. atroviride* se desarrolló, la transcripción siempre se incremento de un tiempo a otro, de esta manera observamos que en los tiempos tempranos, a las 24 y 48 hpi se encuentra reprimido con -7.6 y -2.3 veces (Fig 4B). En los tiempos posteriores el incremento a nivel transcripcional es constante teniendo valores de 1.7, 2.1 y 2.7 veces a las 72, 96 y 120 hpi, respectivamente, y un gran pico de inducción de 36 veces lo observamos a las 144 hpi (Fig 4B). Al igual que la mayoría de los genes antes mencionados, el gen *WRKY54* responde a tratamientos con la hormona SA. *WRKY70* fue identificado como el gen más cercano a *WRKY54* con función redundante en senescencia de hojas en *Arabidopsis*. Ambos genes, *WRKY70* y *WRKY54*, muestran patrones de

expresión similares durante el desarrollo de la hoja y son reguladores negativos de la senescencia de hojas (Besseau et al. 2012).

Los niveles de transcripción del gen *WRKY70* tuvieron grandes cambios al inicio y al final de la caracterización transcripcional en la interacción de *Arabidopsis-Trichoderma*. A las 24 hpi observamos una fuerte represión del gen con un valor de -13 veces en comparación al control (Fig. 4C), en los siguientes cuatro tiempos (48, 72, 96 y 120 hpi) tuvieron los siguientes valores transcripcionales: -1.4, 1.0, 1.4 y 1.7 veces, el último tiempo a las 144 hpi, al igual que el gen anterior presento el pico de inducción mayor con un valor de 7.6 veces (Fig. 4C). Como ya se menciona en anteriormente el gen *WRKY54* es homólogo a *WRKY70* y son redundantes. *WRKY70* actúa como un activador de genes de defensa dependientes de SA y reprime genes regulados por Ácido Jasmónico (JA). De esta manera *WRKY70* controla el balance entre las vías de defensa dependientes de SA y JA, siendo un punto de control a la respuesta de patógenos necrotrófico o biotróficos (Jing et al. 2006). El gen *WRKY70*, es un importante regulador de la senescencia de hojas, ya que en mutantes insercionales de *A. thaliana* para este gen la senescencia en hojas se acelera (Besseau et al. 2012).

El incremento en la transcripción de los genes *WRKY* del Grupo III analizados en el presente estudio resulta interesante, ya que en especialmente los genes *WRKY54* y *WRKY70*, nos permiten darnos una idea de la posible respuesta hormonal que se esta dando en el establecimiento de esta interacción benéfica, el evidente incremento de los niveles de transcripción de estos genes en especial en el último tiempo de la interacción, nos sugiere que la vía hormonal del SA juega un papel importante en la respuesta de *Arabidopsis* hacia el establecimiento de la interacción del hongo *T. atroviride*.

