



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Acumulación diferencial de poliaminas y de los
transcritos de las argininas descarboxilasas de
Arabidopsis durante la interacción con dos cepas de
*Trichoderma***

Tesis que presenta

M. en C. Fatima Berenice Salazar Badillo

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Enero 2016



Constancia de aprobación de la tesis

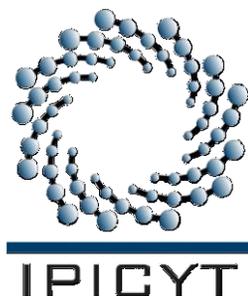
La tesis "*Acumulación diferencial de poliaminas y de los transcritos de las argininas descarboxilasas de Arabidopsis durante la interacción con dos cepas de Trichoderma*" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Fatima Berenice Salazar Badillo** y aprobada el veintiuno de enero del dos mil dieciséis 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. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

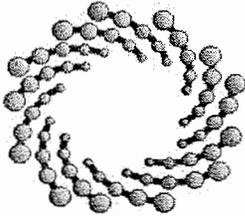
Dr. Pablo Delgado Sánchez
Miembro del Comité Tutorial



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. 332302**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 081 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 21 días del mes de enero del año 2016, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dr. Pablo Delgado Sánchez	Sinodal externo	UASLP

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Fatima Berenice Salazar Badillo

sobre la Tesis intitulada:

Acumulación diferencial de poliaminas y de los transcritos de las argininas descarboxilasas de Arabidopsis durante la interacción con dos cepas de Trichoderma

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

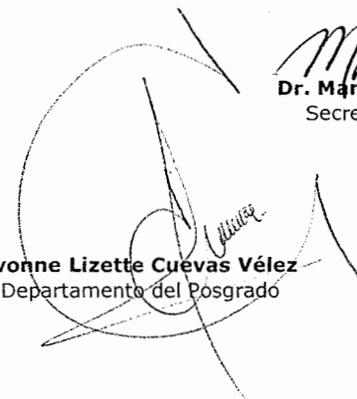
El Jurado, después de deliberar, determinó

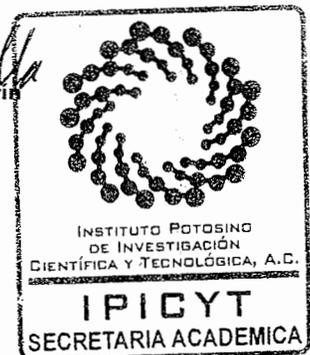
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de enero de 2016.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

Este trabajo está dedicado con toda mi alma y corazón a:

Mis padres: Lula y Cuco

Por su cariño, apoyo incondicional, comprensión, consejos, palabras de motivación y superación las cuales me han permitido sacar el posgrado y la vida adelante. Los amo y son muy importantes en mi vida. Ellos saben que este logro no había sido posible sin ellos por lo cual también es de ellos. Gracias por estar siempre sin importar nada.

Mi Familia: Massiel y Rodrigo

Los amo y les agradezco por llenar de luz mi vida.

Massi te agradezco el que me escuchas, apoyas, me das alegría y felicidad, el que te preocupas y me das palabras de ánimo para seguir adelante. Principalmente te agradezco por haber llenado mi vida con nuestro hermoso hijo.

Rodri me haces tan feliz, tan plena, haces que todo pase. Eres mi vida, mi motivación para seguir adelante y así demostrarte que todo lo que sueñes se puede conseguir si trabajas por ello y te esfuerzas.

Mis Hermanos: Cuco, Jorge y Marco

Porque en su momento cada uno de ellos ha sido mi inspiración, motivación y apoyo para seguir cumpliendo mis metas.

Mis niños: Itzel, Jorge, Cuco, Angel, Toño, Markis y Lupita.

Gracias por siempre aportarle alegría, travesuras, ocurrencias y diversión a mi vida.

Agradecimientos

A Dios por permitirme existir y cumplir mis metas.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por el apoyo institucional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias, con beca número de registro 332302, así como por la beca mixta otorgada en el año del 2013 para realizar una estancia doctoral en la universidad de Lincoln Nueva Zelanda en el Bio-Protection Research Centre.

Al Bio-Protection Research Centre y la Universidad de Lincoln en Nueva Zelanda, por el apoyo económico para la realización de una estancia doctoral en el año del 2013.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. Además agradezco el que me compartió sus enseñanzas, experiencias, me dio consejos y amistad, con lo cual pude crecer tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. Artemio Mendoza Mendoza y la Dra. María Fernanda Nieto Jacobo por la confianza, apoyo y enseñanzas otorgadas durante la estancia doctoral. Así mismo, agradezco sus palabras de motivación y reconocimiento del trabajo que realice, ya que estas me permitieron recobrar no solo la confianza en mi trabajo sino también las ganas de convertirme en investigadora.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, Dr. Samuel Lara González y el Dr. Pablo Delgado Sánchez por sus sugerencias y el tiempo empleado para la revisión de esta tesis.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, la Dra. María de la Luz Guerrero González, la Dra. Silvia Salas Muñoz, la Dra. Diana Sánchez Rangel y el Dr. Jorge Sáenz Mata por sus enseñanzas, consejos y sugerencias en mi trabajo de posgrado. Así como por la amistad que siempre me otorgaron.

A los que han sido y son mis compañeros de laboratorio: Luz, Jorge, Silvia, Azu, Isra, Itzel, Adriana, Laura, Joselyn, Edgar, Diana y Alicia, por todos sus consejos, apoyo y momentos divertidos que hemos compartido.

A mis amigos Diana, Alan, Fer, Bere, Gema, Gena, Luis, Saúl, Janeth, Cintya, Fabi, Juanita, Massi, Jessica, Mohammed, Peter, Nicolas, Suddie, Adrienne que han estado apoyándome y aconsejándome en esta etapa de posgrado

ÍNDICE

	Página
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
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Interacción planta – microorganismo benéfico	2
2.2 Respuesta de la planta hacia los microorganismos benéficos	5
2.3 <i>Trichoderma</i> spp.	8
2.3.1 Efecto de <i>Trichoderma</i> en plantas	8
2.3.1.1 Efecto de promoción de crecimiento en plantas por <i>Trichoderma</i>	9
2.3.1.2 Inducción del sistema de defensa de la planta y tolerancia al estrés biótico por <i>Trichoderma</i>	10
2.3.1.3 <i>Trichoderma</i> induce tolerancia al estrés abiótico en plantas	12
2.3.1.4 Cambios génicos a nivel global en plantas inoculadas con <i>Trichoderma</i>	13
2.3.2 Establecimiento de la interacción Planta- <i>Trichoderma</i>	15
2.4 Interacción <i>Arabidopsis</i> – <i>Trichoderma</i> como modelo de	15

estudio	
III. OBJETIVOS	17
IV. RESULTADOS	18
Capítulo 1 Variación de los niveles de poliaminas de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante la interacción con diferentes cepas de <i>Trichoderma</i>	18
Capítulo 2 Análisis de la expresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> asociados a la vía de auxinas en interacción con <i>Trichoderma</i> en un sistema de contacto directo y a distancia	22
4.1 El crecimiento de <i>Trichoderma</i> en diferentes sustratos afecta la promoción de crecimiento inducido en plantas de <i>Arabidopsis</i>	26
4.2 Regulación diferencial de genes de respuesta a auxinas durante la interacción <i>Arabidopsis</i> - <i>Trichoderma</i>	32
4.3 Metodología	37
V. DISCUSION	41
VI. CONCLUSIONES	46
VII. REFERENCIAS	47

Lista de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Bio-control de microorganismos benéficos en las plantas	4
2	Resistencia inducida provocada por microorganismos	5
3	Representación esquemática de los componentes moleculares y mecanismos implicados en la resistencia sistémica adquirida inducida por microorganismos benéficos	7
4	Regulación transcripcional mediada por auxinas	25
5	Fenotipo en plántulas de <i>Arabidopsis</i> durante la interacción con los hongos <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Trichoderma virens</i>	27
6	Efecto de la inoculación de dos especies de <i>Trichoderma</i> en el crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	29
7	Fenotipo en plántulas de <i>Arabidopsis</i> durante la interacción con los hongos <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Trichoderma virens</i>	30
8	Efecto de la inoculación de dos especies de <i>Trichoderma</i> en el crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	31
9	Expresión del gen <i>ARF6</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante la interacción con <i>Trichoderma</i> spp.	34
10	Expresión del gen <i>ARF8</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante la interacción con <i>Trichoderma</i> spp.	36

Resumen

Acumulación diferencial de poliaminas y de los transcritos de las argininas descarboxilasas de *Arabidopsis* durante la interacción con dos cepas de *Trichoderma*

Dentro de su entorno las plantas interactúan con una amplia gama de microorganismos. El estudio de estas interacciones se ha centrado en aquellas consideradas como patogénicas, por lo cual, es necesario estudiar la biología, la bioquímica y genética de las interacciones benéficas. El presente trabajo se enfocó en dilucidar algunas de las moléculas involucradas en la promoción de crecimiento ejercido en plántulas de *Arabidopsis thaliana* por el hongo benéfico *Trichoderma spp.*, en una interacción a distancia y en contacto directo. Por lo anterior, lo primero que se llevó a cabo fue el análisis de parámetros de crecimiento vegetal tales como peso fresco, longitud de raíz principal y número de raíces secundarias de *Arabidopsis thaliana* en la interacción en contacto directo y a distancia con dos cepas del hongo *Trichoderma*, *T. virens* y *T. atroviride*, a los 3 y 5 días post inoculación. En ambos tiempos de interacción se observó un incremento en el crecimiento y desarrollo de las plántulas, así mismo el número de las raíces laterales aumentó e interesantemente la raíz principal no inhibió su crecimiento en las plántulas que interactuaron a distancia con respecto a las plántulas en interacción directa. Lo anterior, nos llevó a estudiar ciertas moléculas involucradas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tales como las poliaminas y las auxinas. Las poliaminas son pequeñas moléculas implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en el establecimiento de las interacciones planta - microorganismo. Mientras que las auxinas son pequeñas hormonas vegetales producidas en muy bajas concentraciones, las cuales también juegan un papel clave en el desarrollo de las plantas. En lo que respecta a las poliaminas se analizó el perfil de las poliaminas superiores putrescina, espermidina y espermina en la interacción *Arabidopsis* – *Trichoderma* en el sistema dividido y a distancia. Los resultados mostraron un perfil diferencial de estas poliaminas, lo cual es dependiente del tiempo de interacción, tipo de interacción, así como de la especie de *Trichoderma*. Finalmente en lo que respecta a las auxinas se analizó la expresión de dos de los factores de respuesta a auxinas, el *ARF6* y *ARF8*. Los resultados mostraron una expresión diferencial en ambos genes, la cual fue dependiente de las condiciones de la interacción, lo cual se relaciona directamente con el crecimiento vegetativo de las plantas. En conjunto los resultados evidencian que los reguladores de crecimiento tales como las poliaminas y las auxinas juegan un papel en la interacción.

PALABRAS CLAVE. *Arabidopsis thaliana*; *Trichoderma atroviride*; *Trichoderma virens*; poliaminas; auxinas; interacción a distancia

Abstract

Differential accumulation of polyamines and transcripts of arginine decarboxylase of *Arabidopsis* during the interaction with two *Trichoderma* species

Within their environment plants interact with a wide range of microorganisms. The study of interactions has focused on those considered to be pathogenic, whereby it is necessary understand the biology, biochemistry and genetics of beneficial interactions. This research focused in analyze some molecules involved in the growth promotion exerted on *Arabidopsis* seedlings by the beneficial fungus *Trichoderma* spp., in a direct contact and split system interaction. We quantified biomass production and parameters of root architecture such as primary root length, number of emerged lateral roots, and lateral root density at 3 or 5 days post-inoculation (dpi) during direct contact and split system interaction with the two fungal strains used: *Trichoderma virens* and *Trichoderma atroviride*. In both times of interaction an increase in growth and development of plantlets, as well as an increase on number of lateral roots was observed. Interestingly not inhibition of primary root length was observed on plantlets that growth without fungus contact. The above, led us to study molecules involved in the growth and development of plants, such as polyamines and auxin. Polyamines are small molecules implicated in several plant growth and developmental processes, also in the establishment of plant - microbe interactions. Auxins are small plant hormones produced in very low concentrations, which play a key role in the development of plants. Regarding to polyamines, the free levels of the main polyamines in plants, putrescine, spermidine and spermine were quantified in the *Arabidopsis* – *Trichoderma* split and contact interaction. The results showed a differential profile of these polyamines, which are dependent of time and type of interaction, as well as the *Trichoderma* species. Finally the expression of two auxin response factors, ARF6 and ARF8, were analyzed. The results showed differential expression in both genes, this was dependent on the conditions of interaction, therefore is directly related to the vegetative growth of plants. Overall, our results show that growth regulators such as auxin and polyamines play a role in the *Arabidopsis* – *Trichoderma* interaction.

KEY WORDS. *Arabidopsis thaliana*; *Trichoderma atroviride*; *Trichoderma virens*; polyamines; auxins; split growth system.

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza las plantas interactúan con una gran variedad de microorganismos. Dentro de estos están las bacterias, hongos, actinomicetos y algas. Las interacciones más conocidas son aquellas que repercuten de manera perjudicial en la planta por lo cual son consideradas como patogénicas (Pozo *et al.* 2005; Berendsen *et al.* 2012). Sin embargo, existen otro tipo de interacciones denominadas benéficas, en donde la planta se ve influenciada de manera positiva en diversos aspectos como: en la absorción de minerales, la fijación de nitrógeno, la promoción del crecimiento, la resistencia al estrés biótico, y la tolerancia al estrés abiótico (Bais *et al.* 2006; Pieterse *et al.* 2014).

Recientemente, el estudio de los mecanismos involucrados en las interacciones benéficas planta - microorganismo se ha vuelto altamente relevante. Lo anterior, es debido a que al entender cómo es que se reduce el daño causado en los cultivos por diversos factores ambientales, como las temperaturas extremas, el exceso de radiación solar, la sequía, salinidad y la deficiencia de nutrientes durante las interacciones benéficas, se pueda contribuir a la adopción de una agricultura sustentable. Aunado a esto, se ha visto que existe un incremento en los rendimientos de los cultivos, ya que los efectos del cambio climático han provocado graves daños en la producción agrícola (Coleman-Derr y Tringe, 2014).

A pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos involucrados durante el establecimiento y desarrollo de las interacciones benéficas llevadas a cabo entre diversas plantas y microorganismos, aun es necesario continuar dilucidando no solo los procesos, sino también las moléculas involucradas en la respuesta coordinada y precisa llevada a cabo entre ambos organismos durante la interacción.

