



INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

Caracterización molecular de dos hongos, durante la interacción
microorganismo-planta, para control biológico y promoción del
crecimiento en *Arabidopsis thaliana*

Tesis que presenta

Miguel Angel Silva Flores

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. Sergio Casas Flores

San Luís Potosí S.L.P., Noviembre 2011



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Caracterización molecular de dos hongos durante la interacción microorganismo-planta, para el control biológico y la promoción del crecimiento en *Arabidopsis thaliana*" presentadas para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por M.C. **Miguel Ángel Silva Flores** y aprobada en 11 de Noviembre de 2011 por los suscritos designados por el Colegio de Profesores de la división de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica AC.

Dr. J. Sergio Casas Flores
Director de tesis

Dr. Angel Gabriel Alpuche Solís
Asesor de tesis

Dr Gerardo Arguello Astoaga
Asesor de Tesis

Dr. Juan Campos Guillén
Asesor de tesis



Créditos Institucionales

Esta tesis se elaboro en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la división de Biología Molecular Biología Molecular del Instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio Casas Flores.

Durante la elaboración de este trabajo el autor recibió la beca académica de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de registro 70244

Acta de examen

Dedicatorias

A mi familia

Ana Luz

Miguel Alejandro

Luis Angel

A la familia Romero Ruiz

A mis padres y mis hermanos

Agradecimientos

CONACyT Por la beca brindada para la realización de mi estudio de doctorado.

A lo FOMIX Guanajuato por el apoyo para la realización de algunas pruebas de campo relacionadas con el trabajo de investigación

IPICyT Por la oportunidad de recibirme y darme permitirme entrar al fascinante mundo de la biología molecular.

A la División de Biología Molecular y todos los profesores investigadores que facilitaron y compartieron sus conocimientos.

Al laboratorio del Dr Angel Alpuche y del Dr Gerardo Argüello y a su respectivo personal por su ayuda y amistad.

Al Dr Sergio Casas: Por su amistad y por la guía en esta etapa de mi vida

A la Dra Lina Riego por compartir su laboratorio y la ayuda proporcionada en todo momento

A los compañeros y amigos del laboratorio de la Dra. Lina Riego y del Dr. Sergio Casas

A mis compañeros y amigos con los que iniciamos este camino Mayte, Miguel, Edith, Aida. Además a Bernardo, Pablo, Armando, Omar, Yahir, Claudia, Paco, Javier y a todos lo que por falta de espacio me es imposible mencionar.....Mil gracias

Contenido

	Pag
Constancia de aprobación de tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Control biológico de fitopatogenos	2
<i>Trichoderma</i> como agente de control biológico	3
Resistencia basal en platas y respuesta hipersensible	5
Resistencia sistémica en plantas	6
Resistencia sistémica Adquirida (RSA)	6
Resistencia sistémica inducida(RSI)	7
PGPR, PGPF y la resistencia sistémica en plantas	8
La RSI y la RSA activada por <i>Trichoderma</i>	9
Resumen capitulo I	
The plant growth-promoting fungus <i>Aspergillus ustus</i> promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	12
Discusión Capitulo I	13
Resumen capitulo II	
Colonization of <i>Arabidopsis</i> roots by <i>Trichoderma atroviride</i> promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways.	17
Discusión Capitulo II	18
Conclusiones generales	24
Bibliografía	25
Anexos	39
Anexo1	40
Paper capitulo I	
Colonization of <i>Arabidopsis</i> roots by <i>Trichoderma atroviride</i> promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways	41
Anexo2	53
Paper capitulo II	
The plant growth-promoting fungus <i>Aspergillus ustus</i> promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	54

Resumen

Para afrontar a los patógenos las plantas han desarrollado mecanismos de defensa. Las fitohormonas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como, en la respuesta sistémica inducida por microorganismos patógenos y benéficos. En el presente trabajo se identificó un aislado del hongo *Aspergillus ustus* capaz de promover el crecimiento y desarrollo de *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se emplearon líneas de *Arabidopsis* para medir la expresión de genes reporteros expresados/reprimidos por auxinas o genes controlados por el ciclo celular (DR5 y *CycB1*) que mostraron un incremento en la actividad de GUS cuando se comparó con plántulas en las que se simuló la inoculación. Se evaluó la respuesta de mutantes de *Arabidopsis* en la señalización o síntesis de auxinas, etileno citocininas o ácido abscísico. La inoculación de *Arabidopsis* con el hongo indujo la resistencia sistémica contra el hongo necrotrofico *Botrytis cinerea* y la bacteria hemibotrofa *Pseudomonas syringae* DC3000, probablemente por la inducción de la expresión, de genes relacionados con el Ácido Salicílico, Ácido Jasmónico/Etileno y la síntesis de Camalexina.

Por otro lado se evaluó la capacidad de *Trichoderma atroviride* para colonizar la raíz de *Arabidopsis thaliana* y el efecto de este hongo en el crecimiento y desarrollo de la planta. Además, se determinó que *T. atroviride* produce compuestos tipo indol en medio de cultivo líquido capaces de estimular el crecimiento en la planta. También, se determinó que la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *T. atroviride* induce la protección contra patógenos foliares. Se evaluó el perfil en la expresión de un grupo de genes relacionados con las vías del Ácido Salicílico, Acido Jasmonico/Etileno, estrés oxidativo y camalexina en *Arabidopsis* y se detrmínó que la colonización de la raíz de *Arabidopsis* por *T. atroviride* induce la expresión simultanea de genes relacionados con las vías del SA y JA/ET para conferir resistencia contra patógenos hemibiotróficos y necrotroficos. El efecto benéfico inducido por la inoculación de la raíz de *Arabidopsis* con *T. atroviride* y la inducción del sistema de defensa de la planta sugiere un dialogo molecular entre estos organismos.

Abstract

To deal with pathogens, plants have evolved sophisticated mechanisms including constitutive and induced defense mechanisms. Phytohormones play important roles in plant growth and development, as well as in the systemic response induced by beneficial and pathogen microorganisms. In this work, we identified an *Aspergillus ustus* isolate that promotes growth and induces developmental changes in *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. Assays performed on *Arabidopsis* lines to measure reporter gene expression of auxin-induced/repressed or cell cycle controlled genes (*DR5* and *CycB1*, respectively) showed enhanced GUS activity, when compared with mock-inoculated seedlings. We evaluated the response of a collection of hormone mutants of *Arabidopsis* defective in auxin, ethylene, cytokinin, or abscisic acid signaling to the inoculation with this fungus. All mutant lines inoculated with *A. ustus* showed increased biomass production, suggesting that these genes are not required to respond to this fungus. Moreover, we demonstrated that *A. ustus* synthesizes auxins and gibberellins in liquid cultures. In addition, *A. ustus* induced systemic resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and the hemibiotrophic bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000, probably through the induction of the expression of salicylic acid, jasmonic acid/ethylene, and camalexin defense related genes in *Arabidopsis*.

Trichoderma spp. are common soil fungi used as biocontrol agents due to their capacity to produce antibiotics, induce systemic resistance in plants and parasitize phytopathogenic fungi of major agricultural importance. Here it is shown that *T. atroviride* promotes growth to *Arabidopsis*. Moreover, *T. atroviride* produced indole compounds in liquid cultures. These results suggest that indoleacetic acid-related indoles produced by *T. atroviride* may have a stimulatory effect on plant growth. In addition, *Arabidopsis* roots inoculation with *T. atroviride* provided systemic protection to the leaves inoculated with bacterial and fungal pathogens. *T. atroviride* induced an overlapped expression of defense-related genes of SA and JA/ET pathways, and of the gene involved in the synthesis of the antimicrobial phytoalexin, camalexin, both locally and systemically. The beneficial effects induced by the inoculation of *Arabidopsis* roots with *T. atroviride* and the induction of plant defense system suggests a molecular dialogue between these organisms.

Introducción

En el suelo, las raíces de las plantas están rodeadas por un hábitat rico en nutrientes denominado la rizósfera, la cual provee un nicho a una gran y diversa comunidad de microorganismos que se alimentan de los exudados de la raíz (Lugtenberg *et al.*, 2001). En esta comunidad de competencia e interacciones microbianas, un gran número de microorganismo nocivos y benéficos pueden ser encontrados, los cuales pueden causar enfermedades o mejorar la sanidad y promover el crecimiento de la planta respectivamente.

Los mecanismo por medio de los cuales los microorganismos promueven el crecimiento de las plantas se puede categorizar como mecanismos directos y mecanismos indirectos (Glick 1995). Los mecanismos directos incluyen la producción de fitohormonas como AIA, GA, y citocininas entre otras. Además de la solubilización de nutrientes como fósforo (Glick, 1995; Idriss *et al.*, 2002). Los microorganismos también promueven el crecimiento por la supresión de patógenos de las plantas y microorganismos deletéreos de la rizosfera liberando a las plantas del daño que pudieran causar estos microorganismos (Kloepper,1992; Schippers *et al.*, 1987). Estos mecanismos indirectos como la supresión de microorganismos nocivos y la activación de la resistencia sistémica inducida son normalmente reconocidos por jugar un papel en el control biológico (Kloepper, 1992; Dobbelaere *et al.*, 2003).

Los microorganismos promotores de crecimiento se dividen en dos grandes grupos; el primero incluye a rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR de sus siglas en inglés). Las PGPR son bacterias asociadas a la rizosfera, que estimulan el crecimiento vegetal (Durrant y Dong, 2004; Van Poecke y Dicke, 2002; Von Dahl y Baldwin, 2007). El segundo grupo incluye a hongos promotores del crecimiento de las plantas (PGPF de sus siglas en inglés, Plant Growth Promoting Fungus), Estos hongos de la rizosfera son capaces de promover el crecimiento vegetal debido a la solubilización de elementos esenciales para el desarrollo de las plantas como el nitrógeno y fósforo, a la producción de fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (AIA) citocininas (CK) y giberelinas (GA) (Zou y Tan, 1999; Hamayun, 2010; Yadav *et al.*, 2011; Salas-Marina *et al.*, 2011).