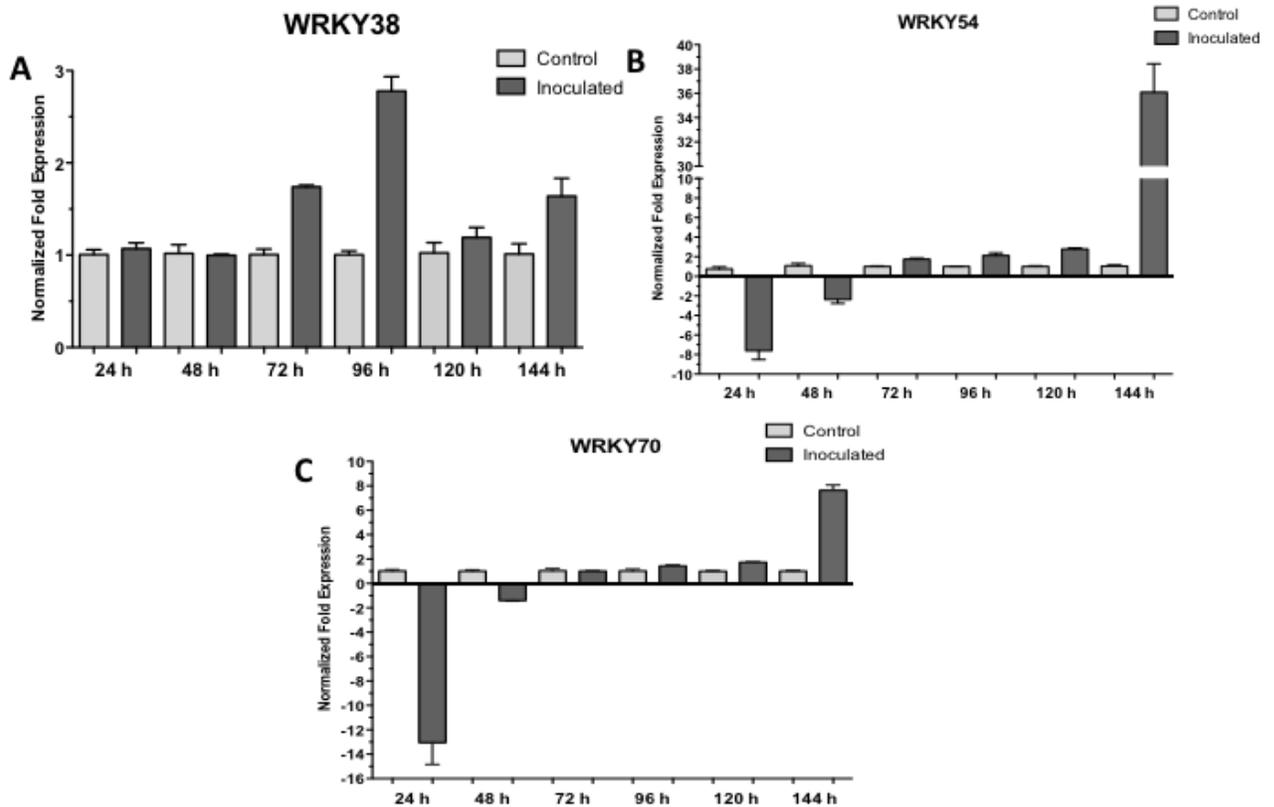


Figura 4. Análisis transcripcional de los genes *WRKY38*, *WRKY54* y *WRKY70*. Cuantificación de los genes *WRKY38* (A), *WRKY54* (B) y *WRKY70* (C) por medio de qRT-PCR, expresado como nivel de mRNA comparado con la condición control y normalizado al gen de *Actina8* de *Arabidopsis*, usando el método de umbral comparativo (“comparative treshold method”). Los análisis fueron realizados por triplicado. La condición control o plántulas no inoculada (barras color gris claro) y la condición problema o plántulas inoculadas (barras de color gris oscuro) a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi, respectivamente.

3. METODOLOGÍA

3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0 fueron esterilizadas y puestas en cajas Petri conteniendo 0.2X de medio Murashige and Skoog (MS) [1% de agar (p/v), 0.75% de sacarosa (p/v), el pH se ajusto a 7.0], las placas con las

semillas se pusieron a 4 °C por dos días para vernalización, después fueron pasadas a cámaras de crecimiento a 22 ± 1 °C por 17 días con un ciclo de 16-h-luz/8-h-oscuridad.

3.2 Condiciones de crecimiento de *Trichoderma* e inoculación de plántulas.

Trichoderma atroviride (IMI206040) fue crecido en placas Petri con PDA por 8 días a 28 °C. Las esporas fueron colectadas en agua destilada estéril y ajustadas a una densidad de 1x10⁶ esporas en 10 µL y se aplicó una gota de esta suspensión en el extremo opuesto de la caja Petri a una distancia de 3 cm de las raíces de las plántulas de *A. thaliana*. Después de la inoculación se cultivaron por diferentes períodos de tiempos: 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h post-inoculación (hpi), también las plántulas control sin inocular fueron cultivadas hasta los tiempos correspondientes. Cumplidos los tiempos de interacción planta-hongo (24, 48, 72, 96, 120 y 144 hpi) se congelaron las plántulas con nitrógeno líquido.