II. ANTECEDENTES

2.1 Interacción planta – microorganismo benéfico

Desde hace más de una década se ha reportado que algunas especies de microorganismos actúan de forma benéfica durante su interacción con las plantas. Dentro de los beneficios aportados por los microorganismos hacia las plantas esta su capacidad de degradar la materia orgánica presente en el suelo, lo cual lleva a la liberación de minerales esenciales para estas, fijar nitrógeno atmosférico, producir sideroforos y metabolitos relacionados al crecimiento y desarrollo, así como la producción de antibióticos y la parasitación de microorganismos que pudieran tener un efecto nocivo en las plantas (Bhattacharyya y Jha, 2012; Russo *et al.* 2012). Esta diversidad de efectos benéficos observados en las plantas, ha llevado a la producción de biofertilizantes a base de microorganismos benéficos con el fin de contribuir al desarrollo de una agricultura sustentable (Higa y Parr, 1994; Bashan, 1998; Berg, 2009; Babalola, 2010). Dichos microorganismos se han clasificado en dos grandes grupos de acuerdo al efecto benéfico que ejercen al establecerse en asociación con la planta huésped:

a) Microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Microorganism o PGPM). Este tipo de microorganismos habitan en la rizosfera de las plantas e influyen en la absorción de nutrientes, el crecimiento y desarrollo vegetal (Vessey *et al.* 2003, Avis *et al.* 2008). Se ha reportado que algunas bacterias promotoras de crecimiento de plantas (Plant growth-promoting bacteria, PGPB) regulan directamente la morfología de las plantas, al incrementar la disponibilidad de minerales o nitrógeno del suelo, y/o sintetizar hormonas vegetales, lo que contribuye a incrementar el crecimiento vegetal (Burr *et al.* 1984; Joseph *et al.* 2007; Yasmin *et al.* 2007; Saharan and Nehra, 2011). Dentro de este

tipo de microorganismos encontramos a algunas especies del genero *Pseudomonas*, las cuales solubilizan fosforo orgánico (Richardson *et al.* 2001, Mehnaz *et al.* 2006); *Rhizobium* que produce reguladores de crecimiento vegetal, solubiliza el fosfato orgánico e inorgánico (Antoun *et al.* 1998), produce antibióticos y actúa competitivamente con otros microorganismos (Siddiqui *et al.* 1998, Huang *et al.* 2007); así mismo algunas especies de *Azospirillum* y *Azotobacter* tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (Yamprai *et al.* 2014; Jafari *et al.* 2015), entre otros.

b) Microorganismos que actúan como agentes de control biológico (Biological Control Agents o BCA). Estos son considerados como benéficos ya que ayudan a contrarrestar los efectos negativos de los fitopatógenos (Fig. 1) en las plantas, lo cual incrementa el crecimiento, desarrollo y productividad de la planta (Shen *et al.* 2002, Avis *et al.* 2008, Sang *et al.* 2008; Mastouri *et al.* 2010). Dentro de estos microorganismos encontramos a las micorrizas, de estas un ejemplo es el género fúngico *Glomus*, el cual produce fitoalexinas (compuestos antimicrobianos) y enzimas asociadas a los mecanismos de defensa de las plantas (Whipps *et al.*, 2004). Otro ejemplo de microorganismos biocontroladores son algunas cepas de los géneros bacterianos *Pasteuria*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Meloidogyne*, entre otras. Las cuales se saben que controlan a varios nematodos de plantas (Emmert y Handelsman, 1999; Siddiqui y Mahmood, 1999; Meyer 2003).

Es importante resaltar que existen microorganismos benéficos que pueden ser incluidos en ambos grupos, debido a sus multifacéticos mecanismos de acción. Dentro de estos microorganismos está el hongo *Trichoderma* spp., que tiene la capacidad de solubilizar y mejorar la absorción de macro y micronutrientes (Kleifeld y Chet, 1992; Altomare *et al.* 1999; Yedidia *et al.* 2001), sintetiza compuestos biológicamente activos como lo son: enzimas degradadoras de la pared celular, metabolitos secundarios y antibióticos (Vinale *et al.* 2008; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Hung *et al.* 2013), además parasita y compite por el nicho con otros

microorganismos, entre otros (Benítez *et al.* 2004; Avis *et al.* 2008; Vinale *et al.* 2008; Yadav *et al.* 2009).

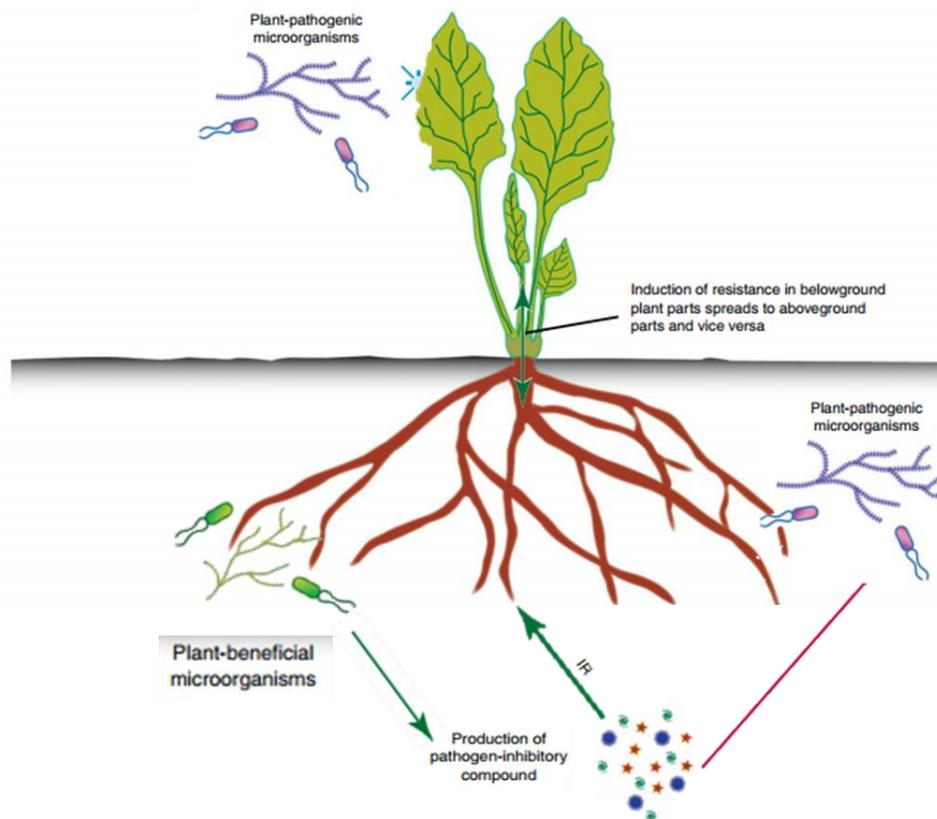


Figura 1. Biocontrol de microorganismos benéficos en las plantas. A través de la producción de compuestos biostático o biocidas, los cuales tienen la capacidad de detener el crecimiento y neutralizar microorganismos, o mediante la activación del sistema de defensa de la planta, este tipo de microorganismos ejercen un efecto benéfico en las plantas. La producción de antibióticos o enzimas líticas al igual que la activación del sistema de defensa de la planta a través del priming contrarresta a los microorganismos fitopatógenos. IR (por sus siglas en inglés, induced resistance). Tomado y modificado de Berendsen *et al.* 2012.

2.2 Respuesta de la planta hacia los microorganismos benéficos

Al igual que otros organismos, las plantas tienen la capacidad de sentir los microorganismos de su entorno, ya sean simbióticos o no, estos son reconocidos como organismos extraños, por lo que las plantas activan mecanismos de reconocimiento y de defensa (Fig. 2).

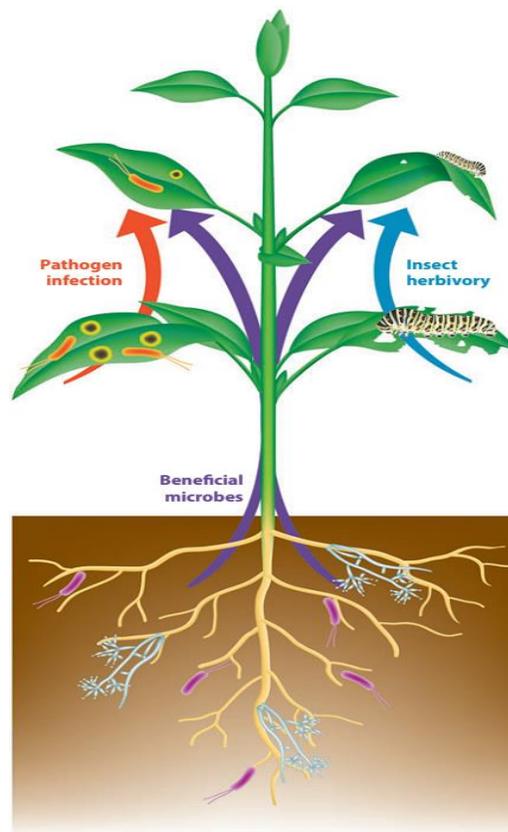


Figura 2. Resistencia inducida provocada por microorganismos. Representación de la resistencia inducida provocada por microorganismos patógenos (flecha roja), por insectos (flecha azul), y la colonización de las raíces por microorganismos benéficos (flechas moradas). La resistencia inducida implica señales que actúan a larga distancia y que pueden ser transportadas a través de la vasculatura de la planta o transportadas de manera volátil, por lo cual se da una

defensa de amplio espectro en las secciones de la planta que todavía no han sido atacadas o infectadas. Tomado y Modificado de Pieterse *et al.* 2014

Los microorganismos al interactuar con las plantas inducen una respuesta inmune innata la cual puede ser activada por dos vías: la primera se inicia con la percepción mediada por receptores (PRRs) de compuestos microbianos que son a menudo conservados entre diferentes clases de microorganismos, tanto benéficos como patógenos, llamados 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 la pared celular o cuticular, estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociadas a peligro (DAMPs) (Lotze *et al.* 2007). Los PAMPs, MAMPs o DAMPs son reconocidos por PRRs, este reconocimiento de patrones moleculares culmina en la respuesta denominada inmunidad activada por PAMPs (PTI) (Fig. 3). La segunda vía involucra a la resistencia dada por los receptores intracelulares NB-LRR (nucleotide-binding–leucine rich repeat), las cuales reconocen efectores de microorganismos. Este tipo de resistencia se refiere a la llamada gen por gen, ya que se requiere la presencia de un gen de avirulencia (*avr*) del patógeno y uno de resistencia (R) de la planta huésped. Esta respuesta es conocida como inmunidad mediada por efectores (ETI) (Wolpert *et al.* 2012; Pieterse *et al.* 2014). Debido a que los efectores son particularmente variables y prescindibles en contraste con PAMPs y MAMPs se considera que este vía de respuesta ha llevado a una coevolución dinámica entre la planta y el microorganismo (Druzhinina *et al.* 2011; Gururani *et al.* 2012; Zamioudis & Pieterse 2012).

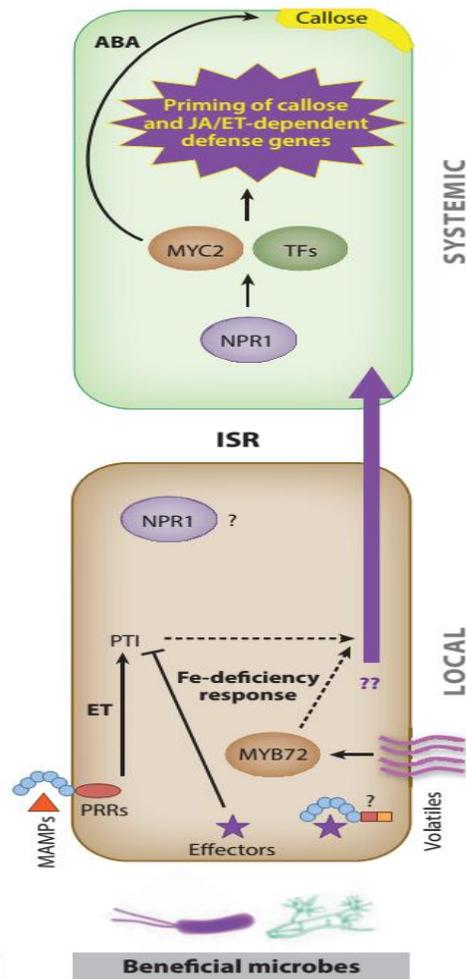


Figura 3 Representación esquemática de los componentes moleculares y mecanismos implicados en la resistencia sistémica adquirida inducida por microorganismos benéficos. Las líneas solidas negras indican interacciones ya establecidas; las líneas negras discontinuas indican interacciones hipotéticas. Flecha morada indica la translocación de las señales moleculares. Abreviaturas: ABA, ácido abscísico; ET, etileno; ISR, resistencia sistémica inducida; JA, ácido jasmónico; MAMP, patrones moleculares asociados a microorganismos; PRR, receptor de reconocimiento de patrones; PTI, inmunidad activada por PAMPs; TFs, factores de transcripción. Tomado y Modificado de Pieterse *et al.* 2014

2.3 Trichoderma spp.

Trichoderma spp. es un género fúngico oportunista de vida libre y adaptable a diversas condiciones ecológicas. Frecuentemente es encontrado en el suelo, aunque también tiene la capacidad de crecer en otros sustratos como es la madera, corteza, tejidos humanos y el mar (Druzhinina *et al.* 2011; Lorito *et al.* 2010; Mukherjee *et al.* 2013). En general se ha reportado que este hongo protege a las plantas por su capacidad de contrarrestar a otros hongos y ciertos nematodos, además de inducir la resistencia de las plantas contra patógenos y la tolerancia al estrés abiótico. Asimismo, incrementa el crecimiento y vigor de las plantas, solubiliza nutrientes para estas, y contribuye a la biorremediación de metales pesados y contaminantes ambientales (Lorito *et al.* 2010; Shorest *et al.* 2010; Hermosa *et al.* 2012).

2.3.1 Efecto de *Trichoderma* en plantas

En la agricultura el género fúngico *Trichoderma* es de gran importancia, ya que no solo desempeña un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas, sino también en la biorremediación de suelos, en contrarrestar los efectos del estrés abiótico y en la defensa contra enfermedades producidas por microorganismos patógenos (Harman *et al.* 2004; Hermosa *et al.* 2012; Mukherjee *et al.* 2013). Por lo anterior, diversas investigaciones se han centrado en el estudio de la interacción planta-*Trichoderma*.