La capacidad de los microorganismos para sintetizar fitohormonas es ampliamente conocida (Costacurta y Vanderleyden 1995; Tsavkelova *et al.*, 2006). Bacterias hongos, algas producen auxinas, citocininas o giberelinas (Tsavkelova *et al.*, 2006). Por otro lado los microorganismos también sintetizan otras fitohormonas y compuestos tipo hormonas incluyendo ácido abscísico, brasinoesteroides, oligosacáridos, ácido jasmonico, ácido salicílico y etileno (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Control biológico de fitopatógenos

El control de los microorganismos que generan enfermedades a las plantas tradicionalmente se ha realizado con productos químicos. La aplicación de estos compuestos ha generado efectos nocivos al entorno, al consumidor, no son redituables a largo plazo, dejan residuos en las hojas y frutos, y generan resistencia de los fitopatógenos (Naseby *et al.*, 2000; Gerhardson, 2002). Una alternativa al control químico de fitopatógenos, se refiere al control biológico. Entendiendo el control biológico como cualquier condición ó practica por medio de la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (Garret 1965). Esta alternativa de control permite utilizar únicamente los agentes de control biológico o como parte de un esquema que contemple cantidades mínimas de productos químicos, minimizando así, el impacto en el medio ambiente (Chet e Inbar, 1994; Harman y Kubicek, 1998). Entre los principales organismo utilizados para el control biológico, de fitopatógenos se encuentran cepas bacterianas pertenecientes a los géneros de *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus*, así como hongos de los géneros *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium*, *Gliocladium* y *Trichoderma* (Vinale *et al.*, 2008).

Se ha reportado que hongos del género *Trichoderma* son capaces de degradar hidrocarburos, clorofenoles, polisacáridos y plaguicidas empleados en la agricultura (Harman y Kubicek, 1998; Harman *et al.*, 2004a). Estos hongos además presentan cierto grado de resistencia a fungicidas químicos como Thiram y oxiclورو, lo que permite que sean empleados como parte de un programa de manejo que contemple ambas opciones (Vinale *et al.*, 2004; Roberti *et al.*, 2006).

***Trichoderma* como agente de control biológico**

Desde hace casi 70 años, los hongos del genero *Trichoderma* han sido los más estudiados y utilizados como biorremediadores, biofertilizantes o biofungicidas (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a; Lorito *et al.*, 2004). *Trichoderma* protege a las plantas contra el ataque de otros hongos por la acción de diferentes mecanismos incluyentes entre si: micoparasitismo, antibiosis, competencia, promoción del crecimiento y/o inducción de resistencia a patógenos en la planta hospedante (Kubicek *et al.*, 2001; Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a)

Durante el **micoparasitismo** *Trichoderma* realiza una serie de procesos que incluyen; reconocimiento del hospedante, ataque y subsecuente penetración y finalmente la muerte. Durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas (CWDEs de sus siglas en inglés, cell wall degrading enzymes) que hidrolizan la pared celular del hongo patógeno, posteriormente hay una liberación de oligómeros por la pared celular del patógeno (Kubicek *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2006). Se cree que *Trichoderma* secreta enzimas hidrolíticas de manera constitutiva y detecta la presencia del otros hongos mediante la detección de las moléculas liberadas por la degradación enzimática del hospedante (Lorito *et al.*, 2006; Woo y Lorito, 2007). Una vez localizado el hongo patógeno y que ambos entran en contacto, *Trichoderma* se enrolla alrededor del hongo patógeno, formando estructuras tipo apresorio con las que posteriormente lo penetra (Chet e Inbar, 1997; Benítez *et al.*, 2004).

La **antibiosis** se define como el fenómeno mediante el cual un hongo antagonista inhibe o destruye a un organismo a través de la producción metabólica de moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas hidrolíticas (Baker y Griffin, 1995), las cuales son capaces de dañar polímeros estructurales como quitina y β -1-3 glucanos de la pared celular de la mayoría de los hongos fitopatógenos produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994).

En este sentido se sabe que algunas cepas de *Trichoderma* liberan metabolitos secundarios con esta propiedad, que pueden ser solubles o volátiles. De acuerdo a la ruta biosintética estos metabolitos se dividen en: derivados del ácido tricarbóxico, ácidos grasos, compuestos heterocíclicos de oxígeno, policétidos, terpenos y derivados de aminoácidos y pironas (Sivasithamparan y

Ghisalberti, 1998). La producción de antibióticos depende de cada aislado y de las condiciones ambientales, que determinan que compuestos se sintetizaran y en qué cantidad.

La **competencia** por espacio y por nutrimentos es importante en el control biológico y se presenta cuando dos o más microorganismos requieren de un mismo recurso, más del que está disponible de manera inmediata. Estos requerimientos pueden ser nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etcétera (Paulitz, 1990). Por otra parte, la capacidad para colonizar la rizosfera es fundamental en este proceso, ya que, un agente de control biológico que no sea capaz de crecer en la rizosfera no podrá competir por espacio y los nutrientes de ese ecosistema (Howell, 2003).

Recientemente se ha reportado que *Trichoderma* estimula la **promoción del crecimiento** de la plantas de forma indirecta, debido a que produce ácidos orgánicos como el ácido glucónico, ácido cítrico, ácido fumarico, los cuales son capaces de disminuir el pH del suelo y con esto permitir la solubilización de fosforo, micronutrientes y cationes minerales como el hierro, magnesio y manganeso, utilizados en el metabolismo vegetal (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004a). También se ha reportado algunas cepas de *Trichoderma* promueven el crecimiento de manera directa al secretar fitohormonas como el ácido 3-indolacético (AIA), trans-zeatina ribosido (*t*-ZR), dihidrozeatina ribosido (DHZR) ácido giberélico (GA3) y ácido abscísico (ABA), etileno, las cuales son empleadas en el crecimiento y desarrollo vegetal, o bien, porque modifican los niveles hormonales de las plantas (Naseby *et al.*, 2000; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Martínez-Medina *et al.*, 2010; Salas-Marina *et al.*, 2011; Sofo *et al.*, 2011).

Además, de los mecanismos descritos para el biocontrol de fitopatógenos utilizados por *Trichoderma*, se ha descrito que algunas cepas de este género son capaces **de inducir la resistencia sistémica en plantas** contra diversos fitopatógenos como hongos, bacterias, oomicetos, e incluso virus (Lorito *et al.*, 1998; Harman *et al.*, 2004a, Salas-Marina *et al.*, 2011). El contacto con microorganismos patógenos o no patógenos desencadenan en las plantas mecanismos de defensa, de los cuales se reconocen la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI)

Resistencia basal en plantas y respuesta hipersensible.

A pesar de que las plantas están expuestas a un sin número de plagas y patógenos, solo una pequeña parte de estos ataques derivan en enfermedad. Esto se debe a que durante el transcurso de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse de la invasión de plagas y patógenos (Dangl y Jones 2001). Las plantas poseen mecanismos de defensa que proveen de resistencia pasiva contra la penetración de insectos o patógenos, incluyendo barreras físicas, la apertura o cierre estomático, la consistencia y forma de la cutícula, la presencia de tricomas, la deposición de callosa y formación de papillas (Nishimura *et al.*, 2003). Las plantas también son capaces de reconocer específicamente a las plagas o patógenos por medio de los productos de los genes de resistencia (*R*). Adicionalmente, las plantas se defienden al producir inhibidores de proteasas y enzimas líticas como quitinasas y glucanasas (proteínas relacionadas con patogénesis o PR de sus siglas en inglés), compuestos con actividad antimicrobiana como las fitoalexinas (Peña-Cortes y Wilmitzer, 1995) y por la formación de autofagosomas en células adyacentes a las células infectadas (Liu *et al.*, 2005). Las bases genéticas de la resistencia a patógenos fueron dilucidadas por primera vez por Flor (1955). Estudiando la roya de lino *Melampsora lini* demostró que la resistencia a este hongo se debía a la presencia simultánea de un gen *R* en el hospedante y un gen correspondiente de avirulencia (*Avr*) en el hongo. La ausencia del gen *R* o del gen *Avr* resultaba en enfermedad. Esta observación condujo a la teoría del gen por gen entre hospedante y patógeno (Keen, 1990). El reconocimiento específico del producto del gen *Avr* desencadena una cascada de señalización que activa la defensa de la planta. La respuesta hipersensible (HR) se caracteriza por una muerte rápida del tejido en el sitio de infección formando una barrera física de células muertas para limitar la multiplicación y diseminación del patógeno, aislándolo del resto de la planta. Puede ser activada por microorganismos patógenos, insectos herbívoros, pero también por microorganismos benéficos como hongos, micorrizas y rizobacterias promotores del crecimiento (Kessler y Baldwin, 2002; Dicke y Hilker, 2003).

Resistencia sistémica en plantas

La respuesta de defensa de las plantas a los patógenos está coordinada tanto espacial como temporalmente para lograr la contención rápida del patógeno, por lo que, puede ser local (HR) (Van Loon, 1998) o en sitios lejanos a la infección inicial, conocida como Respuesta Sistémica (RS) (Kunkel y Brooks, 2002).