3.3 Extracción de RNA y RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).

El RNA total se extrajo plántulas inoculadas y no inoculadas usando el reactivo ConcertTM Plant RNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El PCR tiempo real se realizó en una mezcla de reacción de 10 µL, con 5 µL de Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2x), 200 nM de cada oligonucleótido, 50 ng de RNA molde y 0.08 µL del mix de la enzima RT (125x) para la reacción de un paso RT-PCR, se usó un sistema de detección StepOne Real Time PCR y el software StepOne v2.1 (Applied Biosystems). Las condiciones térmicas y de ciclado consistieron de 30 min a 48 °C (síntesis de cDNA), 10 min a 95 °C (activación de la DNA polimerasa AmpliTaq Gold®), seguido por 40 ciclos de PCR of 15 s a 95 °C para la desnaturalización y 1 min de alineamiento y extensión a 60 °C. Estas reacciones de PCR se realizaron por triplicado para cada condición. La cuantificación de la expresión de los genes *WRKYs* fue en base a los valores umbrales de ciclos y normalizado a los valores del gen de *Actina8*. La ausencia de contaminación con DNA genómico se confirmó por reacciones en las que no se agregó enzima RT transcriptasa reversa y también se usaron oligonucleótidos para el gen de *Actina8*

diseñados entre dos exones. Las secuencias de los oligonucleótidos usados se encuentran en la Tabla 1.

Locus	ID	Secuencia oligonucleótidos
AT2G38470	WRKY33	LP-5' CTCTAGAGCAAAGGAAGAACC RP-5' GTAGTAAAATCCTTTGGTGGCAG
AT1G69310	WRKY57	LP-5'-GCTTCACTTCTCATCATCATC RP-5'-TCAAGGGTTGCGCATAGTTTG
AT2G25000	WRKY60	LP-5'-CCGGGAGATTGATAGAGCATT RP-5'-TGACATCTATGCCTCCTAATC
AT5G46350	WRKY8	LP-5'-CTAGTGTGAACGTGAACCCTA RP-5'-CTATCATCACTTATTATGCATCC
AT3G56400	WRKY70	LP-5'-CAGGATCTCATGGTGTTTGGA RP-5'-TGTTTTCCACTCTACATGGCC
AT2G40750	WRKY54	LP-5'-GGTTTGGCAAGAGACGATGAT RP-5'-CATACTCAAAGAGAAGACCTAG
AT4G04450	WRKY42	LP-5'-GTTTTCGGGTTTACATATGCC RP-5'-GTTATTGCCTATTGTCAACGT
AT5G22570	WRKY38	LP-5'GAATATCTATCATCACCATCAGG RP-5'GCTGAAAAATCTAGTGCAATCA
AT1G49240	ACTINA8	LP-5-CATCTCGAGAGACGAGAGCTAA RP-5'-CTGAAGCCGTCGTAAATGACTT

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos de cada gen usados en los qRT-PCRs

5. CONCLUSIONES

Con el objetivo de identificar genes de *Arabidopsis thaliana* implicados en la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma atroviride*, se realizaron estudios transcripcionales globales durante la interacción de *A. thaliana* con el hongo benéfico *Trichoderma*. En el análisis de los datos de los microarreglos nos enfocamos en genes *R* y factores de transcripción, ya que estos genes son los principales moduladores de la respuesta de las plantas a microorganismos. Siguiendo estos criterios se seleccionaron los siguientes genes: *HR4*, *WRKY8*, *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70*, los cuales se caracterizaron transcripcionalmente en la interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma*.

El gen *HR4* de *Arabidopsis* se observó que incrementaba su transcripción a medida que la interacción con *Trichoderma* se desarrollaba. Las proteínas codificadas por los genes *R*, son las activadoras iniciales de la respuesta de las plantas a los microorganismos por medio del reconocimiento de efectores. El incremento en la transcripción del gen *HR4* de *A. thaliana* (Col-0) nos sugiere, que de alguna manera este gen participa en la respuesta de la planta a la interacción con el hongo *Trichoderma*.