En la agricultura el género fúngico *Trichoderma* es de gran importancia, ya que no solo desempeña un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas, sino también en la biorremediación de suelos, en contrarrestar los efectos del estrés abiótico y en la defensa contra enfermedades producidas por microorganismos patógenos (Harman *et al.* 2004; Hermosa *et*

al. 2012; Mukherjee *et al.* 2013). Por lo anterior, diversas investigaciones se han centrado en el estudio de la interacción planta-Trichoderma.

2.3.1.1 Efecto de promoción de crecimiento en plantas por *Trichoderma*

El género fúngico *Trichoderma* como ya se mencionó anteriormente, tiene la capacidad de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas en sistemas tanto *in vitro*, invernadero, hidroponía y campo (Mukherjee *et al.* 2013). Los primeros reportes sobre la inducción de la germinación de semillas, así como de la floración y el incremento en el crecimiento vegetativo como consecuencia de la inoculación de *Trichoderma* fueron descritos por Chang *et al.*, (1986) en plantas de vinca rosa, crisantemo, pepino y chile en un sistema de invernadero. Además, se ha reportado que algunas cepas del hongo *T. harzianum* como lo es: *Rifai T-22, T-22, T-203, ALL 42 y 1295-22* indujeron un incremento en la densidad y longitud de las raíces tanto principales como secundarias, así como un incremento en la ramificación de los brotes, la biomasa, la absorción de nutrientes como es el fosforo y nitrógeno en plantas de maíz, melón, chile, jitomate, pepino, garbanzo, frijol, cereza y la planta modelo *Arabidopsis* (Chang *et al.* 1986; Björkman *et al.* 1998; Yedidia *et al.* 2001; Harman *et al.* 2004; Rudresh *et al.* 2005, Martínez-Medina *et al.* 2009; Mastouri *et al.* 2010; Sofo *et al.* 2010; Azarmi *et al.* 2011; Samolski *et al.* 2012; Pereira *et al.* 2014). Algunas otras cepas de *Trichoderma* como lo son: *T. atroviride, T. atroviride, T. hamatum, T. asperelloides, T. parareesei, T. koninguie*, también han inducido un efecto en la germinación de semillas, en el crecimiento y floración de plantas como: calabacín, cereza, chile, frijol, garbanzo, lechuga, pepino, tomate, *Arabidopsis*, nopal, entre otras (Harman *et al.* 2004; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Delgado-Sánchez *et al.* 2010; Delgado-Sánchez *et al.* 2011; Rawat y Tewari 2011; Sáenz-Mata y Jiménez-Bremont 2012; Delgado-Sánchez *et al.* 2013; Studholme *et al.* 2013; Brotman *et al.* 2013; Rubio *et al.* 2014; Sáenz-Mata *et al.* 2014; Colla *et al.* 2015; Salazar-Badillo *et al.* 2015).

2.3.1.2 Inducción del sistema de defensa de la planta y tolerancia al estrés biótico por *Trichoderma*

Trichoderma no solo induce una promoción de crecimiento en las plantas, sino que también las protege del ataque de microorganismos e incluso de ciertos nematodos (Mukherjee *et al.* 2013). Lo anterior, por su capacidad de producir compuestos de tipo antibiótico, enzimas que actúan degradando la pared de otros microorganismos y/o induciendo las respuestas de defensa de las plantas mediante la producción de DAMPs, MAMPs y elicitores (Deacon 2006; Shores *et al.* 2010).

Previamente se describió que las plantas tienen la capacidad de reconocer compuestos microbianos conservados entre diferentes clases de microorganismos, PAMPs y MAMPs. Se sabe que *Trichoderma* tiene la capacidad de producir MAMPs y que estos inducen la respuesta de defensa de las plantas. Algunos de los principales MAMPs producidos por *Trichoderma* y que inducen una respuesta de defensa en las plantas son:

1.- Poligalacturonasas: Dentro de estas se encuentra a la ThPG1, enzima que degrada la pared celular de las plantas. Se ha reportado que esta enzima es producida por *T. harzianum* y que es clave para que el hongo colonice la raíz de las plantas (Hermosa *et al.* 2012). Al degradarse la pared celular de la planta por acción de la ThPG1, se producen oligogalacturónicos los cuales actúan como DAMPs reconocidos por el receptor asociado a la pared cinasa-1 (PRR receptor wall-associated kinase-1), cuya función se relaciona con una respuesta de defensa dependiente del ácido salicílico (Morán-Diez *et al.* 2009; Hermosa *et al.* 2012).

2.- Xilanasas: Estas enzimas se encargan de degradar uno de los principales polisacáridos de la pared celular de las plantas, el xilano (Loera-Corral, 2002). El primer reporte sobre MAMPs producidos por *Trichoderma* es sobre la xilanasas Eix/Xyn2, la cual es producida por *T. virens* y tiene la capacidad de inducir la

biosíntesis de etileno y una respuesta de defensa de hipersensibilidad en plantas de tabaco y jitomate (Rotblat *et al.* 2002; Ron y Avni 2004).

3.- Celulasas: Diversos estudios han demostrado que una variedad de celulasas producidas por *Trichoderma* inducen la producción de ácido jasmónico en hojas de tabaco, limón y maíz (Piel *et al.* 1997). Así mismo, las celulasas producidas por *T. longibrachiatum* en plantas de melón indujeron las respuestas de defensa dependientes tanto de ácido salicílico como de ácido jasmónico (Martínez *et al.* 2001).

4.- Peptaiboles: Son pequeños péptidos de entre 5 y 20 aminoácidos, compuestos del ácido 2-aminoisobutírico y otro aminoácido no proteico. Son considerados metabolitos secundarios con actividad antibiótica para hongos y bacterias (Hermosa *et al.* 2013). Hermosa *et al.*, (2012), reportó la alameticina, un peptaibol producido por *Trichoderma* y que induce la biosíntesis de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) en plantas de frijol, los cuales regulan genes de ambas vías de respuesta hormonales, la del ácido jasmónico y del ácido salicílico. Reportes en plantas de frijol mostraron que un peptaibol producido por *T. pseudokoningii* llamado trichodermina induce la producción de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de compuestos fenólicos, lo cual culmina con una respuesta local y sistémica en la planta (Luo *et al.* 2010). Así mismo, el 18-mer peptaibol producido por *T. virens*, ha sido relacionado con la respuesta de defensa contra al virus del mosaico del tabaco, debido a que regula genes de la vía de señalización del ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno del ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno (Viterbo *et al.* 2007).

5.- Tricocetenos: Son una familia de micotoxinas producidas por varias especies de hongos de los géneros como lo es *Trichoderma* (Hermosa *et al.* 2013). En plantas de jitomate se ha reportado que el tricoceteno llamado harzianum A producido por

Trichoderma arundinaceum, tiene actividad anti fúngica contra *Bacillus cinérea* y *Rhizoctonia solani* (Malmierca *et al.* 2012; Malmierca *et al.* 2013).

Otros MAMPs producidos por *Trichoderma* y que inducen las respuestas de defensa de las plantas son: cerato-plataninas, swolleninas y proteínas de avirulencia (Hermosa *et al.* 2012; 2013).

2.3.1.3 *Trichoderma* induce tolerancia al estrés abiótico en plantas

Desde hace algunos años tanto la agricultura como el medio ambiente se están viendo afectados por diferentes tipos de estrés abiótico como es la sequía, salinidad y temperaturas extremas (Cherry *et al.* 2000). Por lo anterior, el estrés abiótico es considerado como la principal causa de pérdida de cultivos en el mundo, reduciendo más del 50% el rendimiento promedio de los principales cultivos (Bray *et al.* 2000, Wang *et al.* 2007), lo que conlleva cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares que afectan el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas (Wang *et al.* 2001).

Se ha reportado que algunas especies fúngicas tienen la capacidad de inducir tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico en las plantas (Marasco *et al.* 2012). Dentro de estas especies fúngicas se encuentra el género *Trichoderma*, estos hongos al interactuar con diferentes tipos de plantas confieren tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico como son la sequía, salinidad, anegamiento y temperaturas extremas (Mastouri *et al.* 2010, Shukla *et al.* 2012; López-Bucio *et al.* 2015). Björkman *et al.*, (1998) reportó que plantas de maíz expuestas a estrés por frío inoculadas con la cepa *T. harzianum* Rifai 1295-22, además de ser tolerantes a este estrés incrementaron su crecimiento y por ende su biomasa. Además, observó que plantas que presentaban un bajo vigor por estar expuestas a estrés oxidativo al ser inoculadas con este *Trichoderma* el daño era revertido y se promovía un

aumento en el crecimiento (Björkman *et al.* 1998). *T. harzianum* T22 al ser inoculado en semillas de jitomate cv. Jubilee expuestas a estrés osmótico, salino y frío, indujo un incremento en la velocidad de germinación, así como en el vigor de las plántulas (Mastouri *et al.* 2010).

Las plantas al estar bajo condiciones de estrés acumulan una serie de metabolitos, particularmente aminoácidos cuyo papel es actuar como osmolitos compatibles, regulando el transporte de iones, modulando la apertura de los estomas, así como la actividad de ciertas enzimas y la expresión génica de ciertos genes (Rai, 2002; Hayat *et al.* 2012). Bae *et al.*, (2009) observó que en plantas de cacao expuestas a estrés por sequía se incrementaba la cantidad de ciertos aminoácidos como la prolina, histidina, arginina, leucina, valina y ácido c-aminobutírico. Interesantemente, al inocular las plantas de cacao en estrés con la cepa de *Trichoderma hamatum* DIS 219b, se disminuían los niveles de esos aminoácidos con lo cual se vio amortiguado el estrés (Bae *et al.* 2009).

Además se ha reportado que plantas en interacción con el hongo *Trichoderma* presentan un incremento en fitohormonas como auxinas, giberelinas, etileno, antioxidantes, fitoalexinas, compuestos fenólicos, entre otros, los cuales contribuyen a la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico (Lewis *et al.* 2011).

2.3.1.4 Cambios génicos a nivel global en plantas inoculadas con *Trichoderma*

Las plantas a lo largo de su vida establecen múltiples interacciones con diferentes factores ambientales así como con microorganismos, con lo cual su entorno se ve alterado de tal manera que se induce una reprogramación génica en la planta, resultando así en cambios en la respuesta hacia el ambiente y otros organismos (Singh *et al.* 2004; Schenk *et al.* 2012). |

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), son herramientas de gran alcance y con las cuales el análisis de los genomas se ha convertido en algo posible, además de que pueden ser ampliamente utilizadas (Martin *et al.* 2013). Estas tecnologías están siendo utilizadas para dilucidar la complejidad de las interacciones entre las plantas y los microorganismos, con esto se pretende comprender como se modulan los genes tanto de la planta como del microorganismo y a futuro crear nuevas estrategias para que la planta mejore su productividad (Schenk *et al.* 2011).

Se sabe que durante la interacción de plantas con el hongo *Trichoderma*, el hongo induce cambios masivos en el transcriptoma y proteóma de las plantas, con lo cual se producen cambios en la respuesta no solo hacia *Trichoderma* sino también hacia otros organismos (Morán-Diez *et al.* 2012; Alfano *et al.* 2007; Segarra *et al.* 2007; Shores y Harman 2008; Brotman *et al.* 2010; Bae *et al.* 2011). Alfano *et al.*, (2007) reportó que la cepa de *T. hamatum* 382 induce la expresión de 45 genes relacionados al estrés biótico y abiótico, así como de genes involucrados en la maquinaria de traducción de proteínas durante su interacción con plantas de jitomate. Morán-Diez *et al.*, (2012) en la interacción de *Arabidopsis* con la cepa *T. harzianum* T34, observó que genes involucrados en las vías de señalización dependientes de ácido jasmónico y ácido salicílico disminuyeron su expresión, mientras que genes relacionados en la respuesta al estrés abiótico, como es el ácido abscísico, incrementaron su expresión. Otro estudio masivo relacionado con la expresión de genes de *Arabidopsis* en interacción con *Trichoderma* fue llevado a cabo por Brotman *et al.*, (2013), donde inoculo raíces de *Arabidopsis* con *T. asperelloides* T203, y observó que 278 genes mostraron cambios significativos de expresión durante la interacción. Estos genes fueron relacionados a la respuesta de la planta hacia el estrés biótico y abiótico, a la biosíntesis y señalización de hormonas, así como a la biosíntesis de ácido jasmónico. Sáenz-Mata (2012) llevó a cabo estudios globales de la expresión génica mediante el análisis de

microarreglos de la interacción de *Arabidopsis* con el hongo *T. atroviride* con tres tiempos de interacción, 24, 48 y 72 horas post inoculación (hpi). Observó que en el mayor tiempo de interacción a las 72 hpi, el número de genes inducidos fue de 906 en comparación a los tiempos menores que los genes inducidos fueron 196 a las 24 hpi y 101 a las 48 hpi, con 196 genes inducidos a las 24 hpi y 101 genes inducidos a las 48 hpi. Además identificó 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 codifican para proteínas de función desconocida (Sáenz-Mata, 2012).

Segarra *et al.*, (2007) realizó un estudio de proteómica en la interacción de pepino con *Trichoderma*, donde observó que 28 proteínas eran diferencialmente expresadas. Estas proteínas estaban involucradas en la biosíntesis de isoprenoides y del etileno, en la fotosíntesis, fotorespiración, metabolismo de carbohidratos así como en las reacciones llevadas a cabo por las especies reactivas de oxígeno. En otro estudio de proteómica de hojas y semillas de maíz en interacción con *Trichoderma* vieron que las proteínas que se acumulaban estaban involucradas en el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, así como proteínas involucradas en la respuesta de defensa de las plantas (Shoresh *et al.* 2010).

2.3.2 Establecimiento de la interacción Planta-*Trichoderma*

Al igual que otros microorganismos benéficos, reportes indican que *Trichoderma* induce el sistema de resistencia sistémica de la planta, un mecanismo de señalización complejo que implica dos vías hormonales. La primera es llamada resistencia sistémica inducida (ISR) y es dependiente del ácido jasmónico y etileno (JA/ET); la segunda es la resistencia sistémica adquirida (SAR) y es dependiente del ácido salicílico (SA). Se ha considerado que la activación de la ISR y/o SAR en las plantas es dependiente del estilo de vida del microorganismo. De esta manera,

las plantas activan una respuesta sistémica adquirida (SAR) principalmente por microorganismos patógenos de plantas, mientras que otros microorganismos no patógenos de plantas, activa una resistencia sistémica inducida (ISR) (Pieterse *et al.* 2009; Verhage *et al.* 2010). Estudios recientes han mostrado que *Trichoderma* induce una respuesta entrecruzada de ambas vías de defensa hormonales (Segarra *et al.* 2007; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Salas-Marina *et al.* 2011; Saenz-Mata *et al.* 2014). El entrecruzamiento de ambas vías hormonales ha surgido como un importante mecanismo de regulación de la inmunidad de plantas.