La inducción de la RS a patógenos en las plantas por *Trichoderma* spp. se ha estudiado menos que la resistencia inducida por rizobacterias, debido a que la comunidad científica que trabaja con *Trichoderma* se ha enfocado al estudio de factores asociados con los efectos sobre otros hongos particularmente al micoparasitismo y la antibiosis. El primer trabajo donde claramente se demuestra la inducción de resistencia por *Trichoderma* es el de Bigirimana *et al.* (1997). Estos autores demostraron que tratando el suelo con *Trichoderma harzianum* T-39, las hojas de frijol resistían mejor al ataque por los patógenos foliares *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*. *T. harzianum* cepa T-22 es capaz de inducir la resistencia sistémica contra patógenos de maíz (Harman *et al.*, 2004b). También en pruebas de campo *Trichoderma harzianum* T-22, aplicado a la raíz, disminuye considerablemente el daño causado por *Alternaria solani* en el follaje de tomate (Seaman, 2003). En otro trabajo se reportó que *T. asperellum* cepa T-203 estimula la resistencia sistémica en plantas de pepino contra *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Yedidia *et al.*, 2003).

Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)

El término de Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) fue acuñado por primera vez por Ross, quien describió la resistencia inducida en hojas superiores de una planta de tabaco, que desarrolló lesiones necróticas de las hojas inferiores inoculadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Ross, 1966). La respuesta sistémica es una respuesta de defensa activa, sistémica de amplio espectro, efectiva contra hongos, bacterias, nematodos, plantas parásitas e insectos herbívoros (Van Loon *et al.*, 1998; Kessler y Baldwin, 2002; Estrada-Hernández *et al.*, 2009).

La RSA normalmente se desencadena por una infección local que le proporciona protección a la planta ante el ataque posterior de patógenos, se

relaciona con un incremento en la producción de la fitohormona Ácido Salicílico (AS) y la activación coordinada de un grupo de genes relacionados a patogenicidad (*PR*), muchas de los cuales codifican para proteínas PR con actividad antimicrobiana (Durrant y Dong, 2004; Van Loon *et al.*, 2006). Mutantes en genes relacionados con la vía de síntesis o percepción del SA, han demostrado un papel relevante de esta hormona en la RSA (Loake y Grant, 2007; Vlot *et al.*, 2008). La proteína reguladora NPR1 (Nonexpressor of *PR* genes1) es una molécula transdutora muy importante de la señal del SA, el cual después de la activación por SA actúa como un coactivador transcripcional de la expresión de los genes *PR* (Dong, 2001).

Resistencia Sistémica Inducida (RSI)

Además de los patógenos, existen microorganismos no patógenos que pueden elevar los niveles de resistencia a las enfermedades en las plantas. La RSI con frecuencia se desencadena en respuesta a la colonización de las raíces por bacterias promotoras del crecimiento (PGPR), las cuales actúan como endosimbiontes. Esta simbiosis es muy común entre leguminosas y algunos géneros de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, y *Sinorhizobium* (Graham y Vance 2000). La RSI también puede ser desencadenada por hongos promotores del crecimiento de plantas (PGPF) (Hossain *et al.*, 2007). Entre los PGPF reportados como inductores de la RSI tenemos a los hongos micorrizicos (Pozo y Azcon-Aguilar, 2007) y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* (Duijff *et al.*, 1998; Paparu *et al.*, 2007), *Trichoderma* spp. (Vinale *et al.*, 2008) entre otros. Aunque la RSA y la RSI son fenotípicamente similares y son efectivas contra un gran número de patógenos, su espectro de efectividad es parcialmente divergente, es decir, no responden de igual manera a una diversidad de patógenos. Además, son reguladas por vías de señalización diferentes. Por ejemplo, la RSI no involucra proteínas PR, ni un incremento en los niveles de SA, características típicas de la RSA (Hoffland *et al.*, 1995). Plantas transformantes NahG, que expresan al gen bacteriano *nahg* que codifica para una salicilato hidroxilasa y por lo tanto, son incapaces de acumular SA, muestran niveles de inducción de la resistencia contra la PGPR *Pseudomonas fluorescens* a los mismos niveles que la cepa silvestre (Pieterse *et al.*, 1998). Se ha determinado que esta respuesta es

mediada por las fitohormonas Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET) (Van Loon *et al.*, 1998). El JA, es un derivado del metil jasmonato (MeJA) y se considera una molécula de señalización importante durante el inicio y/o mantenimiento del proceso de defensa en las plantas (Clarke *et al.*, 2001; Van der Fits *et al.*, 2000). El JA induce la transcripción de genes involucrados en la inducción de la resistencia por ejemplo genes que codifican para enzimas como la lipoxigenasa 2 (LOX2), aleno oxidasa sintasa (AOS), aleno oxidasa ciclasa (AOC), 12-oxo-fitodienoato reductasa (OPR3), ácido jasmonico carboxil transferasa (JMT) (Heitz *et al.*, 1997; Laudert and Weiler 1998; Mussig *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2001; Stenzel *et al.*, 2003). La AOC se considera una enzima esencial en la biosíntesis de JA y funciona desencadenado el primer cíclico biológicamente activo del ácido 12-oxo-fitodienoico (Schaller *et al.*, 2008). Mutantes en la vías de señalización del JA (*jar1*, *jin1*, *eds8* y *coi1*) (Pieterse *et al.*, 1998; Ton *et al.*, 2002) y el ET tales como *etr1* (ethylene response 1) y *ein* (ethylene insensitive) (Knoester *et al.*, 1999; Pieterse *et al.*, 1998) están completamente bloqueadas en la RSI. La RSI es promovida por PGPR como *P. fluorescens*, entre otras. Con respecto a los PGPF también se ha demostrado que son capaces de inducir la RSI, entre ellos, *Penicillium* spp. GP16-2, *Trichoderma harzianum* T39 y *P. indica*, cuya respuesta en plantas mutantes en JA o ET también resultó bloqueada (Hossain *et al.*, 2007; Korolev *et al.*, 2008).

PGPR, PGPF y la resistencia sistémica en plantas.

Además de los trabajos con *Trichoderma* existen trabajos con otro tipo de microorganismos. Por ejemplo *P. aeruginosa* 7NKS2, una PGPR, aislada de raíces de cebada es efectiva para controlar *Pythium splendens* en tomate (Buysens *et al.*, 1996) y de *B. cinerea* en frijol y tomate (De Meyer and Hoöfte, 1997; Audenaert *et al.*, 2002). Además es capaz de activar la RSI contra el virus del mosaico del tabaco (De Meyer *et al.*, 1999). Por otro lado algunos PGPF son capaces de colonizar la rizosfera, además de ser potencialmente agentes de biocontrol. *Heteroconium chaetospora* es un hongo endófito capaz de inhibir el crecimiento de *Verticillium yellows* en repollo (Narisawa *et al.*, 2000; Narisawa *et al.*, 2005). También, reduce la incidencia de la mancha foliar bacteriana y el daño causado por *Alternaria* mediante la inducción de la resistencia sistémica en col china (Morita *et al.*, 2003). Algunos aislados de

Alternaria spp. secretan un alcaloide llamado Altersetina, el cual muestra actividad bactericida contra bacterias patógenas gram positivas (Hellwig *et al.*, 2002). Filtrados (CF) de algunas especies de *A. niger*, *A. nidulans* presentan actividad insecticida contra estadios juveniles del nematodo del tomate *Meloydogyne javanica* (Siddiqui *et al.*, 2001; 2004; 2009). *A. giganteus* produce una proteína de bajo peso molecular (51 aminoácidos) con propiedades antifúngicas, denominada proteína antifúngica (AFP, de sus siglas en inglés) (Nakaya *et al.*, 1990; Olson and Goerner, 1965). Esta proteína es capaz de inhibir el crecimiento y la germinación de conidias de *B. cinérea* en geranios (Moreno *et al.*, 2003). Además es efectiva contra *Fusarium moniliforme*, el anamorfo de *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) y *Phytophthora infestans* (Vila *et al.*, 2001).

La RSI y RSA activadas por *Trichoderma*

Trichoderma spp. se han descrito como hongos promotores del crecimiento (PGPF), ya que, son capaces de colonizar las raíces de las plantas e inducir resistencia local y sistémica contra hongos y bacterias patógenas (De Meyer *et al.*, 1998; Donzelli, y Harman, 2000; Salas–Marina *et al.*, 2011). Durante la interacción *Trichoderma*-planta se producen diferentes moléculas secretadas por el hongo denominados “*elicitores*”, que disparan la resistencia sistémica de las plantas a los patógenos (Harman *et al.*, 2004a; Woo *et al.*, 2004; Woo y Lorito, 2007).

Para *Trichoderma* spp. se han descrito como inductores de la RSI proteínas con actividad enzimática como las xilanasas (Lotan y Fluhr, 1990); genes *avr*, similares a los que tienen los patógenos avirulentos, o del tipo de transportadores ABC relacionados con la resistencia de *Trichoderma* a moléculas tóxicas que secretan las plantas o los hongos fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004b; Woo *et al.*, 2006); compuestos de bajo peso molecular liberados por el hongo o por productos de las paredes celulares de la planta, generados por la actividad enzimática de *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004b; Woo *et al.*, 2004; Woo and Lorito, 2007). En la actualidad las investigaciones se están centrando en determinar la función de enzimas que degradan la pared celular de las plantas a pesar que la redundancia de este tipo de genes en el genoma de *Trichoderma* dificulta esta tarea (Woo *et al.*, 2006). Algunas de estas

moléculas parecen ser enzimas del tipo xilanasas cuya acción debe inducir la biosíntesis de fitoalexinas y peroxidasas por parte de la planta (Harman *et al.*, 2004b). Celulasas activas o inactivadas por calor son capaces de estimular la ruta del AS o del JA/ET, respectivamente (Martínez *et al.*, 2001), así las enzimas secretadas por *Trichoderma* son usadas como una herramienta para inducir un respuesta RSI en la planta. Se sabe que *Trichoderma* afecta los mecanismos involucrados en la inducción de la RSI mediante un análisis en que utilizaron inhibidores específicos, indican que el JA y el ET están involucrados en la protección conferido por *Trichoderma* spp. contra el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Se encontró que *T. asperellum* (T203) modula la expresión de genes (*Lox1*, *Pal1*, *ETR1*, y *CTR1*) involucrados en la ruta de señalización del jasmonato/etileno en plantas de pepino (Shoresh *et al.*, 2005).