Por otro lado, se caracterizó también el gen *HR4* en la interacción con la bacteria benéfica *Pseudomonas fluorescens* y con la bacteria patogénica *Pseudomonas syringae*. En estas interacciones también se observó la inducción del gen, lo anterior es importante ya que a nivel transcripcional el gen responde a un amplio rango de interacciones tanto benéficas como patogénicas. Las plantas al detectar algún microorganismo activan la expresión de receptores y genes *R*, que les permiten estar alertas en el desarrollo de la infección o bien para protegerse de otros microorganismos, esto de cierta manera podría explicar este amplio rango de respuesta a diferentes microorganismos.

El perfil transcripcional del gen *HR4* se investigó en tratamientos hormonales en plántulas de *Arabidopsis*. Los tratamientos con ácido salicílico, metil jasmonato y etileno, indujeron fuertemente la transcripción después de su

aplicación. Estos resultados nos permiten concluir que este gen tiene la capacidad de responder a las principales hormonas involucradas en la respuesta de las plantas hacia los microorganismos. Lo anterior no es muy común entre los genes *R*, ya que principalmente responden a una de las vías hormonales, ya sea a la del SA o la del MeJA/Et.

Los genes *RPW8.1* y *RPW8.2* presentes en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Ms-0, los cuales son homólogos al gen *HR4* del ecotipo Col-0, también fueron inducidos en la interacción con *Trichoderma*. Esto nos dice que el mecanismo en el que están involucrados estos genes se ha conservado entre los dos ecotipos de *Arabidopsis*. Además de responder a patógenos como los hongos del powdery Mildew, también son activos en la respuesta de la planta a interacciones benéficas.

Los genes que codifican para los factores de transcripción WRKY se midieron transcripcionalmente en la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*. Se observó que los genes *WRKY33*, *WRKY38*, *WRKY42*, *WRKY54*, *WRKY57*, *WRKY60* y *WRKY70* responden a la interacción con una tendencia a incrementar su transcripción. La inducción de la mayoría de los factores de transcripción es interesante ya que los factores de transcripción son activadores o represores de una gran cantidad de genes involucrados en la respuesta a microorganismos. Por otro lado, el gen *WRKY8* fue reprimido a medida que la interacción se desarrollaba. Este resultado junto con los anteriores nos permiten darnos cuenta de la diversidad de respuestas transcripcionales requeridas para regular los genes involucrados en la interacción de las plantas con los microorganismos. Además se ha reportado que algunos de estos factores de transcripción responden a hormonas como el SA, lo que permite darnos una idea de que esta hormona podría estar jugando un papel importante en la respuesta de *Arabidopsis* a *Trichoderma*.

6. REFERENCIAS

- Adams, P.B., 2011. The Potential of Mycoparasites for Biological Control of Plant Diseases*. , pp.1–14.
- Aharoni, A. & Vorst, O., 2002. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant molecular biology*, 48(1-2), pp.99–118.
- Alfano, G. et al., 2007. Systemic Modulation of Gene Expression in Tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*, 97(4), pp.429–437.
- Alonso, J.M., 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), pp.653–657.
- Arnould, C. et al., 2005. *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* Trigger DMI3-Dependent Activation of Genes Related to a Signal Transduction Pathway in Roots of *Medicago truncatula* 1. , 139(October), pp.1065–1077.
- Bae, H. et al., 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 24(3), pp.336–51.
- Bae, H. et al., 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of experimental botany*, 60(11), pp.3279–95.
- Baker, R., Elad, Y. & Chet, Ilan, 1984. The Controlled Experiment in the Scientific Method with Special Emphasis on Biological Control. , 74(9), pp.1019–1021.
- Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), pp.11–8.
- Berlec, A., 2012. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. *Plant Science*, 194, pp.96–102.
- Besseau, S., Li, Jing & Palva, E.T., 2012. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, pp.1–13.
- Bonfante, P. & Requena, N., 2011. Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 14(4), pp.451–7.