2.4 Interacción *Arabidopsis* – *Trichoderma* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es una planta de la familia de las *Brassicaceae*, la cual desde algunos años ha surgido como un modelo de estudio para la investigación en el área de la biología de plantas. *Arabidopsis* cuenta con diversas características que le han permitido convertirse en un modelo de estudio: ciclo de vida corto (seis semanas), tamaño pequeño (15-20 cm), sus flores se autopolinizan naturalmente produciendo una prolífica cantidad de semillas (aproximadamente 5000 semillas por planta), a nivel genético cuenta con un genoma pequeño con 125 Mb organizado en cinco cromosomas que contienen un aproximado de 29,454 genes predichos. Además, a lo largo de los años han sido desarrolladas técnicas y bases de datos donde se concentra información del genoma, genes y proteínas (TAIR) (Meinke 1998; Koornneef & Meinke 2010; Alonso 2003), con lo cual se facilita la disección molecular que involucra su ciclo de vida, así como los factores que afectan a este. La interacción entre *Arabidopsis* y el hongo *Trichoderma* ha surgido como un modelo de estudio que facilita el entendimiento de las interacciones benéficas llevadas a cabo entre las plantas y los microorganismos. Recientes estudios que han tomado a esta interacción como modelo de estudio han ayudado a incrementar 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, así como la elucidación de los mecanismos involucrados durante el establecimiento de este con las plantas (Contreras-Cornejo *et al.* 2011; 2009; Brotman *et al.* 2013; Contreras-Cornejo *et al.* 2014 a, b; Harman *et al.* 2004; Hermosa *et al.* 2012; Saenz-Mata *et al.* 2014; Salazar-Badillo *et al.* 2015).

III. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar en plantas de *Arabidopsis thaliana* el efecto de promoción de crecimiento, los niveles de poliaminas, y la expresión de genes de biosíntesis de poliaminas y de la vía de auxinas durante la interacción con *Trichoderma* en un sistema en contacto directo y a distancia.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Analizar parámetros de crecimiento vegetal tales como peso fresco, longitud de raíz principal y número de raíces secundarias de *Arabidopsis thaliana* en la interacción en contacto directo y a distancia con dos cepas del hongo *Trichoderma*, *T. virens* y *T. atroviride*.

2.2.2 Determinar los niveles de poliaminas y la expresión de los genes *ADC1* y *ADC2* en plantas de *Arabidopsis thaliana* en la interacción en contacto directo y a distancia con las cepas de *Trichoderma virens* y *T. atroviride*.

2.2.3 Analizar la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* asociados a la vía de auxinas en interacción con los hongos *Trichoderma virens* y *T. atroviride*, en un sistema de interacción en contacto directo y a distancia.

IV. RESULTADOS

Capítulo 1

Variación de los niveles de poliaminas de *Arabidopsis thaliana* durante la interacción con diferentes cepas de *Trichoderma*

Introducción al capítulo 1

Arabidopsis thaliana representa un sistema funcional para estudiar interacciones benéficas entre plantas y microorganismos. *Trichoderma* es un hongo benéfico de plantas que mejora el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además de contribuir a la nutrición de éstas, el hongo puede inducir una respuesta de defensa hacia otros microorganismos patógenos. Aunque previamente se han relacionado los efectos benéficos en las plantas con ciertas moléculas biológicamente activas que son producidas y/o moduladas por el hongo, tales como: peptaiboles (Limón y Codón, 2004; Wiest et al. 2002; Szekeres et al. 2005; Viterbo et al. 2007), sideróforos (Limón y Codón, 2004; Vinale et al. 2013, Zeilinger y Schuhmacher, 2013), terpenos (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Crutcher et al. 2013; Zeilinger y Schuhmacher, 2013), oxilipinas (Brotman et al, 2013; Zeilinger y Schuhmacher, 2013), policétidos (Sperry et al. 1998; Mukherjee et al, 2012a; Zeilinger y Schuhmacher, 2013), antibióticos (Dennis y Webster, 1971; Ghisalberti y Sivasithamparam, 1991; Marik et al. 2013), metabolitos secundarios (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998; Reino et al. 2008; Mukherjee et al. 2012; Hung et al., 2013; Zeilinger y Schuhmacher, 2013; Vinale et al. 2014) y compuestos de tipo auxínico (Contreras-Cornejo et al. 2009), etc, aún es necesario continuar dilucidando tanto los mecanismos como las moléculas involucradas en el reconocimiento, desarrollo y establecimiento de la interacción planta – *Trichoderma*.

Las poliaminas son pequeñas moléculas implicadas en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como en el establecimiento de las interacciones planta - microorganismo. Reportes indican que el metabolismo de las poliaminas de las plantas sufre cambios notables durante las interacciones planta – microorganismos (Jiménez-Bremont *et al.* 2014).

Con el fin de dilucidar si el metabolismo de las poliaminas desempeña un papel durante la interacción *Arabidopsis* - *Trichoderma*, se compararon dos tipos de interacción: uno que implican el contacto directo entre la planta y el hongo, y la otra usando un sistema de crecimiento de división, lo que evita la interacción física entre la planta y el hongo. Para este propósito, dos especies de *Trichoderma* se utilizaron: *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. Se analizó la producción de biomasa, la arquitectura de raíz, y los niveles de poliaminas a los 3 y 5 días después de la inoculación (dpi).

Después de 3 días de interacción, se observó una disminución significativa en los niveles de las poliaminas de *Arabidopsis* en ambos sistemas (contacto directo y de división). Sin embargo, a los 5 dpi se observó un comportamiento diferente en el perfil de las poliaminas, lo cual fue dependiente del tipo de interacción (contacto y distancia) así como de la cepa fúngica (*T. atroviride* y *T. virens*). En el caso de la interacción con *T. atroviride* la putrescina (Put) fue la que mostró mayores incrementos, 200% en la interacción a distancia y 50% en la interacción en contacto. Por el otro lado, durante la interacción con *T. virens* la poliamina que mostró los mayores incrementos fue la espermidina (Spd) 75%, mientras que Put solo incremento un 35% en la interacción en contacto. Las diferencias observadas en los niveles de las poliaminas con ambas especies de *Trichoderma* pueden atribuirse a la batería de genes utilizada por cada hongo para establecer la interacción con la planta.

La arginina descarboxilasa (ADC) es una enzima limitante que cataliza el primer paso de biosíntesis de las poliaminas. Por lo anterior, el nivel transcripcional de los genes *ADC* de *Arabidopsis* (*ADC1* y *ADC2*) pudieran explicar las fluctuaciones observadas en los niveles de las poliaminas de las plantas que interaccionaron con el hongo. En general a los 3 dpi, se observó que ambos genes (*ADC1* y *ADC2*) reprimieron su expresión. Sin embargo, a los 5 dpi se observó lo contrario, un incremento en los niveles de estos genes. Interesantemente, se observó una expresión diferencial de estos genes en las plantas que interaccionan en contacto directo con el hongo *T. atroviride* tanto a los 3 como a los 5dpi. El gen *ADC1* fue reprimido mientras que el gen *ADC2* fue altamente inducido, con lo cual se puede sugerir que en la interacción en contacto entre plantas de *Arabidopsis* con el hongo *T. atroviride* el gen *ADC2* tiene un papel clave.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian un perfil diferencial de los niveles de poliaminas en los diferentes tiempos y tipos de interacción, así como con diferentes especies de microorganismos. Con lo anterior no solo se evidencia la comunicación que existe entre las plantas y los microorganismos benéficos, sino también que las poliaminas pudieran participar en la intrincada señalización y reprogramación génica llevada a cabo por las plantas como respuesta a la interacción con el hongo benéfico *Trichoderma* spp.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Research article

Arabidopsis thaliana polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species



Fatima Berenice Salazar-Badillo^a, Diana Sánchez-Rangel^b, Alicia Becerra-Flora^a, Miguel López-Gómez^c, Fernanda Nieto-Jacobo^d, Artemio Mendoza-Mendoza^d, Juan Francisco Jiménez-Bremont^{a,*}

^a División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, C.P. 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

^b Investigador Cátedras CONACyT en el Instituto de Ecología A.C. (INECOL) Red de Estudios Moleculares Avanzados (REMAV) Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, 91070, Xalapa, Ver., Mexico

^c Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071, Granada, Spain

^d Bio-Protection Research Centre, Lincoln University, PO Box 85084, Canterbury, 7647, New Zealand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2015

Received in revised form

24 June 2015

Accepted 1 July 2015

Available online 6 July 2015

Keywords:

Arabidopsis thaliana
Plant growth promotion
Polyamines
Split growth system
Trichoderma atroviride
Trichoderma virens

ABSTRACT

Plants are associated with a wide range of microorganisms throughout their life cycle, and some interactions result on plant benefits. *Trichoderma* species are plant beneficial fungi that enhance plant growth and development, contribute to plant nutrition and induce defense responses. Nevertheless, the molecules involved in these beneficial effects still need to be identify. Polyamines are ubiquitous molecules implicated in plant growth and development, and in the establishment of plant microbe interactions. In this study, we assessed the polyamine profile in *Arabidopsis* plants during the interaction with *Trichoderma virens* and *Trichoderma atroviride*, using a system that allows direct plant-fungal contact or avoids their physical interaction (split system). The plantlets that grew in the split system exhibited higher biomass than the ones in direct contact with *Trichoderma* species. After 3 days of interaction, a significant decrease in *Arabidopsis* polyamine levels was observed in both systems (direct contact and split). After 5 days of interaction polyamine levels were increased. The highest levels were observed with *T. atroviride* (split system), and with *T. virens* (direct contact). The expression levels of *Arabidopsis ADC1* and *ADC2* genes during the interaction with the fungi were also assessed. We observed a time dependent regulation of *ADC1* and *ADC2* genes, which correlates with polyamine levels. Our data show an evident change in polyamine profile during *Arabidopsis* – *Trichoderma* interaction, accompanied by evident alterations in plant root architecture. Polyamines could be involved in the changes undergone by plant during the interaction with this beneficial fungus.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Este artículo puede ser consultado en la siguiente liga:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942815300498>

Capítulo 2

Análisis de la expresión de genes de *Arabidopsis thaliana* asociados a la vía de auxinas en interacción con *Trichoderma* en un sistema de contacto directo y a distancia

El establecimiento de interacciones entre plantas y microorganismos involucra varios mecanismos a nivel fisiológico y molecular de ambos organismos. Se sabe que en las interacciones benéficas el crecimiento y desarrollo de las plantas es afectado, específicamente grandes cambios en el desarrollo de las raíces tanto principal como secundarias han sido reportados (Berg *et al.* 2009; Whipps 2001; Compant *et al.* 2005).

Las auxinas son hormonas vegetales pequeñas producidas en muy bajas concentraciones, las cuales juegan un papel clave en el desarrollo de las plantas (Prasad y Dhonukshe, 2013). Los diversos procesos de desarrollo controlados por las auxinas, son el alargamiento del tallo, la dominancia apical, la iniciación del crecimiento de las raíces, el desarrollo del fruto y el tropismo (Davies 1995; Lau *et al.* 2008; Sukumar *et al.* 2013).

Las hormonas vegetales controlan la mayoría de los aspectos del ciclo de vida de las plantas mediante la regulación de la expresión del genoma. Es importante señalar que los genes regulados por hormonas están involucrados en regular su propia homeostasis y distribución (Chapman and Estelle, 2009; Prasad y Dhonukshe, 2013). Dentro de los genes de respuesta a auxinas se incluyen factores de transcripción requeridos para ciertos procesos específicos de desarrollo, así

como genes involucrados en otras vías de señalización hormonal (Chapman and Estelle, 2009; Pieterse et al., 2014).

La biosíntesis de las auxinas se da en el ápice del follaje, hojas jóvenes y meristemos de la raíz (Ljung, et al., 2001, 2005). A partir de estos sitios de síntesis, las auxinas se distribuyen a otros tejidos (Ljung, et al., 2005). Las auxinas recién sintetizadas pueden ser transportadas mediante dos vías, la primera es a través del floema, llamado transporte pasivo o no polar y el segundo es un transporte de célula a célula conocido como transporte activo o polar (Michniewicz, et al. 2007). Una vez que han sido transportadas los transportadores AUX1 (auxin-responsive) son los encargados de internalizar las moléculas de ácido indol acético protonado del apoplasto al interior de la célula (Vieten et al. 2007). Por otro lado, en condiciones bajas de auxinas la proteína AUX1 se encuentra unida a los factores de respuesta a auxinas (ARFs), lo cual regula negativamente a los genes de respuesta a auxinas. Cuando entran moléculas de auxinas a la célula estas se unen a AUX1 formando así un complejo (Aux/IAA) que es percibido por la familia de receptores TIR y ABF, los cuales generan una poliubiquitinación que convierte al complejo en un blanco de degradación vía proteosoma 26, con lo cual se evita la unión del complejo con los ARFs, liberándolos hacia el núcleo dándose así la activación de los genes de respuesta a auxinas (Fig.4) (Chapman y Estelle 2009).