También se ha descrito que *Trichoderma* secreta metabolitos antifungicos llamados peptaiboles (tricolorzianina y harzianina) (Bodo *et al.*, 1985; Rebuffat *et al.*, 1996; Augeven-Bour *et al.*, 1997; Rebuffat *et al.*, 1996). Estos compuestos actúan como activadores de los mecanismos de defensa de la planta contra patógenos además de poseer actividad antimicrobiana (Szekeres *et al.*, 2005; Dejanovic *et al.*, 2006). *Hypocrea atroviridis* produce un elicitor denominado Epl1 (eliciting plant response-like) (Seidl *et al.*, 2006). Por su parte Djonovic *et al.* (2006) identificaron y caracterizaron al ortólogo de Epl1 en *T. virens*, a la cual llamaron proteína Sm-1 (small protein-1). La proteína SM-1 es similar a proteínas de la familia de las cerato-plataninas, es producida y secretada por *T. virens* en etapas tempranas de la interacción con plantas de algodón, sugiriendo que tiene un papel preponderante en la señalización (Djonovic *et al.*, 2006). La proteína SM-1 purificada no presentó actividad enzimática, pero si indujo la resistencia sistémica contra *Colletotrichum* en plantas de algodón. La protección inducida por SM-1 se asoció con la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS de sus siglas en inglés), compuestos fenólicos, sesquiterpenos, fitoalexinas y con un aumento en los niveles de transcritos de genes *PR* asociados a la defensa. Plantas de maíz preinoculadas con cepas mutantes o sobreexpresantes del gen *sm-1* presentan mayor daño o indujeron una mayor resistencia sistémica en las plantas inoculadas con el hongo *Colletotrichum graminicola* comparadas con plantas preinoculadas con la cepa

silvestre de *T. virens* (Djonovic *et al.*, 2007). Datos de nuestro grupo de trabajo mostraron que plántulas inoculadas con cepas de *T. atroviride* y *T. virens* que sobreexpresan al gen *Sm-1* y que posteriormente fueron retadas con *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y *Pseudomonas aeruginosa*, el nivel de daño fue menor comparado con los controles sin *Trichoderma*, los cuales fueron inoculados con cepas silvestres y con la mutantes nulas en este gen. También se ha visto que con estas cepas de *Trichoderma* hay una expresión diferencial de genes involucrados en la síntesis de proteínas (*PR*) y de especies reactivas de Oxígeno (Salas-Marina *et al.*, en preparación; Silva-Flores *et al.*, en preparación).

En el presente trabajo se evaluó, en experimentos diferentes, el efecto de *Trichoderma atroviride* y el efecto de *Aspergillus ustus* en la promoción del crecimiento en *A. thaliana*. Así mismo se evaluó la capacidad de *T. atroviride* y *A. ustus* para producir en medio líquido compuestos tipo hormonas que beneficien a *Arabidopsis thaliana*. Durante la interacción de *Trichoderma-Arabidopsis* se investigó el proceso de colonización de las raíces *A. thaliana* mediante una cepa transformante de *T. atroviride* que expresa la proteína verde fluorescente (GFP de sus siglas en inglés). Además, se evaluó el efecto de *T. atroviride* y de *A. ustus* en la protección de *A. thaliana* contra la bacteria hemibiotrófica *P. syringae* DC3000 (Pst DC3000) y contra el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* ambos considerados agentes fitopatógenos, así como en efecto en la expresión de algunos genes relacionados con los mecanismos de defensa de las planta.

Capítulo I

Resumen

The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*

Para afrontar a los patógenos las plantas han desarrollado complejos mecanismos de defensa. Las fitohormonas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como, en la respuesta sistémica inducida por microorganismos patógenos y benéficos. En el presente trabajo se identificó un aislado del hongo *Aspergillus ustus*, que promueve el crecimiento y desarrollo de *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana*. La inoculación de *A. ustus* en raíces de *A. thaliana* y *S. tuberosum* indujo un incremento en la cantidad de raíces laterales y pelos radiculares. Los ensayos que se llevaron a cabo sobre líneas de *Arabidopsis* para medir la expresión de genes reporteros expresados/reprimidos por auxinas o genes controlados por el ciclo celular (DR5 y *CycB1*) mostraron un incremento en la actividad de GUS cuando se comparo con plántulas en las que se simulo la inoculación. Para determinar la contribución de las fitohormonas en la vía de señalización debido a la inoculación de *A. ustus*, se evaluó la respuesta de mutantes de *Arabidopsis* en la señalización o síntesis de auxinas, etileno citocininas o ácido abscisico. Todas las líneas mutantes inoculadas con *A. ustus* mostraron un incremento en la producción de biomasa, sugiriendo que estos genes no son necesarios para responder al estímulo este hongo o de sus metabolitos. Por otra parte, se demostró que *A. ustus* sintetiza auxinas y giberelinas en medio líquido. Además, *A. ustus* induce la resistencia sistémica contra el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* y la bacteria hemibotrofa *Pseudomonas syringae* DC3000, probablemente a través de la inducción de la expresión, de genes relacionados con el Ácido Salicílico, Ácido Jasmónico/Etileno y la síntesis de Camalexina en *Arabiopsis*.

Discusión capítulo I

Las rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR de sus siglas en inglés) se han estudiado ampliamente por su capacidad para inducir la producción de biomasa e inducir la resistencia sistémica en las plantas (RSI) (Lucero *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009). Mientras que los hongos promotores del crecimiento (PGPF de sus siglas en inglés) han sido menos estudiados.

El hongo *Aspergillus ustus* es un hongo endófito, ya que, se ha aislado de pastos *Bouteloua eriopoda* y del arbusto *Atriplex canescens*. Barrow y Osuna (2002) describen que este hongo ayuda a *A. canescens* en la absorción de fósforo. En un cultivo axénico de papa se aisló e identificó por secuenciación de ITS un hongo denominado *A. ustus* que es capaz de promover el crecimiento de plantas de papa. Para entender mejor el efecto de *A. ustus* en la promoción del crecimiento se inocularon plantas de *Arabidopsis* con este hongo obteniendo resultados similares a lo que reporta Barrow y Osuna en *A. canescens* (Pursh) Nutt, aumento en las raíces y en la biomasa. Los resultados del presente trabajo demostró que no es necesario que *A. ustus* colonice la raíz de *Arabidopsis* para inducir la promoción del crecimiento. La inoculación de *Arabidopsis* con *A. ustus* afecta el sistema radicular al inhibir el crecimiento de la raíz principal e incrementa el número de raíces laterales, el crecimiento de raíces laterales y la longitud de los pelos radiculares. Este efecto provocado por *A. ustus* en *Arabidopsis* sugiere la acción de fitohormonas. En este sentido se ha reportado que muchos microorganismos producen y secretan fitohormonas al medio (Costacurta y Vanderleyden. 1995).

Por lo anterior *A. ustus* se podría clasificar como un hongo endófito de algunos pastos y arbustos y como un PGPF en plantas de papa y *A. thaliana*.

Se sabe que las fitohormonas tienen un papel fundamental en el ciclo celular de las plantas principalmente a nivel transcripcional (Stals e Inzé. 2001). Las Citocininas son fitohormonas que principalmente se producen en las raíces y en los primordios, juegan una importante función en la regulación del ciclo celular, crecimiento y desarrollo de las plantas. Para investigar a nivel transcripcional el efecto causado al inocular a *A. ustus* en plantas de *Arabidopsis*, se utilizó una línea de *A. thaliana* *CycB1;1::GUS* que indica la

actividad en el ciclo celular en la fase G2/M mediante el reportero GUS. (Ferreira *et al.*, 1994). Al inocular esta línea de *A. thaliana* con el hongo *A. ustus*, se observó un incremento en la actividad de *CycB1* en las puntas de las raíces y en los meristemas radiculares, similar a la producida por la aplicación de auxinas exógenas (Himanen, *et al.*, 2002). Adicionalmente, se encontró que al inocular, *A. ustus*, en cepas mutantes de *Arabidopsis* en los receptores de citocininas (*ahk2.2* y *ahk3.3*), estas fueron capaces de recuperar el fenotipo silvestre. Basados en estos resultados se puede concluir que *A. ustus* promueve la división celular en *Arabidopsis* y que las proteínas codificadas por los genes *ahk2-2* y *ahk3-3* no son necesarias para responder a las moléculas secretas por *A. ustus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo, con la líneas transgénica de *A. thaliana DR5::GUS*, muestran una ligera inducción de la expresión de *DR5::GUS*, en las raíces primarias, lo que sugiere que *A. ustus* produce moléculas tipo auxina. De hecho se observo un ligero incremento en la expresión de *DR5::GUS* en los primordios de las raíces laterales, lo que sugiere que este efecto se debe a la acción de una auxina endógena. Hongos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Penicillium* y *Trichoderma* son capaces de producir AIA (Bent, 2006; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Sin embargo, la producción de AIA no se ha reportado para hongos del género *Aspergillus*. En este trabajo se demostró que *A. ustus* produce AIA y que este compuesto puede ser empleado para promover el crecimiento en plantas de papa y de *Arabidopsis*.