- Brotman, Y. et al., 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant physiology*, 147(2), pp.779–89.
- Chacón, M.R. et al., 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International microbiology the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 10(1), pp.19–27.
- Chen, H. et al., 2010. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC plant biology*, 10(1), p.281.
- Chen, Ligang, Zhang, L. & Yu, D., 2010. Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 23(5), pp.558–65.
- Chen, Lihua et al., 2011. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), pp.1653–63.
- Contreras-Cornejo, H A et al., 2009. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 149(3), pp.1579–1592.
- Contreras-Cornejo, Hexon Angel et al., 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 6(10).
- Delgado-Sánchez, P. et al., 2011. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 13(1), pp.154–9.
- Delgado-Sánchez, P., 2010. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signaling & ...*, (October), pp.1–2.
- Dodds, P.N. & Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Publishing Group*, 11(8), pp.539–548.
- Dong, J., Chen, C. & Chen, Z., 2003. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant molecular biology*, 51(1), pp.21–37.

- Donoso, E.P. et al., 2008. Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Applied and environmental microbiology*, 74(5), pp.1412–7.
- Druzhinina, I.S. et al., 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(10), pp.749–759.
- Eulgem, T et al., 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science*, 5(5), pp.199–206.
- Eulgem, Thomas & Somssich, Imre E, 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current opinion in plant biology*, 10(4), pp.366–71.
- Gottel, N.R. et al., 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and environmental microbiology*, 77(17), pp.5934–44.
- Gravel, V., Antoun, H. & Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry*, 39(8), pp.1968–1977.
- Grondona, I. et al., 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), pp.3189–3198.
- Gururani, M.A. et al., 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, pp.51–65.
- Harman, G E, 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*.
- Harman, Gary E, Petzoldt, R., et al., 2004. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2), pp.147–153.
- Harman, Gary E, Howell, Charles R, et al., 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), pp.43–56.
- Harrison, M.J., 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual review of microbiology*, 59, pp.19–42.

- Howell, C R, 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*.
- Jiang, Y. & Deyholos, M.K., 2009. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant molecular biology*, 69(1-2), pp.91–105.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–329.
- Kalde, M. et al., 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 16(4), pp.295–305.
- Kim, K.-C. et al., 2008. *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant cell*, 20(9), pp.2357–71.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.-M. & Zhang, S., 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), pp.1259–1266.
- Koornneef, A. & Pieterse, C.M.J., 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*, 146(3), pp.839–44.
- Koornneef, M. & Meinke, D., 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), pp.909–921.
- Li, Jing et al., 2006. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 46(3), pp.477–91.
- Lorito, M. et al., 2010. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), pp.395–417.
- Lotze, M.T. et al., 2007. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological reviews*, 220(1), pp.60–81.
- Mastouri, F., Björkman, T. & Harman, Gary E, 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), pp.1213–21.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M. & Takenaka, S., 2011. Plant Growth-Promoting Fungus, *Trichoderma koningi* Suppresses Isoflavonoid Phytoalexin Vestitol

- Production for Colonization on/in the Roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and Environments*, 26(2), pp.128–134.
- Meinke, D.W., 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282(5389), pp.662–682.
- Mia, M.A.B. & Shamsuddin, Z.H., 2010. Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. , 9(37), pp.6001–6009.
- Morán-Diez, E. et al., 2012. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of plant physiology*, 169(6), pp.614–20.
- Nagel, A. et al., 2005. Extension of the Visualization Tool MapMan to Allow Statistical Analysis of Arrays , Display of Corresponding Genes , and Comparison with Known Responses 1. , 138(July), pp.1195–1204.
- Oldroyd, G.E.D., Harrison, M.J. & Paszkowski, U., 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), pp.753–4.
- Pandey, S.P. & Somssich, Imre E, 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology*, 150(4), pp.1648–55.
- Pozo, M.J. & Azcón-Aguilar, C., 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), pp.393–398.
- Ramamoorthy, R. et al., 2008. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant & cell physiology*, 49(6), pp.865–79.
- Ramiro, D. et al., 2010. Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens. *Tree Genetics & Genomes*, 6(5), pp.767–781.
- Redford, A.J. et al., 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental microbiology*, 12(11), pp.2885–93.
- Robatzek, Silke & Somssich, Imre E, 2002. Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. , pp.1139–1149.
- Rotter, A. et al., 2007. Adaptation of the MapMan ontology to biotic stress responses: application in solanaceous species. *Plant methods*, 3, p.10.
- Ruocco, M. et al., 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction