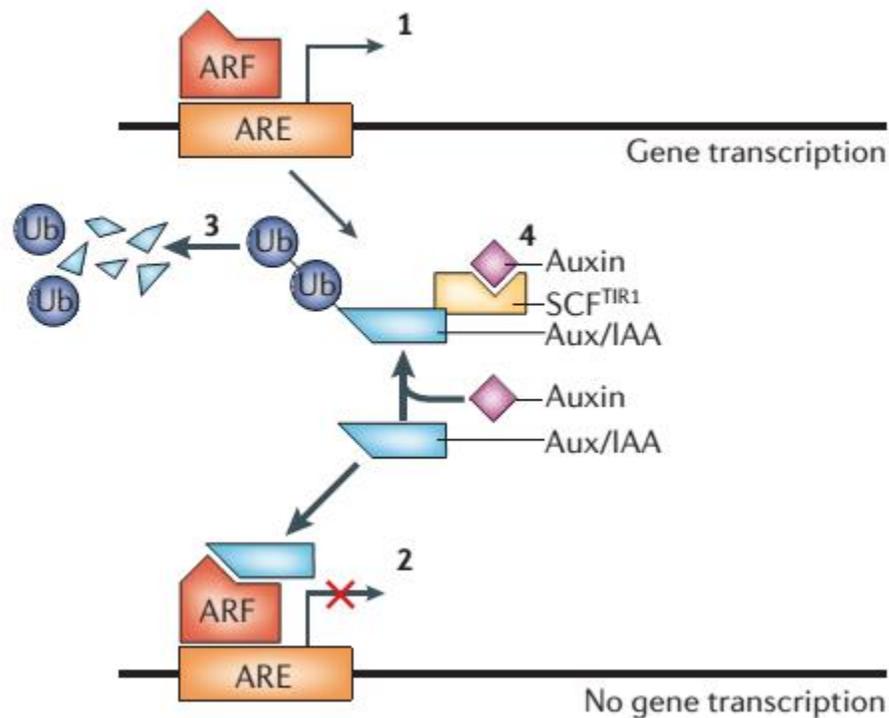


Figura 4 Regulación transcripcional mediada por auxinas. La regulación de los genes de respuesta a auxinas se da en cuatro pasos. **1** Los factores de transcripción de tipo ARF (factores de respuesta a auxinas) se unen a los elementos de respuesta a auxinas (AREs) en la región del promotor de los genes de respuesta a auxinas, con lo cual se induce la transcripción de los genes. **2** Las proteínas de respuesta temprana a auxinas, Aux/IAAs, se unen a los ARF inhibiendo así la transcripción de estos genes. **3** Las proteínas Aux/IAAs son blanco del sistema de degradación mediado por el proteosoma 26S. Esta degradación se da a través de la ubiquitinación (Ub) de las proteínas Aux/IAAs, esta reacción es catalizada por la ubiquitin ligasa SCF E3. **4** La proteólisis mediada por ubiquitinas del Aux/IAAs es estimulada por la unión de auxinas a la caja F de la proteína TIR1, el cual es un componente de la ligasa SCF E3 la cual reconoce específicamente a las proteínas a ser degradadas. Tomado de Teale *et al.* 2006

Reportes han demostrado que una variedad de microorganismos durante las interacciones con las plantas pueden producir auxinas y precursores de auxinas

(Slankis 1973; Spaepen & Vanderleyden 2010; Sukumar *et al.*, 2013). Dentro de estos microorganismos está el hongo *Trichoderma*, el cual es un hongo filamentoso de vida libre, el cual ayuda a incrementar la disponibilidad de nutrientes (Kleifeld y Chet, 1992), induce modificaciones en la morfología de la raíz principal esto al inducir un incremento en la síntesis de raíces secundarias como consecuencia de la liberación de hormonas o metabolitos con actividad señalizadora (Limón *et al.* 2004; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Gravel *et al.* 2007; Roco y Pérez 2001; Windham *et al.* 1986; Contreras-Cornejo *et al.* 2014 b; Samolski *et al.* 2012) y además ejerce un efecto de biocontrol incluyendo la protección contra enfermedades, esto al inducir al sistema de defensa de la planta (Berendsen *et al.* 2012; Ortiz-Castro *et al.* 2009). Estudios recientes demostraron que dos cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. virens*) inducen el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* durante una interacción en contacto directo y a distancia, mostrando incrementos significativos en la biomasa y en el crecimiento de las raíces tanto principal como secundarias (Contreras-Cornejo *et al.* 2014; Hung *et al.* 2013; Salazar-Badillo *et al.* 2015).

4.1 El crecimiento de *Trichoderma* en diferentes sustratos afecta la promoción de crecimiento inducido en plantas de *Arabidopsis*

Con el objetivo de determinar si la promoción de crecimiento inducido por *Trichoderma* en plantas es dependiente del contacto físico entre ambos organismos así como de las condiciones del crecimiento del hongo, hemos analizado tres condiciones experimentales: 1) interacción donde ambos organismos tienen contacto físico directo, 2) interacción sin contacto físico entre ambos organismos donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS) y, 3) interacción sin contacto físico entre ambos organismos donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). Las

interacciones fueron llevadas a cabo en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 de 13 días de edad, las cuales fueron crecidas con cada una de las cepas de *Trichoderma*, *T. atroviride* (IMI206040; Ta) y *T. virens* (GV 28.9; Tv), durante 3 y 5 días post inoculación (dpi).

Se analizó la biomasa y tres parámetros de la arquitectura de la raíz: longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de las raíces laterales a los 3 y 5 dpi. A los 3 dpi se observó que las plántulas que crecieron sin contacto directo con el hongo (A/Ta; A/Tv; A/Ta PDA; A/Tv PDA), presentaron un marcado incremento en el crecimiento y el desarrollo en comparación con las plántulas control así como con las plántulas que crecieron en contacto directo con el hongo (At-Ta y At-Tv), (Fig. 5).

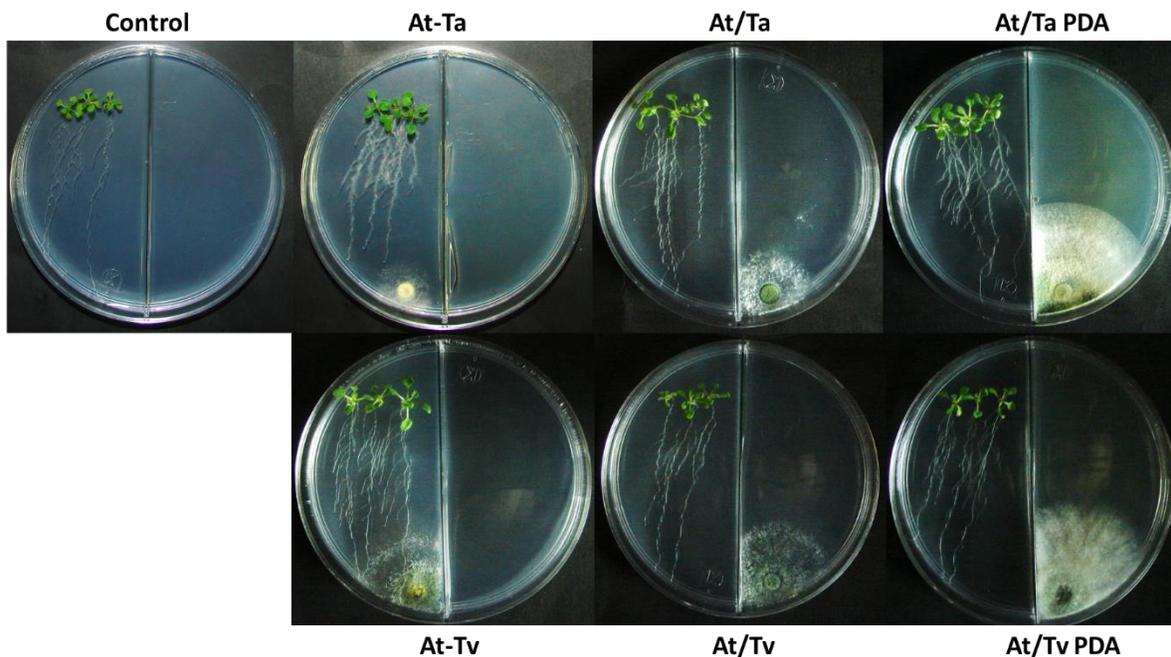


Figura 5 Fenotipo en plántulas de *Arabidopsis* durante la interacción con los hongos *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*. Imágenes representativas de plántulas de *Arabidopsis* (Col-0) de 13 días de edad en placas Petri divididas cultivadas en medio MS después de 3 días post inoculación con los hongos *T. atroviride* y *T. virens*. Las cepas de *Trichoderma* fueron co-cultivadas en un sistema

de contacto directo y dividido de las plántulas de Arabidopsis. **Control** plántulas de Arabidopsis crecidas en el medio de cultivo MS sin el hongo. **At-Ta y At-Tv** plántulas de Arabidopsis inoculadas en contacto directo con los hongos *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente. **At/Ta y At/Tv** plántulas de Arabidopsis inoculadas con *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente, en un sistema dividido (sin contacto físico), donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS). **At/Ta PDA y At/Tv PDA** plántulas de Arabidopsis inoculadas en un sistema dividido (sin contacto físico), donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). El experimento se realizó con 9 repeticiones, con 3 plántulas por placa.

Diferencias interesantes fueron observadas en la magnitud de peso fresco inducido por cada especie de Trichoderma, donde además el sustrato de crecimiento del hongo jugó un papel importante. Las plantas con mayor peso fresco fueron aquellas que interaccionaron con el hongo *T. virens*, interesantemente el mayor incremento se observó en las plantas que crecen en el sistema de división cuando *T. virens* crece en medio PDA (At/ Tv PDA). En el caso de *T. atroviride* el incremento en el peso fresco fue similar en ambas condiciones de interacción, directo y separado, incrementando aproximadamente un 22% con respecto a las plantas control. (Fig 6A). En este tiempo de interacción también se observó un decremento en la longitud de la raíz principal de las plántulas que crecen en contacto directo con ambas cepas de Trichoderma. Interesantemente esta inhibición no fue observada en las plántulas que crecen en el sistema dividido, sin contacto, de hecho se observó un pequeño incremento de alrededor del 3% en la longitud de la raíz principal (Fig. 6B) cuando el hongo crece en el medio de cultivo PDA. Otro dato importante se observó en el análisis de las raíces laterales por planta, donde un incremento en el número de las raíces laterales fue observado en ambas condiciones de interacción a distancia (Fig. 6C, 6D).

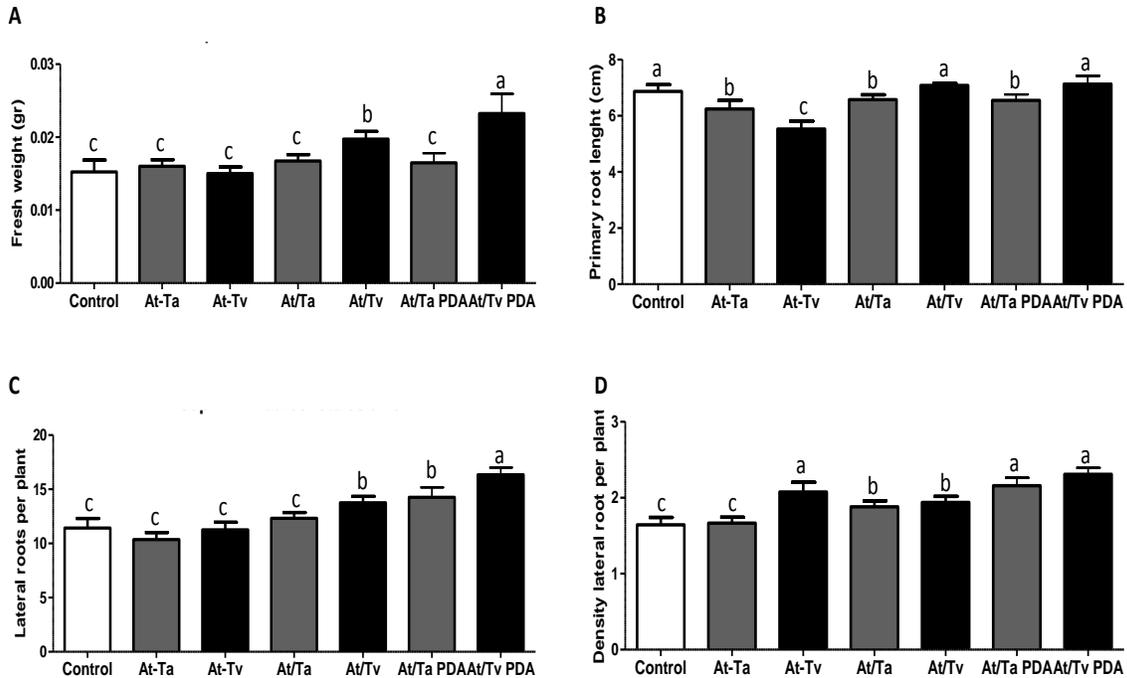


Figura 6 Efecto de la inoculación de dos especies de *Trichoderma* en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas de 13 días de edad de *Arabidopsis* (Col-0) crecidas en el sistema de contacto físico directo y dividido inoculadas con ambas cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. virens*) de la Fig. 2 fueron colectadas y se les analizó los siguientes parámetros: A. Peso Fresco, B. Longitud de la raíz principal, C. Número de raíces laterales, D. Densidad de las raíces laterales. **Control** plántulas de *Arabidopsis* crecidas en el medio de cultivo MS sin el hongo. **At-Ta y At-Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en contacto directo con los hongos *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente. **At/Ta y At/Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente, en un sistema dividido (sin contacto físico), donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS). **At/Ta PDA y At/Tv PDA** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en un sistema dividido (sin contacto físico), donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). La longitud de la raíz primaria (cm), el número de raíces laterales y la densidad de estas fueron determinados a partir de 27 plántulas. El peso fresco (mg) de las plántulas se obtuvo en una balanza analítica y los valores obtenidos representan la media de nueve grupos de tres plántulas de cada condición de interacción. Las

letras indican diferencias significativas entre cada condición ($P < 0.05$), estas diferencias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey en el programa Graph-Pad versión del software 5.0.

Para caracterizar si los cambios fisiológicos observados en las plántulas de *Arabidopsis* son persistentes a tiempos posteriores, se analizaron los mismos parámetros a las 5 dpi. El fenotipo registrado a 5 dpi mostró que la promoción del crecimiento se mantuvo para ambas cepas en las tres condiciones de interacción (Fig.7).