Las GAs constituyen el mayor grupo de fitohormonas producidas por las plantas y por los microorganismos (Tsavkelova *et al.*, 2006). Estas moléculas ocasionan el crecimiento del tallo y las hojas debido a que estimulan la división y el alargamiento celular (Tsavkelova *et al.*, 2006). También se sabe que las GA, auxinas y el etileno interactúan para promover en crecimiento de plántulas por el efecto de la luz (Shani *et al.*, 2006). Las GAs, CK y las auxinas están involucradas en el desarrollo del meristemo apical de la raíz y del meristemo del brote (Tsavkelova *et al.*, 2006). En el presente trabajo se encontró que *A. ustus* produce moléculas tipo Indoles y GAs en medio líquido, lo que podría explicar el por qué el grupo de mutantes de *Arabidopsis* inoculadas con este hongo recuperan el fenotipo. Probablemente el efecto observado en las

mutantes del etileno *etr1-3*, *eir1-1*, del ácido abscísico *abi 4-1* y las mutantes resistentes a auxinas *Aux1-7*, *Axr4-1*, se deba a la acción de GAs y AIA actuando juntos o por separado. La diferencia en la respuesta de las mutantes puede deberse al fondo genético y a la posible combinación entre las hormonas para regular el crecimiento y desarrollo en presencia del hongo. Para entender mejor el efecto de *A. ustus* en el crecimiento de la planta, se debe investigar si produce CK y/o Etileno.

Los PGPF pueden utilizar más de un mecanismo para el control de patógenos de plantas incluida la competencia, la antibiosis, la depredación, el micoparasitismo y activación de la resistencia sistémica inducida (Harman *et al.*, 2004a; Hossain *et al.*, 2007). Durante la interacción planta-microorganismo las fitohormonas juegan un papel importante tanto en el crecimiento, como en la defensa de la planta, estas hormonas pueden ser sintetizadas por las plantas o por microorganismos asociados a ellas. El papel del AS, JA y el ET en la defensa de la planta ha sido ampliamente establecido (Dong, 2001; Kazan y Manners, 2009; Pieterse *et al.*, 2009). Las plantas activan el sistema de defensa dependiendo del estilo de vida del patógeno, es decir si el patógeno es biotrófico o hemibiotrófico se induce por medio del AS, mientras que si es necrotrofico se activa por medio de la vía JA/ET. Por otro lado, se ha demostrado que un cross-talk entre estas vías optimizan la respuesta contra un solo patógeno (Spoel *et al.*, 2003; 2007).

En el presente trabajo se demostró que plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *A. ustus* fueron más resistentes al hongo necrotrofico *B. cinerea* y a la bacteria hemibiotrofica *P. syringae* tomato (*Pst* DC3000). Siendo más relevante la protección conferida contra éste último. También se demostró que el PGPF *A. ustus* induce la expresión simultánea de genes relacionados a la AS y JA/ET, vías de estrés oxidativo y de genes involucrados en la síntesis de camalexina, Aun cuando muchos reportes describen un antagonismo entre AS y la señalización dependiente de JA/ET también se han descrito interacciones sinérgicas entre ellas (Pieterse *et al.*, 2009; Spoel *et al.*, 2003). Estos resultados podrían explicar el incremento en la resistencia sistémica inducida contra *Pst* DC300 y *B. cinerea*. Por consiguiente *A. ustus* podría producir y secretar al medio este tipo de moléculas que activan la resistencia sistémica en *Arabidopsis* contra fitopatogenos.

En conclusión, *A. ustus* es capaz de promover el crecimiento de *Arabidopsis* y de restituir el fenotipo de un grupo de mutantes afectadas en diferentes vías de respuesta a hormonas. Por lo tanto, los productos de los genes silvestres no se requieren para responder a las moléculas secretadas por *A. ustus*. Además, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *A. ustus* produce en medio de cultivo líquido compuestos tipo indol y giberelinas que pueden tener un efecto positivo en *Arabidopsis*. *A. ustus* induce la expresión de genes relacionados con JA/ET, AS y la síntesis de camalexina aun sin colonizar la las raíces de *Arabidopsis*. Lo anterior permite plantear la hipótesis de que el solapamiento en la expresión de genes relacionados con SA, JA/ET, y la síntesis de camalexina son los responsables de la resistencia sistémica contra fitopatógenos hemibiotróficos y necrotrofos en *Arabidopsis*.

Capítulo II

Resumen

Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways.

Trichoderma spp. es un hongo del suelo empleado como agente de control biológico de enfermedades de plantas, por su capacidad de producir antibióticos, de micoparasitar y de inducir el sistema de defensa de las plantas. En el presente trabajo se estudió la capacidad de *Trichoderma atroviride* para colonizar la raíz de *Arabidopsis thaliana* y el efecto del hongo en el crecimiento y desarrollo de la planta. Además, se determinó que *T. atroviride* produce compuestos tipo indol en medio de cultivo líquido. Estos resultados sugieren que los compuestos tipo indol producidos por *T. atroviride* estimulan en el crecimiento en la planta. También, se evaluó si la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *T. atroviride* puede inducir la protección contra patógenos foliares. Para determinar la vía de señalización involucrada en la Resistencia Sistémica Inducida por *T. atroviride*, se evaluó el perfil en la expresión de un grupo de genes relacionados con las vías del Acido Salicílico, Acido Jasmonico/Etileno, estrés oxidativo y camalexina en *Arabidopsis*. *Trichoderma* indujo la expresión sobrelapada de genes de la vía del SA y JA/ET, y de genes involucrados en la síntesis de camalexina y de estrés oxidativo a nivel local y sistémico. Este es el primer reporte donde la colonización de la raíz de *Arabidopsis* por *T. atroviride* induce la expresión simultanea de genes relacionados con las vías del SA y JA/ET para conferir resistencia contra patógenos hemibiotróficos y necrotrofos. El efecto benéfico inducido por la inoculación de la raíz de *Arabidopsis* con *T. atroviride* y la inducción del sistema de defensa de la planta sugiere un dialogo molecular entre estos organismos.

Discusión capítulo II

En los ecosistemas terrestres, ocurren una gran diversidad de relaciones e interacciones como el parasitismo, la competencia, el comensalismo y el mutualismo. De estas en el comensalismo una especie se beneficia, mientras que, en el mutualismo ambas especies, se benefician (Campbell, 1995). Se sabe que algunas bacterias son capaces de estimular el crecimiento de las plantas, a estas bacterias se les ha llamado rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) (Bent, 2006). Las PGPR estimulan el crecimiento de las plantas mejorando la nutrición, suprimiendo enfermedades o produciendo hormonas como las auxinas, CK, GAs y compuestos orgánicos volátiles como el etileno (Costacurta y Vanderleyden 1995). Algunos hongos también tienen la capacidad de promover el crecimiento y el desarrollo vegetal, a estos, se les llama hongos promotores del crecimiento (PGPF, de sus siglas en inglés). Algunos PGPF pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Phoma* y *Trichoderma*, (Bent, 2006; Harman *et al.*, 2004a). Los hongos pueden causar un efecto positivo en el crecimiento y la sanidad de las plantas, ya sea por mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos indirectos contemplan la producción de antibióticos y sideróforos. En los directos se consideran la solubilización de minerales (Bent, 2006; Harman *et al.*, 2004a).

En este sentido se ha demostrado que los PGPF inducen la protección sistémica contra fitopatógenos (Harman *et al.*, 2004a, Jefferson *et al.*, 1987) se sabe también que algunas fitohormonas como el AS, el JA y el ET son importantes en la inducción de la respuesta de defensa (Kazan y Manners, 2009). Además, recientemente se ha descrito que moléculas como el ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BS), giberelinas (GAs) y auxinas están involucradas en la respuesta de defensa, (Pieterse *et al.*, 2009). Con respecto a la producción de AIA o compuestos tipo indol muchos de los trabajos se han enfocado en las rizobacterias y son pocos los trabajos enfocados a estudiar la producción de estos compuestos por hongos benéficos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se demostró que plántulas de *A. thaliana* inoculadas en la raíz con *T. atroviride*, presentan un incremento en la biomasa comparadas con las no inoculadas. Lo anterior hace suponer que el incremento en la

biomasa depende de la colonización de la raíz por *T. atroviride*. Por lo anterior se ha sugerido que la promoción del crecimiento puede deberse a la colonización de la raíz y a la capacidad de *Trichoderma* spp. para facilitar la disponibilidad de nutrimentos y a la secreción de fitohormonas por estos hongos (Harman *et al.*, 2004a; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010).

Para determinar si *T. atroviride* es capaz de colonizar a *Arabidopsis*, plántulas de *Arabidopsis* fueron co-incubadas *in vitro* con *T. atroviride* por 48 y 72 h, posteriormente, las raíces fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio y se colocaron en cajas de petri con medio fresco, observado la emergencia de hifas de *T. atroviride* de las raíces de la planta. Una vez comprobado la capacidad del hongo para colonizar la raíz de la planta, se generó una cepa transformante de *T. atroviride* que expresó a la proteína GFP. Se observó que durante la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*, el hongo es capaz de colonizar el espacio intercelular de la epidermis de las raíces de la planta, formando estructuras tipo apresorio. Lo anterior es congruente con lo reportado en otros trabajos realizados con *T. harzianum*, en los que se observó que este hongo crece e invade los espacios intracelulares en raíces de pepino y tomate. También se demostró que durante esta interacción *T. harzianum* inducía la respuesta sistémica en las plantas (Yedidia *et al.*, 1999; Chacon *et al.*, 2007). La colonización de la raíces de *A. thaliana*, por *T. atroviride*, dio como resultado un incremento en la biomasa de la planta; esta observación se confirmó, por que, al poner tejido foliar en cajas con medio MS no se recuperó el hongo, es decir, el hongo no crece en la parte foliar de la planta. Esto demuestra que el efecto de *Trichoderma* en la estimulación del crecimiento de plántulas de *A. thaliana* es sistémico.

Por otra parte, se demostró que *T. atroviride* es capaz de sintetizar *in vitro* compuestos tipo indol, los cuales podrían estar involucrados en la promoción del crecimiento en condiciones de campo e invernadero. Estos resultados mostraron que *T. atroviride* es capaz colonizar las raíces de *Arabidopsis* y promover el crecimiento sistémicamente, posiblemente al proporcionar a la planta fitohormonas como se ha descrito para otras especies de *Trichoderma* (Yedidia *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004b; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010).