- with different plant-pathogenic fungi. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(3), pp.291–301.
- Rushton, Paul J. & Somssich, Imre E., 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(4), pp.311–315.
- Salas-Marina, M.A. et al., 2011. Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), pp.15–26.
- Segarra, G. et al., 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *PROTEOMICS*, 7(21), pp.3943–3952.
- Selosse, M.A. & Rousset, F., 2011. The Plant-Fungal Marketplace. *Science*, 333(6044), pp.828–829.
- Shoresh, M & 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*, 147(4), pp.2147–2163.
- Shoresh, Michal, Harman, Gary E & Mastouri, F., 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), pp.21–43.
- Shoresh, Michal, Yedidia, Iris & Chet, Ilan, 2005. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum*T203. *Phytopathology*, 95(1), pp.76–84.
- Singh, K., 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), pp.430–436.
- Spaink, H.P., 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual review of microbiology*, 54, pp.257–88.
- Stergiopoulos, I. & de Wit, P.J.G.M., 2009. Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, 47, pp.233–63.
- Stukenbrock, E.H. & McDonald, B.A., 2008. The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), pp.75–100.
- Thimm, O. et al., 2004. Mapman: a User-Driven Tool To Display Genomics Data Sets Onto Diagrams of Metabolic Pathways and Other Biological Processes. *The Plant Journal*, 37(6), pp.914–939.

- Tsahouridou, P.C. & Thanassouloupoulos, C.C., 2002. Proliferation of *Trichoderma koningii* in the tomato rhizosphere and the suppression of damping-off by *Sclerotium rolfsii*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(6), pp.767–776.
- Tucci, M. et al., 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp . on tomato is modulated by the plant genotype. , 12, pp.341–354.
- Tör, M., Lotze, M.T. & Holton, N., 2009. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of experimental botany*, 60(13), pp.3645–54.
- Uehlein, N. et al., 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry*, 68(1), pp.122–9.
- Vargas, W. a, Mandawe, J.C. & Kenerley, C.M., 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant physiology*, 151(2), pp.792–808.
- Viterbo, A. et al., 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS microbiology letters*, 305(1), pp.42–8.
- Viterbo, A.D.A. & Chet, Ilan, 2006. TasHyd1 , a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* , is involved in plant root colonization. , 7, pp.249–258.
- Vizcaíno, J. a et al., 2006. ThPTR2, a di/tri-peptide transporter gene from *Trichoderma harzianum*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 43(4), pp.234–46.
- Walker, T.S. et al., 2003. Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology 1. , 132(May), pp.44–51.
- Xu, X. et al., 2006. Physical and Functional Interactions between and WRKY60 Transcription Factors. , 18(May), pp.1310–1326.
- Yedidia, I, Benhamou, N & Chet, I, 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) By the biocontrol agent *trichoderma harzianum* . *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), pp.1061–1070.
- Yedidia, I, Srivastva, A.K. & Kapulnik, Y, 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*.
- Yedidia, Iris et al., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma*

asperellum (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), pp.7343–7353.

Yoshioka, Y. et al., 2012. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. *Pest management science*, 68(1), pp.60–6.

Zamioudis, C. & Pieterse, C.M.J., 2012. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 25(2), pp.139–50.

Zhao, S. & Qi, X., 2008. Signaling in Plant Disease Resistance and Symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7), pp.799–807.

Zheng, Z. et al., 2006. *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 48(4), pp.592–605.