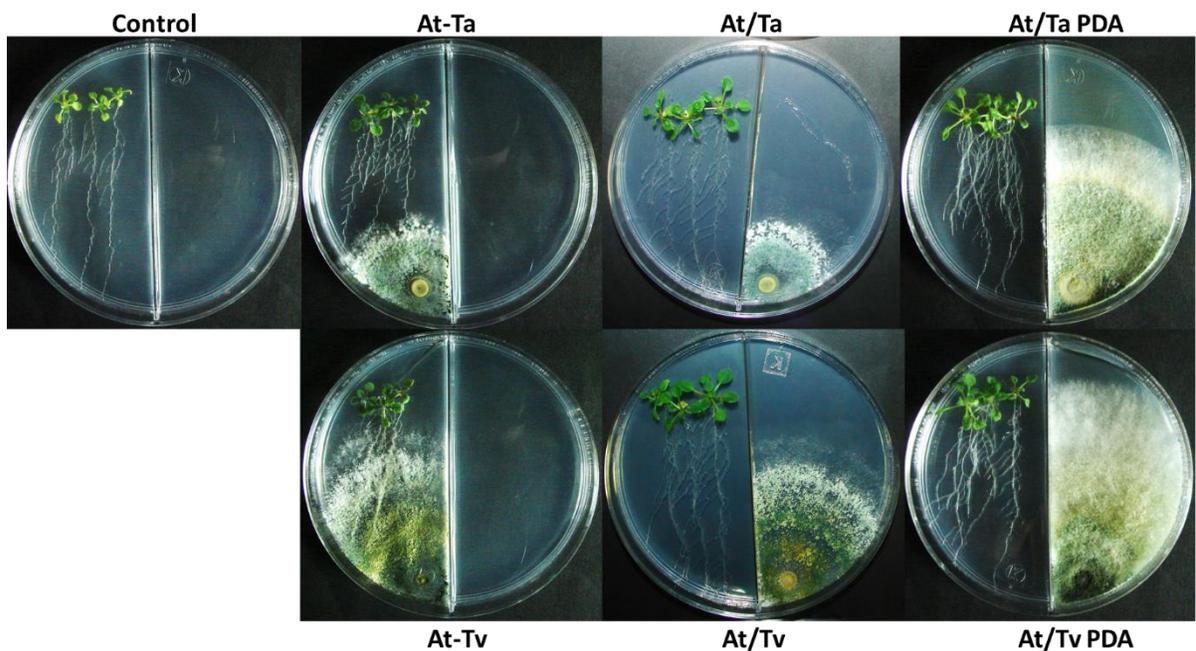


Figura 7 Fenotipo en plántulas de *Arabidopsis* durante la interacción con los hongos *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma virens*. Fotografías representativas de plántulas de *Arabidopsis* (Col-0) de 13 días de edad en placas Petri divididas cultivadas en medio MS después de 5 días post inoculación con los hongos *T. atroviride* y *T. virens*. Las cepas de *Trichoderma* fueron co-cultivadas en un sistema de contacto directo y dividido de las plántulas de *Arabidopsis*. **Control** plántulas de *Arabidopsis* crecidas en el medio de cultivo MS sin el hongo. **At-Ta y At-Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en contacto directo con los hongos *T.*

atroviride y *T. virens*, respectivamente. **At/Ta y At/Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente, en un sistema dividido (sin contacto físico), donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS). **At/Ta PDA y At/Tv PDA** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en un sistema dividido (sin contacto físico), donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). El experimento se realizó con 9 repeticiones, con 3 plántulas por placa.

Cabe resaltar que aun cuando se observó un incremento en el peso fresco de las plántulas en la interacción del sistema dividido con ambas cepas de hongo, fue notable que cuando *T. virens* crece en medio PDA las plantas incrementan su peso fresco alrededor de un 200% en comparación con las plantas control (Fig. 8A).

Resultados similares fueron observados en la longitud de la raíz primaria, siendo *T. atroviride* el hongo que indujo un mayor incremento en la interacción a distancia cuando crece en el medio de cultivo MS y *T. virens* cuando crece en PDA (Fig. 8B). En el caso de las raíces laterales se observó un incremento de alrededor de un 30 y 46% en la interacción a distancia con ambos hongos (Fig. 8C).

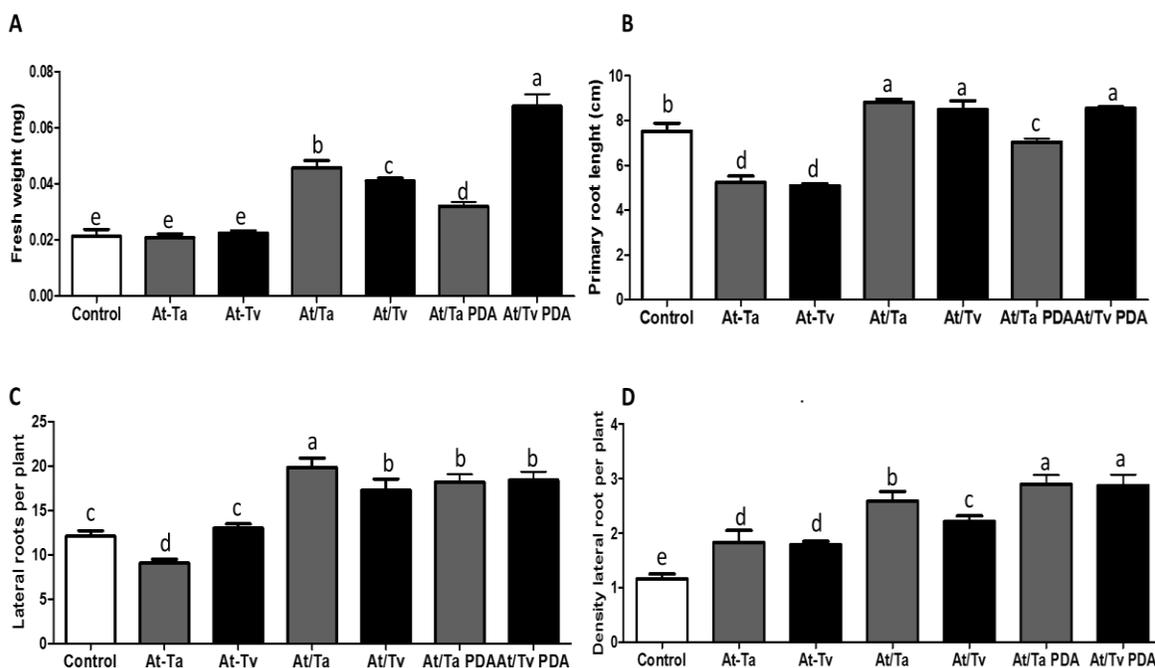


Figura 8 Efecto de la inoculación de dos especies de *Trichoderma* en el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas de 13 días de edad de *Arabidopsis* (Col-0) crecidas en el sistema de contacto físico directo y dividido inoculadas con ambas cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. virens*) de la Fig. 4 fueron colectadas y se les analizó los siguientes parámetros: A. Peso Fresco, B. Longitud de la raíz principal, C. Número de raíces laterales, D. Densidad de las raíces laterales. **Control** plántulas de *Arabidopsis* crecidas en el medio de cultivo MS sin el hongo. **At-Ta y At-Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en contacto directo con los hongos *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente. **At/Ta y At/Tv** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con *T. atroviride* y *T. virens*, respectivamente, en un sistema dividido (sin contacto físico), donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo Murashige Skoog (MS). **At/Ta PDA y At/Tv PDA** plántulas de *Arabidopsis* inoculadas en un sistema dividido (sin contacto físico), donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). La longitud de la raíz primaria (cm), el número de raíces laterales y la densidad de estas fueron determinados a partir de 27 plántulas. El peso fresco (mg) de las plántulas se obtuvo en una balanza analítica y los valores obtenidos representan la media de nueve grupos de tres plántulas de cada condición de interacción. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición ($P < 0.05$), estas diferencias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey en el programa Graph-Pad versión del software 5.0.

4.2 Regulación diferencial de genes de respuesta a auxinas durante la interacción *Arabidopsis* - *Trichoderma*

El fenotipo observado en las plántulas de *Arabidopsis*, específicamente en la raíz primaria y las raíces laterales puede atribuirse al control ejercido por las auxinas sobre el desarrollo de la raíz, y por la señalización molecular que se lleva a cabo durante la penetración y el establecimiento de la interacción de *Trichoderma* en las

raíces de las plantas. A nivel molecular se sabe que los factores de respuesta a auxinas (ARF), regulan la expresión de genes de respuesta a auxina, en particular se ha reportado que los genes *ARF6* y *ARF8* juegan un papel esencial en el desarrollo (Curaba et al., 2014).

Con el fin de dilucidar si *ARF6* y *ARF8* son regulados durante la interacción *Arabidopsis* - *Trichoderma*, los niveles de expresión de estos genes se analizaron mediante qRT-PCR en plantas de 13 días de edad. Para ello se analizaron las tres condiciones experimentales ya previamente descritas: 1) interacción donde ambos organismos tienen contacto físico directo, 2) interacción sin contacto físico entre ambos organismos donde el hongo y la planta crecen en el medio de cultivo murashige skoog (MS) y, 3) interacción sin contacto físico entre ambos organismos donde la planta crece en el medio de cultivo MS y el hongo en el medio Agar Dextrosa Papa (PDA). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron crecidas con cada una de las cepas de *Trichoderma*, *T. atroviride* (IMI206040; Ta) y *T. virens* (GV28.9; Tv), durante 3 y 5 días post inoculación (dpi).

A los 3 dpi se observó una inducción significativa del gen *ARF6* en las plántulas en interacción con *T. atroviride*, mostrando la mayor inducción las plántulas en la interacción a distancia cuando el hongo crece en medio PDA (Fig. 9A). Interesantemente, este gen fue reprimido en las plántulas que interactúan con el hongo *T. virens*, observándose bajos niveles de expresión en las plántulas que interaccionan en contacto directo (Fig. 9C). A los 5 dpi el gen *ARF6* mostro una inducción en dos de los tres tipos de interacción analizadas, contacto directo (At-T) e interacción a distancia cuando el hongo crece en medio PDA (At/T PDA) con ambas especies de *Trichoderma*. La mayor expresión de este gen se observó en las plántulas que interaccionaron en contacto directo con ambas especies de *Trichoderma* (Fig. 9B y 9C).

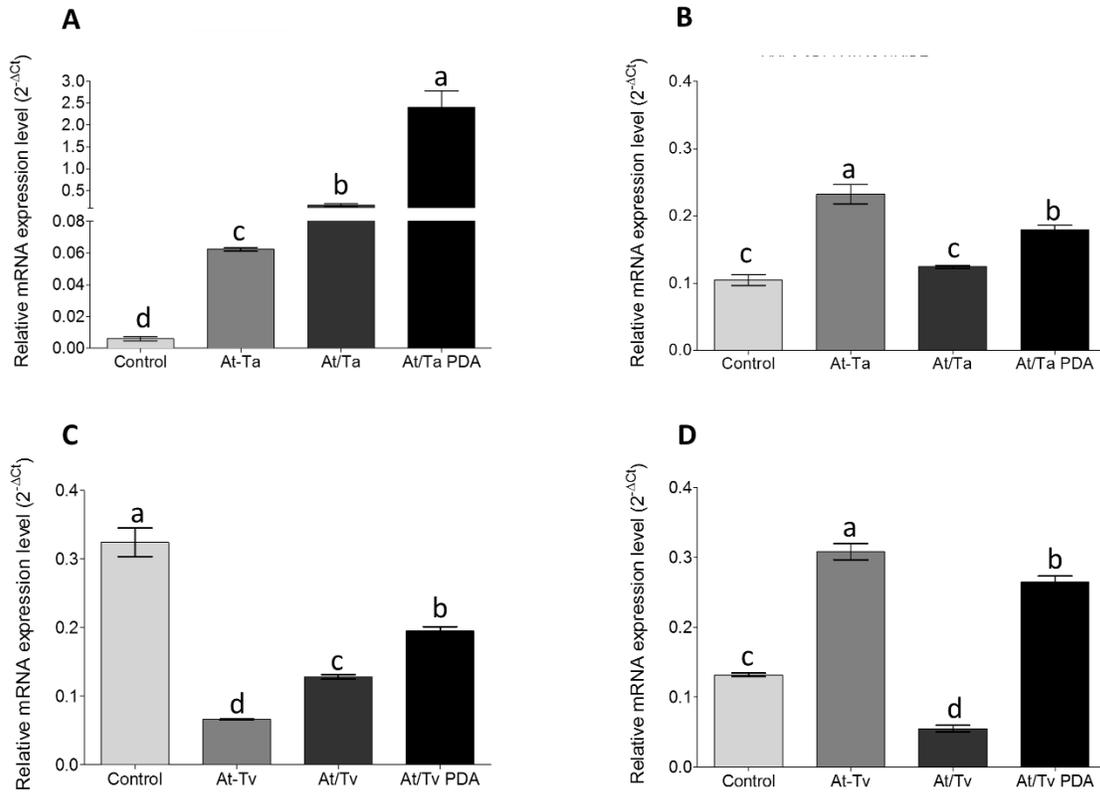


Figura 9 Expresión del gen *ARF6* de *Arabidopsis thaliana* durante la interacción con *Trichoderma* spp. Plántulas de 13 días de edad de *Arabidopsis* (Col-0) en interacción con *Trichoderma* spp., a los 3 y 5 dpi. Las cepas de *Trichoderma* fueron co-cultivadas en un sistema de contacto directo y dividido de las plántulas de *Arabidopsis*. **A, B** Niveles de expresión del gen *ARF6* de plántulas de *Arabidopsis* que crecen en contacto directo con *T. atroviride* (At-Ta), a distancia sin contacto físico con el hongo *T. atroviride* cuando este crece en medio MS (At/Ta), y a distancia sin contacto físico con el hongo *T. atroviride* cuando este crece en medio PDA (At/Ta PDA) a los 3 y 5 dpi respectivamente. **C, D** Niveles de expresión del gen *ARF6* de plántulas de *Arabidopsis* que crecen en contacto directo con *T. virens* (At-Tv), a distancia sin contacto físico con el hongo *T. virens* cuando este crece en medio MS (At/Tv), y a distancia sin contacto físico con el hongo *T. virens* cuando este crece en medio PDA (At/Tv PDA) a los 3 y 5 dpi respectivamente. Los niveles de expresión del gen *ARF6* fueron estimados por qRT-PCR. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición ($P < 0.05$), estas diferencias

fueron determinadas mediante la prueba de Tukey en el programa Graph-Pad versión del software 5.0.

Respecto al gen *ARF8*, a los 3 dpi se observó una inducción en la expresión de este gen en las plántulas que interactúan con *T. atroviride*, siendo de nuevo las plantas que interaccionan a distancia cuando el hongo crece en medio PDA las que mostraron mayor expresión. (Fig. 10A). En el caso de las plántulas en interacción con *T. virens*, solo aquellas que interactúan a distancia cuando el hongo crece en medio PDA mostraron una inducción de este gen (Fig. 10C). A los 5 dpi los resultados mostraron un perfil diferencial de expresión para el gen *ARF8*, lo cual es dependiente de la especie del hongo que interaccione con las plantas. En el caso de la interacción con *T. atroviride*, las plántulas en la interacción a distancia mostraron una represión de este gen, mientras que en las plantas en la interacción en contacto directo se observó una ligera inducción respecto a las plantas control sin inocular (Fig. 10B). En cuanto a *T. virens* una reducción en los niveles de expresión de este gen se observó en todas las condiciones de interacción analizadas (Fig. 10D).