La inducción de los sistemas de defensa de la plantas mediada por hongos antagonistas ha sido bien documentada. Tanto en plantas mocontiledoneas como dicotiledoneas se aprecia un incremento en la resistencia ante el ataque de patógenos cuando son preinoculadas con *Trichoderma* (De Meyer *et al.*, 1998; Yedidia *et al.*, 1999; Hanson and Howell, 2004; Harman *et al.*, 2004a). En ese sentido De Meyer *et al.*, (1998) demostraron que *T. harzianum* T-39 inoculado en raíces de frijol reduce considerablemente el daño causado por *B. cinerea*. Yedidia *et al.* (2003) determinaron que al inocular a *T. asperellum* T-203 en raíces de pepino y retar las plantas con *P. syringae* pv *lachrymans*, se observó una considerable reducción de plantas enfermas y mencionan que se produjeron compuestos antifungicos en las hojas. Por su parte Hajieghrari *et al.* (2008) midieron la capacidad de algunas cepas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* (AG4 y AG5), *Macrophomina phaseoli* y *Phytophthora cacturum* encontrando que había inhibición del crecimiento de estos patógenos por efecto de compuestos volátiles o por contacto con *T. hamatum* T61. En ese mismo trabajo se evaluó la capacidad de *T. virens* T52, como agente de control biológico de *Rhizoctonia solani* AG5, con buenos resultados.

En el presente trabajo se demostró que *T. atroviride* es capaz de inducir protección en *Arabidopsis* contra el patógeno hemibiotrófico *Pseudomonas syringae* (*Pst* DC3000) y contra el hongo necrotrofico *B. cinérea*. La resistencia sistémica inducida por *T atroviride* en *Arabidopsis* fue mayor cuando se inoculó con el hemibiotrófico *Pst* DC3000, respecto a la obtenida con el necrotrofico *B cinérea*. En este patosistema los patógenos se inocularon en las hojas, lo cual permitió mantener espacialmente separado a *T. atroviride* del patógeno y garantizar que el efecto en la disminución del daño en *Arabidopsis* se debía a la estimulación de la respuesta sistémica de la planta y no por micoparasitismo o antibiosis. Aunado a esto, la RSI estimulada por *T. atroviride* induce en *Arabidopsis* la expresión simultanea de genes dependientes las vías del de SA y JA/ET, estrés oxidativo y la síntesis de genes relacionados con la síntesis de camalexina, tanto local como sistemicamente para detener el crecimiento algunos patógenos. Se ha descrito que las rutas del SA y JA/ET son mutuamente antagónicas, sin embargo, también se han reportado evidencias

de interacciones sinérgicas entre estas vías, lo cual sugiere que la vía de señalización que se activa en la planta depende de la naturaleza del patógeno, así como del modo de patogenicidad (Adie, 2007).

Recientemente, se evaluó en plantas de tabaco y de *Arabidopsis* el efecto del cotratamiento con diferentes concentraciones de SA y JA, y cuando estos se aplicaron a bajas concentraciones (10-100 mM) había un incremento sinérgico transitorio, en la expresión de genes asociados a la ruta del JA/ET (*PDF1.2* y *Thi1.2*) o SA (*PR-1a*). Sin embargo, cuando se evaluaron tiempos más prolongados o concentraciones altas de estas fitohormonas, se observó un efecto antagónico (Mur *et al.*, 2006). Una probable explicación de este comportamiento en nuestros resultados, es que durante la colonización de las raíces de *Arabidopsis*, *T. atroviride* induce la ruta de SA y la ruta de JA/ET al mismo tiempo. Posteriormente el aumento en el SA suprime parcialmente la vía del JA/ET permitiéndole a la planta resistir de mejor manera el ataque del patógeno biotrófico que el del necrotrófico. Mediante un análisis farmacológico utilizando inhibidores específicos de las vías de JA/ET durante la interacción de *T. asperellum*-pepino se demostró que estos compuestos y estas rutas de señalización están involucradas en el efecto protector conferido por *T. asperellum* a plántulas de pepino contra *P. syringae* pv *lachrymans*. Al analizar la acumulación de AS en raíces y hojas de pepino tratado con *T. asperellum* no se observó diferencia cuando se compararon las plantas inoculadas con las no inoculadas. Por otra parte, al hacer el análisis de la expresión de genes regulados JA/ET se observó que *T. asperellum* es capaz de modular la expresión local y sistémica de estos genes en pepino (Shoresh *et al.*, 2005). La resistencia inducida por *T. harzianum* contra *B. cinerea* depende de la vía del JA/ET hecho que queda manifiesto cuando se emplean mutantes de *Arabidopsis* dañadas en la vía de transducción de estas señales (Korolev *et al.*, 2008). Hoy en día se sabe que la vía de defensa inducida por *T. asperellum* y la de bacteria benéfica *Pseudomonas fluorescens* WCS417r son similares y ambas son independientes de la vía del SA, y requieren de NPR1 y de MYB72 (Segarra *et al.*, 2009).

Para estudiar la posible ruta de transducción de señales involucradas en la inducción de la respuesta sistémica de *Arabidopsis* contra patógenos con diferente estilo de vida, en el presente trabajo se analizó la expresión de genes

involucrados en la RSA, RSI, estrés oxidativo y camalexina a las 72 y 96 h después que se inoculó *Arabidopsis* con *Trichoderma atroviride*. La mayoría de los genes analizados fueron inducidos por *T. atroviride* de manera local y sistémica alcanzando su máxima expresión en hojas y raíces 96 h después de inocularlos, ya que, se observó un incremento en la expresión de genes *PR*. La β -1-3-glucanasa codifica (*PR-2*) es un gen altamente inducible en hojas como respuesta a la inoculación con *T. atroviride*. Algunos han demostrado que la colonización de las raíces por *Trichoderma* incrementa el nivel de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas, incluidas peroxidasas, quitinasas, β -1-3-glucanasa (Howell *et al.*, 2000; Yedidia *et al.*, 1999; 2003; Harman *et al.*, 2004a). Estos resultados sugieren que las proteínas *PR* pueden estar involucrados en la respuesta sistémica para suprimir la enfermedad en *Arabidopsis* cuando se inocula con *T. atoviridae*.

En este trabajo los niveles en la expresión de la peroxidasa clase III (*ATPCA*) que codifica para genes involucrados en la generación de peróxido de hidrógeno y en la defensa contra patógenos, en las raíces, no se vio afectada de manera significativa a 72 h, sin embargo aumento a las 96 h. Cuando se midió la expresión en hojas a las 72 h postinoculación se observó un incremento de hasta tres veces. La acumulación de peroxidasas se da como respuesta a la generación de ROS causada por el ataque por patógenos, así como, también el aumento de la actividad enzimática en las hojas, esto, sugiere una respuesta sistémica debido a la presencia de *Trichoderma* en la rizosfera. El nivel de expresión de *JA/ET* y de los genes *PDF2.1* y *LOX-1* fue diferente en ambos tiempos. Hay una sobreexpresión de *PDF1.2*, tanto en raíces como en hojas, 96 h después de que se inoculo con *Trichoderma*, mientras que la expresión de *LOX-1* no sufrió cambios significativos en raíces, sin embargo en hojas se incremento cuatro veces el nivel de expresión. El análisis de la expresión del gen *PAD3*, el cual codifica para una enzima involucrada en el paso final de la biosíntesis de camalexina, mostró una sobreexpresión en raíces y hojas de *Arabidopsis* tratadas con *T. atroviride*. La camalexina es una fitoalexina con propiedades antimicrobiales. Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular, producidos por las plantas como respuesta al ataque de patógenos (Paxton, 1981). De igual manera, se sabe que *T. asperellum* es capaz de activar diversas rutas metabólicas en pepino causando una

acumulación sistémica de fitoalexinas en esta planta (Yedidia *et al.*, 1999). Adicionalmente, se ha demostrado que mutantes en *PAD* de *Arabidopsis* pierden la capacidad de restringir el crecimiento de bacterias patógenas (Glazebrook and Ausubel, 1994).

Resumiendo, la inoculación de las raíces de *Arabidopsis* con *T. atroviride* promueve sistémicamente el crecimiento y desarrollo de plántulas de *Arabidopsis* e inhibió sistémicamente el daño causado por *P. syringae* DC3000 y *B. cinérea*. Adicionalmente, se demostró que *T. atroviride* produce compuestos tipo indol que pueden llegar a tener un efecto en la estimulación del crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*. La disminución del daño en *Arabidopsis* parece estar asociada con la acumulación de transcritos de genes relacionados con las vías del SA, JA/ET y de genes involucrados con la defensa, en el estrés oxidativo, así como, en la síntesis y acumulación de fitoalexinas como la camalexina en *Arabidopsis*.

Conclusiones

- *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus ustus* promueven el crecimiento de *Arabidopsis* y en su caso *A. ustus* restituye el fenotipo en un grupo de mutantes afectadas en diferentes vías de respuesta a hormonas, además estimula el desarrollo e incremento en la biomasa de *Solanum tuberosum*
- *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus ustus* producen en medio líquido compuestos tipo indoles, además, en el caso de *A. ustus* produce giberelinas, que pueden afectar positivamente el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* y *Solanum tuberosum*.
- *Trichoderma atroviride* y *Aspergillus ustus* inducen la expresión de genes relacionados con las vías de señalización del AS, JA/ET, y la síntesis de camalexina. En el caso de *A. ustus*, aún, sin que el hongo colonice las raíces de *Arabidopsis*.

Bibliografía

Adie, B., Pérez-Peréz A., Pérez-Peréz, J., Godoy, M., Sánchez-Serrano, M., Schmelz, J.J. y Solano, R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting A biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The plant Cell*. 19, 1665-1681.

Augeven-Bour, I., Rebuffat, S., Auvin, C., Goulard, C., Prigent, Y., and Bodo, B. (1997). Chem Inform Abstract: Harzianin HB I, an 11-Residue Peptaibol from *Trichoderma harzianum*: Isolation, Sequence, Solution Synthesis and Membrane Activity. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1587–1594.

Benítez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C., and Codon, A. (2004). Bioncontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7(4) 249-260.

Bent, E. (2006). Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF), pp. 225-258. In S. Tuzun and E. Bent (eds.). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer-Verlag, New York.

Bigirimana, J., De Meyer, G., Poppe, J., Elad, Y., and Hofte, M. (1997). Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*. 62,1001-1007.

Bodo, B., Rebuffat, S., El Hajji, M. and Davoust, D. (1985). Structure of trichorzianine A, an antifungal peptide from *Trichoderma harzianum*. *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 6011-6017.

Buysens, S., K. Heungens, J. Poppe, M. Höfte .1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 2, 865–871.

Campbell, N. (1995). Prokaryotes and the origins of metabolic diversity. Chapter 27. In *Biology*, 5th edn. Brady, E.B. (ed.). Redwood City, CA, USA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, pp. 502–519.

- Chacon, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A., Delgado-Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* 10, 19-27.
- Chet, I., Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 48, 37–43.
- Chet, I, Inbar, J., Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships.* Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184
- Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X.N., Parker, J.E. (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially EDS1-dependent in *cpr5*. *Plant J* 26,409–420
- Contreras-Cornejo, H.A., Macias, R.L., Cortés, P.C, and Lopez-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: 2579-1592.
- Costacurta, A, and Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 21, 1-18.
- Dangl, J. L. and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defense response to infection. *Nature* 411, 826-833.
- De Meyer, G., Höfte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology.* 87,, 588–593.
- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., and Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104,279-286.
- De Meyer, G., Audenaert, K., Höfte, M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in plant salicylic

acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Europ. J. Plant Pathol.* 105,513–517.

Dicke, M. and Hilker, M. (2003). Induced plant defences: from molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl. Ecol.* 4, 3-14

Djonovic´, S., Pozo, M.J., Dangott, L.J., Howell, C.R., Kenerley, C.M., (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant–Microbe Interaction.* 19, 838–853.

Djonovic S, Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Horndeski, M., Weist, A., Kenerley, C.M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145:875-89.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. (2003). Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22,107–149.

Dong, X. (2001). Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4,309-314.

Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C. and Lemanceau, P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Eur. J. Plant. Pathol.* 104, 903-910.

Durrant, W.E. and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42,185–209.

Estrada-Hernández, M.G., Valenzuela-Soto, J.H., Ibarra-Laclette, E. And Délano-Frier, J.P. (2009). Differential gene expression in Whitefly *Bemisia tabaci* infested tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at progressing developmental stages of the insect's life cycle. *Physiol. Plant.* 137, 44-60.

Ferreira, P.C., Hemerly, A., van Montagu, M. and Inzé, D. (1994). Control of cell proliferation during plant development. *Plant Mol. Biol.* 26:1289-303.

Flor, H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust its genetics and other implications. *Phytopathology*. 45, 680–685.

Garrett, S.D. (1965). Toward biological control of soilborne plant pathogens. In: Baker, KF, Snyder, WC, eds. *Ecology of Soil-borne Plant Pathogens*. Berkeley, CA, USA: University of California Press.

Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology* 20,338-343.

Glazebrook, J. and Ausubel, F.M. (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91,8955-8959.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41,109–117.

Goldman, G.H., Hayes, C. and Harman, G.E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends Biotechnol.* 12,478-482.

Graham, P.H. and Vance, C.P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*. 65, 93–106.

Hajjegrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M.R., and Davari, M. (2008). Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*. 7:8, 967-972

Hamayun, M., Afzal Khan, S., Iqbal, I., Ahmad, B., and In-Jung Lee. (2010). Isolation of a gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and growth promotion of crown daisy (*Chrysanthemum coronarium*) *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1), 202–207.

Harman, G.E., Kubicek, C.P. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, 278 p.

Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 84, 377–393.

- Harman, G.E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96, 190–194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, LL. and Lorito, M. (2004a) *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1) 43-56.
- Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A. and Chen, J. (2004b). Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94,147-153.
- Heitz, T., Bergey, D.R., Ryan, C.A. (1997). A gene encoding a chloroplast targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*. 114,1085–1093.
- Hellwig, V., Grothe T., Mayer-Bartschmid, A., Endermann, R., Geschke, F.U., Henkel, T., Stadler, M.A. (2002). Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *J. Antibiot*. 55,881-892.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida, E.J., Inze,D., and Beeckman, T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. 14, 2339-2351.
- Hoffland, E., Pieterse, C.M.J., Bik, L. and Van Pelt, J.A. (1995). Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 46, 309–320.
- Hossain, M.D., Suzuki T, Fujita M. (2007). A preliminary approach to identify the physiological substrates of pumpkin glutathione S-transferase through inhibition studies. *Acta Hort*. 731, 217-222.
- Howell, C. R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. & Puckhaber, L.S. (2000). Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. 90, 248–252.

Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolutions of current concepts. *Plant Disease*, 87(1) 4-10.

Idriss, E.E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T. and Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*. 148, 2097–2109.

Jefferson, A.R., Kavanagh, A.T. and Bevan, W.M. (1987). GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901-3907.

Kazan, K. and Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: Auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 14, 373-382.

Keen, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Genet.* 24: 447-463

Kessler, A. and Baldwin, I.T. (2002). Plant responses to insect. Herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 299-328.

Kloepper, J.W. (1992). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Ed. F. B. Metting, Jr. pp. 255–274. Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Korolev, N., Rav David, D., Elad, Y. (2008). The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma* induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl*. 53:667.

Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* 83, 11–23.

Kunkel, B. N., and Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:325-331.

- Laudert, D., Weiler, E.W. (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* 15,675–684.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell.* 121, 567–577.
- Loake, G. and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology.* 10, 466-472.
- Lorito, M. (1998). Chitinolytic enzymes and their genes. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 2. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 73–99.
- Lorito, M., Woo, S.L., Scala, F. (2004). Le biotecnologie utili alla difesa sostenibile delle piante: i funghi. *Agroindustria.* 3, 181–195.
- Lotan, T; Fluhr, R. (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in Tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiology*, 93,811-817.
- Lucero, M., Barrow, J.R., Osuna, P., Reyes, I. (2008). A cryptic microbial community persists within micropropagated *Bouteloua eriopoda* (Torr.) Torr. *Cultures Plant Science.* 174,570–575.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L., Bloemberg, G.V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology.* 39, 461–490.
- Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., and Roldán, A. (2010). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology* 100, 682-688.
- Moreno, A.B., Martínez del Pozo, A., Borja, M., and San Segundo, B. (2003). Activity of the Antifungal Protein from *Aspergillus giganteus* Against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology.* 93:11, 1344-1353.

- Morita, S., Azuma, M., Aoba, T., Satou, H., Narisawa, K. and Hashiba, T. (2003). Induced systemic resistance of Chinese cabbage to bacterial leaf spot and *Alternaria* leaf spot by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. J. Gen. Plant Pathol. 69, 71–75.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Wasternack, C. (2006). The outcomes of *concentration*-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. 140, 249–262.
- Mussig, C, Shine, G.H, Altman, T. (2003). Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 133, 1261-1271.
- Nakaya, K., Omata, K., Okahashi, I., Nakamura, Y., Kolkenbrock, H .and Ulbrich, N. (1990). Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. Eur. J. Biochem. 193,31-38.
- Narisawa, K., Ohki, T. and Hashiba, T. (2000). Suppression of club root and *Verticillium* yellows in Chinese cabbage in the field by the endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. Plant Pathol. 49, 141–146.
- Narisawa, K., Shimura, M., Usuki, F., Fukuhara, S. and Hashiba, T. (2005). Effects of environmental conditions on the biological control of clubroot in Chinese cabbage by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora*. Plant Dis. 89, 285–290.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A., Lynch, J.M. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. Journal of Applied Microbiology. 88, 161–169.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C. (2003). Loss of a Callose Synthase Results in Salicylic Acid-Dependent Disease Resistance. Science. 301, 969-972.

Olson, B. H., and Goerner, G.L. (1965). α -Sarcin, a new antitumour agent: Isolation, purification, chemical composition, and identity of a new amino acid. *Appl. Microbiol.* 13:314-321.

Paparu, P., Dubois, T., Coyne, D., Viljoen, A. (2007). Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 71,149-157.

Paulitz, T.C. (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. En *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pest and diseases.* Baker, R.R. y Dub (eds) Alan R. New York EE. UU. Pp 713-724

Paxton, J.D. (1981). Phytoalexins-A working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101, 106–109.

Peña-Cortes, H. and Willimitzer, L. (1995). The role of hormones in gene activation in response to wounding. Pp. 395-414 in: P.J. Davis (ed) *Plant hormones.* Kluwer Academic publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.

Pieterse, J.M.C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308-316.

Pozo, M.J., Azcón-Aguilar, C. (2007). Unravelling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology.* 10, 393-398.

Rebuffat, S., Hlimi, S., Prigent, Y., Goulard, C., Bodo, B. (1996). Isolation and structural elucidation of the 11-residue peptaibol antibiotic, harzianin HK VI. *J. Chem. Soc., Perkin trans.* 16, 2021-2027.

Roberti, R., Badiali, F., Pisi, A., Veronesi, A., Pancaldi, D., Cesari, A. (2006). Sensitivity of *Clonostachys rosea* and *Trichoderma* spp. as Potential Biocontrol Agents to Pesticides. *Journal of Phytopathology.* 154(2)100–109.

Ross, A.F. (1966). Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology*. 14, 340-358.

Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. and 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". *European Journal of Plant Pathology*. 31(1)15-26.