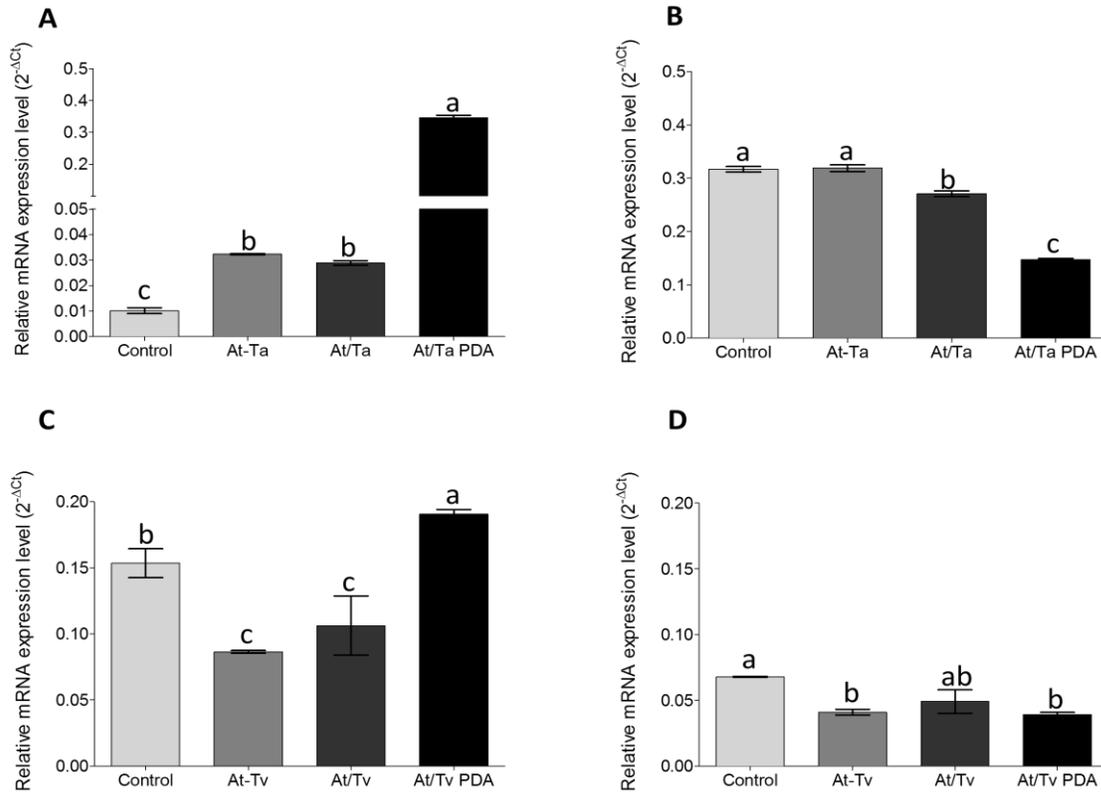


Figura 10 Expresión del gen *ARF8* de *Arabidopsis thaliana* durante la interacción con *Trichoderma* spp. Plántulas de 13 días de edad de *Arabidopsis* (Col-0) en interacción con *Trichoderma* spp., a los 3 y 5 dpi. Las cepas de *Trichoderma* fueron co-cultivadas en un sistema de contacto directo y dividido de las plántulas de *Arabidopsis*. **A, B** Niveles de expresión del gen *ARF8* de plántulas de *Arabidopsis* que crecen en contacto directo con *T. atroviride* (At-Ta), a distancia sin contacto físico con el hongo *T. atroviride* cuando este crece en medio MS (At/Ta), y a distancia sin contacto físico con el hongo *T. atroviride* cuando este crece en medio PDA (At/Ta PDA) a los 3 y 5 dpi respectivamente. **C, D** Niveles de expresión del gen *ARF8* de plántulas de *Arabidopsis* que crecen en contacto directo con *T. virens* (At-Tv), a distancia sin contacto físico con el hongo *T. virens* cuando este crece en medio MS (At/Tv), y a distancia sin contacto físico con el hongo *T. virens* cuando este crece en medio PDA (At/Tv PDA) a los 3 y 5 dpi respectivamente. Los niveles de expresión del gen *ARF8* fueron estimados por qRT-PCR. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición ($P < 0.05$), estas diferencias

fueron determinadas mediante la prueba de Tukey en el programa Graph-Pad versión del software 5.0.

4.3 METODOLOGÍA

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0 así como de las mutantes aux 1-7, jar1, eds1, etr1, ern 2-1, axr 4-1, rhd6 y tir1 fueron esterilizadas por 10 minutos con 40% (v/v) de una solución de cloro y lavadas seis veces con agua destilada estéril. Fueron puestas en cajas Petri (150 x 15 mm) conteniendo 0.2X de medio Murashige and Skoog (MS) [0.2X sales de MS (Phytotechnology), 1% de agar (p/v), 0.75% de sacarosa (p/v) (pH 7.0)], las placas con las semillas fueron puestas a 4 °C por dos días para su vernalización. Después fueron pasadas a cámaras de crecimiento a 22 ± 1 °C por 11 días. Posteriormente tres plántulas fueron transferidas al lado izquierdo de cajas Petri divididas conteniendo medio MS al 0.2x con 1% de agar (p/v), 0.75% de sacarosa (p/v). Plantas de 13 días de edad fueron inoculadas con esporas de *Trichoderma virens* como se describe a continuación.

Condiciones de crecimiento del hongo e inoculación de plántulas

Trichoderma virens (GV29.8) y *T. atroviride* (IMI206040) fueron crecido en placas Petri con PDA por 8 días a 28 °C. Las esporas fueron colectadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente. El número total de esporas fue contado en el microscopio con una cámara de Neubauer. Como inóculo se utilizó una suspensión de 1×10^6 esporas por mililitro.

Inoculación de plantas de *Arabidopsis* con *T. virens* (GV29.8) y *T. atroviride* (IMI206040)

Plantas de 13 días de edad (9 placas con 3 plantas por placa) fueron colocadas en el lado izquierdo de la caja Petri dividida. El ensayo de interacción se llevó a cabo en un sistema contacto directo y a distancia de la siguiente manera: 1) plantas control sin inóculo, 2) plantas inoculadas en la parte inferior de la placa del lado izquierdo donde crecen las plantas (At-Tv; At-Ta), 3) plantas inoculadas a distancia, de lado contrario a donde crecen las plantas, es decir en el lado derecho de la placa (At/Tv; At/Ta), y 4) plantas inoculadas a distancia, de lado contrario a donde crecen las plantas, es decir en el lado derecho de la placa, en este caso el hongo se inóculo en medio PDA en el lado derecho de la placa (At/Tv PDA; At/Ta PDA). Después de tres días de inoculación el material vegetal fue colectado y congelado con nitrógeno líquido.

Extracción de RNA total de *Arabidopsis thaliana*

Después de que se congelaron las plantas con nitrógeno líquido se pulverizaron en un mortero y se transfirió el tejido molido a tubos Eppendorf de 1.5 ml hasta la marca de 0.1 ml sin permitir que se descongelara, se añadió 500 µl del reactivo de RNA (Concert™ Plant RNA Reagent; Invitrogen, 2001), mezclándose con vortex hasta homogenizar la mezcla y se deja reposando 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 4 min a 13,400 rpm. Después, se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de RNAasa, agregando 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 RNAasa. Para precipitar se le adicionó un volumen equivalente de isopropanol y se dejó 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugo durante 12 min a 13,400 rpm. Para lavar la pastilla, se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó durante 1 min a 13,400 rpm. Finalmente, se agregaron de 10 a 30 µl de agua libre de RNAasa, mezclando por inversión para disolver el RNA. Se almacena el RNA a -70 °C hasta su procesamiento con DNAsa.

Tratamiento de las muestras con DNAsa

La muestra del RNA total fue aforado hasta un volumen de 100 μ l con agua de DEPC estéril en un tubo eppendor de 1.5ml. Posteriormente se adiciono 0.75 μ l de DNAsa (1U/ μ l) a la muestra total de RNA y 5 μ l del buffer de DNAsa, se mezclo con punta y se incubo a 37°C por 30 minutos. A continuación se adiciono 1 μ l de EDTA 25mM a la muestra de RNA (temperatura ambiente). Se aforo la muestra a un volumen de 300 μ l con agua DEPC esteril y se colocan las muestras a 4°C. Adicionar 300 μ l de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1), se mezcla por inversión a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga por 10 min a 13 000 rpm. A continuación se separa la fase acuosa, la cual es colocada en un tubo nuevo eppendor de 1.5 ml y se le añade un volumen igual al de la fase acuosa de cloroformo:isoamilico (24:1), se mezcla por inversión y se centrifuga 10 min a 13 000 rpm. Separar la fase acuosa a un nuevo tubo eppendor y adicionar 170 μ l de acetato de amonio 7.5 M y 1 ml de etanol absoluto grado reactivo, mezclar por inversión y colocar a menos 20°C por 30 min. Posteriormente centrifugar la muestra por 10 min a 13 000 rpm, se decanta el sobrenadante y se lava la pastilla con 500 μ l de etanol DEPC al 75%, posteriormente se centrifuga 2 min a 13 000 rpm. Finalmente se deja secar la pastilla de 5 a 10 min y se resuspende con 30 μ l de agua DEPC estéril. Se almacena cada muestra de RNA a -70 °C.

Tiempo real de la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)

Los experimentos de tiempo real de RT-PCR se realizaron en una mezcla de 10 μ l de reacción compuesta de 5 μ l del Mix RT.PCR Power SYBR® Green (2x), 200 nM de cada oligonucleótido, 50 ng de RNA y 0.08 μ L del Mix de Enzima RT (125X) de StepOne RT-PCR, siguiendo las sugerencias del fabricante (Applied Biosystems) y usando el Sistema de Detección StepOne Real-Time PCR y el Software v2.1 StepOne (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron de 30 min a 48 °C (síntesis de cDNA), 10 minutos a 95 °C (activación de AmpliTaq

Gold® ADN polimerasa) seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturalización, y de alineamiento y extensión de 1 min a 60 °C.

V. DISCUSION

Existen microorganismos que durante su interacción con plantas ejercen efectos benéficos en la planta, tal como, aumento de la absorción de agua y nutrientes con lo cual se incrementa el crecimiento y la biomasa de las plantas, además del incremento en la tolerancia al estrés (Sukumar et al.2013). *Trichoderma* spp., es un hongo filamentosos de vida libre que se ha clasificado como un microorganismo benéfico, ampliamente distribuido en el suelo y una gran variedad de ecosistemas. Además, es un hongo altamente notable debido a su influencia positiva en el control biológico, la protección de la planta huésped hacia enfermedades y la promoción del crecimiento por la liberación de hormonas o metabolitos (Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Ortiz-Castro *et al.* 2009; Berendsen *et al.* 2012). Este hongo tiene gran impacto en la agricultura, por lo cual, varias investigaciones han sido centradas en el estudio de la interacción entre *Trichoderma* spp., y las plantas. *Arabidopsis* representa un sistema funcional para estudiar las interacciones planta - microorganismo. En este sentido, la interacción *Arabidopsis* - *Trichoderma* se ha convirtiendo en un modelo para entender las vías de señalización, los mecanismos moleculares, la bioquímica y los ajustes fisiológicos llevados a cabo por la planta durante esta interacción (Korolev *et al.* 2008; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Salas-Marina *et al.* 2011; Hermosa *et al.* 2012; Morán-Diez *et al.* 2012; Sáenz-Mata y Jiménez-Bremont 2012; Yoshioka *et al.* 2012; Brotman *et al.* 2013).

En este estudio, se analizaron los cambios en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* ejercidos por dos cepas de *Trichoderma* en un sistema de interacción *in vitro* en contacto directo y en división entre ambos organismos. Observamos que las plántulas de *Arabidopsis* que se cultivaron en división sin contacto con las cepas de *Trichoderma* tuvieron mayor desarrollo que aquellas con contacto físico. Los resultados mostraron que las plantas en el sistema de división alcanzaron mayor peso fresco que los de una interacción directa, así mismo se observó un incremento en el número de raíces laterales. Estos efectos fisiológicos pueden ser la consecuencia de diferentes modificaciones que el hongo produce en

la planta, tales como la modulación de fitohormonas y reguladores del crecimiento. Por lo anterior, se analizó el perfil de las poliaminas (PAs) en plántulas de *Arabidopsis* crecidas durante 3 y 5 días con *T. virens* y *T. atroviride*. Las PAs son moléculas implicadas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en el establecimiento de interacciones microbio - planta.

Nuestro interés en proporcionar evidencia del papel de las PAs durante la interacción *Arabidopsis* – *Trichoderma* se debió a que: 1) Las PAs actúan como reguladores del crecimiento (Tiburcio *et al.* 2014; Kim *et al.* 2014), 2) el perfil de las PAs se modifica notablemente durante las interacciones planta – microorganismo (Hussain *et al.* 2011; Walters 2003) y 3) y reportes recientes las coloca como potenciales moléculas de señalización (Brotman *et al.* 2012; Jiménez-Bremont *et al.* 2014; Kusano *et al.* 2015).

Interesantemente, se observaron oscilaciones en los niveles de PAs determinados en las plántulas de *Arabidopsis* durante la interacción con *Trichoderma* spp., reflejando así un cambio significativo en el metabolismo de las PAs analizadas: Putrescina (Put), espermidina (Spd) y las tetraminas [espermina (Spm) y termoespermina (Tspm)] durante el tiempo de la interacción entre la planta y el hongo. Específicamente, se observó que a los 3 dpi, los niveles de PAs disminuyeron en las plántulas con ambas especies de *Trichoderma* independientemente de la naturaleza de la interacción (sistema de división y de contacto). Una modulación del nivel de PAs ha sido reportado en plantas de *Lotus glaber* en la interacción con hongos micorrícicos (Sannazzaro *et al.* 2007; Hussain *et al.* 2011). Nuestros datos sugieren que la modulación de las PAs observada a los 3 dpi en las plantas durante la interacción con *Trichoderma* spp., puede ayudar al hongo de dos maneras: 1) para evitar su reconocimiento como un patógeno y/o 2) para resistir la defensa del huésped inducida en el inicio de la asociación. En contraste, a los 5 dpi un aumento en los niveles de PAs se observó con ambas especies de *Trichoderma*. Respecto a la interacción con *T. atroviride*, se detectó el

mayor incremento en los niveles de las PAs en el sistema dividido (sin contacto), mientras que con *T. virens* fue en el sistema de contacto. Estas diferencias en el perfil de las PAs analizadas en las plántulas que interaccionan con diferentes hongos podrían atribuirse a la batería de genes involucrados así como a la estrategia de cada especie fúngica para lograr la interacción con la planta. Nuestros datos a los 5 dpi, mostraron una clara evidencia de una correlación positiva entre el aumento de los niveles de las PAs y un mayor crecimiento de la raíz. Diferencias en la concentración de PAs han sido observadas en plantas que interaccionan con hongos que mejoran el crecimiento de estas. Brotman (2012) reportó el perfil metabólico de plantas de *A. thaliana* de 20 días de edad que crecen en suelos suplementados con *Trichoderma asperelloides* T-203, y encontraron que Put era un metabolito que aumentó durante la interacción entre otros metabolitos tales como aminoácidos, azúcares y productos intermedios del ciclo del ácido cítrico. Este aumento en el nivel de Put se relacionó con el aumento del crecimiento de las plantas de *Arabidopsis*. Datos similares se observaron en las plántulas de pino silvestre durante la interacción con el hongo *Paxillus*, donde se reportó una correlación en el aumento de los niveles de Put y el dramático crecimiento de las plántulas (Sarjala *et al.* 2010). Las variaciones en los niveles de PAs son dependientes de la etapa de la simbiosis, la cepa fúngica y la planta hospedero (Kytöviita y Sarjala 1997; Sarjala *et al.* 2010; Fornalé *et al.* 1999).

Debido a sus importantes funciones biológicas, los niveles de PAs deben estar estrictamente regulados a varios niveles: biosíntesis, conjugación, oxidación y transporte. Debido a eso, estuvimos interesados en analizar transcripcionalmente los genes de la arginina descarboxilasa (*ADC*). La *ADC* es una enzima limitante que cataliza el primer paso de la biosíntesis de las PAs, en *Arabidopsis* existen dos genes parálogos: *ADC1* y *ADC2*. Las fluctuaciones observadas en los niveles de PAs cuando las plantas estaban interactuando con *Trichoderma* podrían explicarse por el perfil transcripcional de los genes *ADC1* y *ADC2*. En la mayoría de los casos, a los 3 dpi observamos que los genes *ADC1* y *ADC2* fueron regulados en la

interacción planta – hongo. Sin embargo, a los 5 dpi se observó un aumento en la expresión de ambos genes. Por otro lado, en la interacción directa de *Arabidopsis* - *T. atroviride* se observaron diferentes niveles de expresión para la *ADC* que los observados para las otras interacciones, el gen *ADC2* mostró una expresión más alta, mientras que *ADC1* presentó una represión. Estos datos sugieren que el gen *ADC2* tiene un papel importante en la interacción directa de *Arabidopsis* – *T. atroviride*. En interacciones de plantas con microorganismos patogénicos se ha reportado un aumento en la expresión de los genes *ADC* y de los niveles de Put. Rodríguez-Kessler (2008), reportó un aumento en los niveles de Put en tumores de maíz inducidos por *Ustilago maydis*, donde una regulación del gen *ZmADC1* fue observada. Resultados similares sobre la acumulación de Put y la regulación de los genes *ADC* se reportaron en plantas de *Arabidopsis* durante la interacción con *Rhodococcus fascians* (Stes *et al.* 2011). Nuestros datos muestran un perfil diferencial de los niveles de PAs lo que sugiere que las PAs podrían participar en la intrincada señalización y reprogramación de *Arabidopsis* cuando la planta interactúa con el hongo *Trichoderma* spp.

En la interacción a distancia entre ambas cepas de *Trichoderma* con *Arabidopsis* notablemente se observó que el crecimiento de la raíz primaria no se inhibe en comparación con las plantas de *Arabidopsis* que crecen en contacto directo con los hongos. Esta inhibición del crecimiento de raíces primarias de *Arabidopsis* se ha observado anteriormente cuando el hongo se cultiva en contacto con la planta (Contreras-Cornejo *et al.* 2009; 2014a; 2014b). Además, se observó que las plantas cultivadas sin contacto con hongos generaron el mayor número de raíces laterales. Estos fenotipos observados en las raíces primarias y laterales de *Arabidopsis* pueden atribuirse al control realizado por las auxinas en el desarrollo de la raíz, así como a la señalización molecular llevada a cabo durante la interacción, penetración y el establecimiento de *Trichoderma* en las raíces de las plantas.

Las auxinas son moléculas pequeñas cuya función principal es la de regular el crecimiento de la planta. Los diversos procesos de desarrollo controlados por las auxinas, son el alargamiento del tallo, la dominancia apical, la iniciación del crecimiento de las raíces, el desarrollo del fruto y el tropismo. A nivel molecular se ha reportado que las auxinas pueden modificar la expresión génica en minutos de una manera dramática y selectiva en las plantas (Teale *et al.* 2006). La regulación génica efectuada por las auxinas es llevada a cabo a través de las proteínas Aux/IAA y la familia de factores de transcripción ARF (factores de respuesta a auxinas), los cuales regulan la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Teale *et al.* 2006; Chapman y Estelle, 2009). Los ARFs juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, reportes demuestran que ARF6 y ARF8 pueden actuar de manera conjunta y que son componentes clave del desarrollo floral y radicular de las plantas (Curaba *et al.* 2014). Se ha reportado que los genes *ARF6* y *ARF8* regulan el crecimiento tanto vegetativo como reproductivo de los tejidos de las plantas (Nagpal *et al.* 2005; Chapman y Estelle. 2009; Liu *et al.* 2014). Nagpal, 2005, reporto que la doble mutante de estos genes las plantas no logran desarrollar la flor y además que se disminuyen las concentraciones de ácido jasmónico. Por otro lado, Li, 2010, mostró que estos genes no son regulados por la flagelina, un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) ya bien caracterizado. Interesantemente, nuestros resultados mostraron que durante la interacción *Arabidopsis* – *Trichoderma* se da una regulación de los genes *ARF6* y *ARF8*, y que esta regulación es dependiente de la etapa de la simbiosis, la cepa fúngica y la condición de interacción.

VI. CONCLUSIONES

Con el objetivo de evaluar si el efecto de promoción de crecimiento descrito previamente del hongo *Trichoderma* en plantas es dependiente del contacto físico entre la planta y el hongo, se llevó a cabo la caracterización de la interacción en contacto directo y dividido de plantas de *Arabidopsis thaliana* con dos cepas del género fúngico *Trichoderma*.

A nivel de fenotipo los resultados mostraron que en la interacción a distancia con ambas cepas de *Trichoderma* los parámetros analizados de biomasa, longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de las raíces laterales presentaron valores mayores que los obtenidos en la interacción en contacto directo. Interesantemente, el crecimiento de la raíz principal no se acorta en la interacción a distancia como ocurre en la interacción en contacto directo. Incluso las raíces de las plantas que interaccionan a distancia son las que presentan mayor número de raíces laterales.

A nivel molecular los resultados mostraron que lo observado a nivel de fenotipo puede ser consecuencia de las diferentes modificaciones que el hongo produce en la planta, tal como es la modulación de los genes involucrados ya sea en la biosíntesis, conjugación y transporte de los reguladores del crecimiento y / o fitohormonas tales como las poliaminas y auxinas, los cuales deben ser regulados de manera estricta.

Los resultados derivados de este trabajo evidencian la comunicación que se produce entre las plantas y los hongos benéficos, en el que las plantas son capaces de reconocer los compuestos derivados de hongos y afinar sus respuestas de defensa y de crecimiento.

VII. REFERENCIAS

Alonso, J.M., 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), pp.653–657

Anna Russo, Gian Pietro Carrozza, Lorenzo Vettori, Cristiana Felici, Fabrizio Cinelli and Annita Toffanin (2012). *Plant Beneficial Microbes and Their Application in Plant Biotechnology, Innovations in Biotechnology*, Dr. Eddy C. Agbo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0096-6

Antoun H., Beauchamp C. J., Goussard N., Chabot R., Lalande R., (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 204:57–67.

Avis T. J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R. J., (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:1733–1740.

Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters*, 32(11), 1559-1570.

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.

Benítez T., Rincon A. M., Limón M. C., Codón A. C., (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7:249-260

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

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), 11-18.

Björkman, T., Blanchard, L. M., & Harman, G. E. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123(1), 35-40.

Brotman, Y., Kapuganti, J. G., & Viterbo, A. (2010). *Trichoderma*. *Current Biology*, 20(9), R390-R391.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Willmitzer, L., 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog.* 9 (3), e1003221.

Burr TJ, Caesar AM, Schrolh N, 1984. Beneficial plant bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2 (Suppl 1): 1–20

Chapman, E. J., & Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annual review of genetics*, 43, 265-285.

Cherry, J. H., Locy, R. D., & Rychter, A. (2000). Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering:[proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Mragowa, Poland, 13-18 June, 1999] (Vol. 83). Springer Science & Business Media.

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J., 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149 (3), 1579-1592.

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J., 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 Signal. Behav.* 6 (10), 1554e1563

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Herrera-Estrella, A., López-Bucio, J., 2014a. The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant soil* 379 (1-2), 261-274.

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R., López-Bucio, J., 2014b. *Trichoderma* spp. Improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27 (6), 503-514

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 4951-4959.

Curaba, J., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2014). miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of experimental botany*, eru002.

Davies P.J. *Plant Hormones* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1995)

Deacon J. 2006. *Fungal Biology*. Oxford UK: Blackwell

Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M.A., Rodríguez-Hernández, A.A., Jiménez-Bremont, J.F., Flores, J., 2010. Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signal. Behav.* 5 (10), 1229e1230.

Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M.A., Jiménez-Bremont, J.F., Flores, J., 2011. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biol.* 13 (1), 154e159.

Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J.F., de la Luz Guerrero-González, M., Flores, J., 2013. Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. *J. Plant Res.* 126 (5), 643e649.

Dodds, P.N.; Rathjen, J.P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 2010, 11, 539–548.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9, 749–759

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 Biol. Biochem.* 39 (8), 1968e197

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.

Harman, G E, 2000. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease*

Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews.* 2:43-55

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7(11), 1456-1466.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158:17–25

Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16(2), 69-80.

Higa, T., & Parr, J. F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment (Vol. 1). Atami, Japan: International Nature Farming Research Center.

Huang, H.C., Erickson, R.S (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*. 155:31–37

Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol.* 6 (1), 19-26.

Jafari, G. A., Laghari, K. P. K., & Keshavarz, K. (2015). Study of influence of azotobacter and bio-phosphate fertilizers on yield and yield components of wheat. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 6(2), 380-388.

Joseph B, Patra RR, Lawrence R, 2007. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L). *International Journal of Plant Production*, 1 (Suppl 2): 141-152.

Kleifeld, O., & Chet, I. (1992). *Trichoderma harzianum*—interaction with plants and effect on growth response. *Plant and soil*, 144(2), 267-272.

Koornneef, M. & Meinke, D., 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6), pp.909–921

Lau, S., Jürgens, G., & De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *The plant cell*, 20(7), 1738-1746.

Limon, M.C., Codón, A.C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249e260

Ljung, K., Bhalerao, R. P., & Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28(4), 465-474.

Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., & Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 17(4), 1090-1104.

Loera-Corral O. (2002) Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. *Biotecnología*, 7 (2), 25-37.

Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:395–417.

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.

Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Collado IG, Hermosa R, Monte E, Gutiérrez S (2013) Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genet Biol* 53:22-33

Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa R, Monte E, Gutiérrez S (2012) Involvement of *Trichoderma* trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Appl Environ Microbiol* 78:4856-4868

Martin, L. B., Fei, Z., Giovannoni, J. J., & Rose, J. K. (2013). Catalyzing plant science research with RNA-seq. *Frontiers in plant science*, 4.

Mastouri, F., Bjorkman, T., Harman, G.E., 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*. 100, 1213-1221.

Meinke, D.W., 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282(5389), pp.662–682

Mehnaz S., Lazarovits G (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51:326–335.

Michniewicz, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 5.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual review of phytopathology*, 51, 105-129.

Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, et al. 2005. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*132:4107–18

Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 701-712.

Prasad, K., & Dhonukshe, P. (2013). Polar auxin transport: cell polarity to patterning. In *Polar auxin transport* (pp. 25-44). Springer Berlin Heidelberg.

Piel J, Atzorn R, Gäbler R, Kühnemann F, Boland W (1997) Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signalling cascade. *FEBS Lett* 416:143-148

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.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347-375.

Rai, V. K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum*, 45(4), 481-487.

Roco, A., Pérez, L.M., 2001. In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. *Electron. J. Biotechnol.* 4 (2), 1-2

Richardson A. E., (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 28:897–906.

Sáenz-Mata, J., Salazar-Badillo, F.B., Jiménez-Bremont, J.F., 2014. Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* WRKY genes under interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. *Acta Physiol. plant.* 36 (5), 1085-1093

Saharan BS, Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research* 21: 1–30.

Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, CastroLongoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S (2011) 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* 131:15–26

Salazar-Badillo, F. B., Sánchez-Rangel, D., Becerra-Flora, A., López-Gómez, M., Nieto-Jacobo, F., Mendoza-Mendoza, A., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015).

Arabidopsis thaliana polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 49-56.

Samolski, I., Rincón, A.M., Pinzón, L.M., Viterbo, A., Monte, E., 2012. The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158 (1), 129e138

Sang M. K., Chun S. C., Kim K. D., (2008). Biological control of *Phytophthora* blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control*. 46:424–433

Schenk, P. M., Carvalhais, L. C., & Kazan, K. (2011). Unraveling plant–microbe interactions: can multi-species transcriptomics help?. *Trends in biotechnology*, 30(3), 177-184.

Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena M, Oliveira E, Trillas E (2007) Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7:3943–3952

Siddiqui Z. A., Mahmood I., (1998). Effect of a plant growth bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. *Applied Soil Ecology*. 8:77-84.

Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S., & Murrell, J. C. (2004). Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in microbiology*, 12(8), 386-393.

Singh V., Hoshi B. B., Awasthi S. K., Srivastava S. N., (2008). Eco-friendly management of red rot disease of sugarcane with *Trichoderma* strains. *Sugar Tech*. 10:158-161

Shen O.-H., Choi S.-M., Lee, Park C.-S., (2002). In vitro and in vivo activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Journal*.18:221–224.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21–43

Slankis V. 1973. Hormonal relationships in mycorrhizal development. In: Marks GC, Kozlowski TT, editors. *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology*. Academic Press: New York. p 231–298

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.

Sukumar P, Legue´ V, Vayssie`res A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant Cell Environ* 36:909–919

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.

Vessey J. K., (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* 255

Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P. B., & Friml, J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in plant science*, 12 (4), 160-168.

Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M., (2008). Trichoderma-plant pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry.* 40:1-10

Windham, M.T., Elad, Y., Baker, R., 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76, 518e521

Whipps, J. M., (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82:1198–1227571–586.

Wolpert, T. J.; Dunkle, L. D. and Ciuffetti, L. M. (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annual Review of Phytopathology* 40: 251-285.

Yamprai, A., Mala, T., & Sinma, K. (2014). The Study on the Fixed Nitrogen and Nitrogenase Activity in the Day-Round of *Azotobacter* and *Azospirillum* Grown with Maize in KamphaengSaen Soil Series. *Modern Applied Science*,8(6), p27.

Yasmin F, Othman R, Saad MS, Sijam K, 2007. Screening for beneficial properties of Rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Journal of Biotechnology*, 6 (Suppl 1): 49-52.

Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I., 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* 235 (2), 235-242

Zamioudis, C.; Pieterse, C.M.J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012, 25, 139–150.