Schipper, B, Bakker, A.W. and Bakker, P.A.(1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25, 339–358,

Seaman, A. (2003). Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. New York State Integrated Pest Management Program publication 129, 164–167 (New York State Integrated Pest Management Program, New York, 2003.

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I. and Pieterse, C.M. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol.* 11, 90-96.

Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. and Kubicek, Ch.P. (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS Journal*. 273, 4346–4359.

Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., Choi, Y.D.(2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98,4788–4793.

Shoresh, M., Yedidia, I., Chet, I. (2005). Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*. 95, 76-84.

Shoresh, M., Mastouri, F., and Harman, G.E. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*. 48, 21–43.

Siddiqui, I.A., Ali, N.I., Zaki, M.J. and Shaukat, S.S. (2001). Evaluation of *Aspergillus* species for the biocontrol of *Meloidogyne javanica* in mungbean. *Nematologia Mediterranea*. 29, 115–121.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S. and Khan, A. (2004). Differential impact of some *Aspergillus* species on *Meloidogyne javanica* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *Letters in Applied Microbiology*. 39,74-83.

Siddiqui, Z.A. and Futai, K. (2009). Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure. *Pest Manag Sci*. 65,943–948.

Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139–191 *Phytopathology*. 96, 181–185.

Sofo, A., Scopa, A., Manfra, M., De Nisco, M., Tenore, G., Troisi, J., Di Fiori, R, Novellino, E. (2011). *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* X *P. canescens*). *Plant Growth Regul.* Springer. Science Business Media B.V.

Spoel, S., koornneef, A., Laessens, S., Korzelius, J., Van Pelt, J., Mueller, M., Buchala, A., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., and Pieterse, C.M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*. 15, 760-770.

Spoel, S., Johnson, J, and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different life styles. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 104, 8842-18847.

Stals, H. and Inzé, D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* 6,359-364.

Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., Wasternack, C. (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 51,895–911.

Szekeres, A., Leitgeb, B., Kredles, L., Antal, Z., Hatvani, L., *et al.*, (2005). Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 52, 135-168.

Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A, and Netrusov, A.I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42, 117-126.

Van der Fits, L., Zhang, H., Menke, F.L.H., Deneka, M., Memelink, J. (2000). A *Catharanthus roseus* BPF-1 homologue interacts with an elicitor-responsive region of the secondary metabolite biosynthetic gene *Str* and is induced by elicitor via a JA independent signal transduction pathway. *Plant Mol Biol.* 44,675–685.

van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizobacteria. *Annual Review of Phytopathology.* 36, 453–483.

van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology.* 44,135-162.

Van Poecke, R.M.P. and Dicke, M.. (2002). Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *J. Exp. Bot.* 53, 1793–1799.

Vila, L., Lacadena, V., Fontanet, P., Martinez del Pozo, A., San Segundo, B. (2001). A Protein of the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *MPMI.* 14(11) 1327-31.

- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalbertic, E.L., Marra, R., Woo, S.L., Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40, 1–10
- Vinale, F., D'Ambrosio, G., Abadi, K., Scala, F., Marra, R., Turra`, D., Woo, S.L., Lorito, M. (2004). Application of *Trichoderma harzianum* (T22) and *Trichoderma atroviride* (P1) as plant growth promoters, and their compatibility with copper oxychloride. *Journal of Zhejiang University Science*. 30, 2–8.
- Vlot, A.C. Klessig, D.F. and Park, S.W. (2008). Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 436–442.
- Von Dahl, C.C. and Baldwin, I.T. (2007). Deciphering the role of ethylene in plant–herbivore interactions. *J. Plant Growth Regul.* 26, 201–209.
- Woo, S.L., Formisano, E., Fogliano, V., Cosenza, C., Mauro, A., Turra`, D., Soriente, I., Ferraioli, S., Scala, F., Lorito, M. (2004). Factors that contribute to the mycoparasitism stimulus in *Trichoderma atroviride* strain P1. *Journal of Zhejiang University Science*. 30, 421
- Woo, S.L., Lorito, M., (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107–130 (Chapter 6) /<http://www.springer.com/italy/home/life+sci/agriculture?SGWID¼6-10028-22-173712051-detailsPage¼ppmmedia|tocS>
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*. 96, 181–185
- Yadav, J., Verma, J.P. and Tiwari, K.N. (2011). Plant growth promotion activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian Journal of Biological Sciences*. 4(3) 291-299.

Yedidia, I., Benhamou, N. and Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl. Environ. Microbiol. 65(3) 1061-1070.

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

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, K., Benhamou, N., Kapulnik, Y. and Chet, I. (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and the accumulation of phytoalexins. Appl. Environ. Microbiol. 69(12) 7343-53.

Zou, W.X., Tan, R.X. (1999). Advances in plant science, vol 2. China Higher Education Press, Beijing, pp 183–190.

Anexos

Anexo1

The Plant Growth-Promoting Fungus *Aspergillus ustus* Promotes Growth and Induces Resistance Against Different Lifestyle Pathogens in *Arabidopsis thaliana*

Salas-Marina, Miguel Angel^{1†}, Miguel Angel Silva-Flores^{1†}, Mayte Guadalupe Cervantes-Badillo^{1†}, Maria Teresa Rosales-Saavedra¹, Maria Auxiliadora Islas-Osuna², and Sergio Casas-Flores^{1*}

¹División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa San José No. 2055, Colonia Lomas 4a Sección, C. P. 78216, San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

²Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. P. O. Box 1735, Hermosillo, Sonora, 83000, Mexico

Received: January 10, 2011 / Revised: April 18, 2011 / Accepted: April 19, 2011

To deal with pathogens, plants have evolved sophisticated mechanisms including constitutive and induced defense mechanisms. Phytohormones play important roles in plant growth and development, as well as in the systemic response induced by beneficial and pathogen microorganisms. In this work, we identified an *Aspergillus ustus* isolate that promotes growth and induces developmental changes in *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. *A. ustus* inoculation on *A. thaliana* and *S. tuberosum* roots induced an increase in shoot and root growth, and lateral root and root hair numbers. Assays performed on *Arabidopsis* lines to measure reporter gene expression of auxin-induced/repressed or cell cycle controlled genes (*DR5* and *CycB1*, respectively) showed enhanced GUS activity, when compared with mock-inoculated seedlings. To determine the contribution of phytohormone signaling pathways in the effect elicited by *A. ustus*, we evaluated the response of a collection of hormone mutants of *Arabidopsis* defective in auxin, ethylene, cytokinin, or abscisic acid signaling to the inoculation with this fungus. All mutant lines inoculated with *A. ustus* showed increased biomass production, suggesting that these genes are not required to respond to this fungus. Moreover, we demonstrated that *A. ustus* synthesizes auxins and gibberellins in liquid cultures. In addition, *A. ustus* induced systemic resistance against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* and the hemibiotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* DC3000, probably through the induction of the expression of salicylic acid, jasmonic acid/ethylene, and camalexin defense-related genes in *Arabidopsis*.

Keywords: *Aspergillus*, plant growth-promoting fungus, *Arabidopsis*, salicylic acid, jasmonic acid, systemic resistance

In their natural setting, plants have to deal with a whole range of environmental changes that determine plant growth and development. Hormones and many endogenous signals regulate plant growth and development, which in combination with the genetic information determine the plant's shape (development). Auxins and cytokinins (CK) regulate cell division and expansion, lateral-root development, and apical dominance [15, 20, 21, 33]. Gibberellins (GAs) and brassinosteroids (BS) promote germination, stem elongation, and flowering, and regulate photomorphogenesis [44]. Abscisic acid (ABA) is involved in several stress signaling pathways and promotes seed dormancy [2].

Microorganisms interact with plants either beneficially or as pathogens and may influence plant growth and development. Perception of microorganisms by plants is highly coordinated through cellular processes that determine the final outcome of the relationship, ranging from parasitism to mutualism [3, 36]. A number of plant-associated microorganisms have been described to synthesize phytohormones, which are necessary to mediate communication between the plant and microorganisms. Free-living microorganisms are also able to produce phytohormones [6]. It is well known that many bacteria are able to stimulate plant growth through direct or indirect mechanisms; these are called plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) [6]. PGPR increase plant growth by improving mineral nutrition, disease suppression, or phytohormones production, such as auxins, CK, GAs, and volatile organic compounds [11].

Like PGPR, some rhizosphere fungi are able to promote plant growth and development. Fungi described in the

*Corresponding author

Phone: +52 444 8342000; Fax: +52 444 8342010;
E-mail: scasas@ipicyt.edu.mx

[†]These authors contributed equally to this work.

Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways

Miguel Angel Salas-Marina · Miguel Angel Silva-Flores ·
Edith Elena Uresti-Rivera · Ernestina Castro-Longoria ·
Alfredo Herrera-Estrella · Sergio Casas-Flores

Accepted: 30 March 2011
© KNPV 2011

Abstract *Trichoderma* spp. are common soil fungi used as biocontrol agents due to their capacity to produce antibiotics, induce systemic resistance in plants and parasitize phytopathogenic fungi of major agricultural importance. The present study investigated whether colonization of *Arabidopsis thaliana* seedlings by *Trichoderma atroviride* affected plant growth and development. Here it is shown that *T. atroviride* promotes growth in *Arabidopsis*. Moreover, *T. atroviride* produced indole compounds in liquid cultures. These results suggest that indole-

acetic acid-related indoles (IAA-related indoles) produced by *T. atroviride* may have a stimulatory effect on plant growth. In addition, whether colonization of *Arabidopsis* roots by *T. atroviride* can induce systemic protection against foliar pathogens was tested. *Arabidopsis* roots inoculation with *T. atroviride* provided systemic protection to the leaves inoculated with bacterial and fungal pathogens. To investigate the possible pathway involved in the systemic resistance induced by *T. atroviride*, the expression profile of salicylic acid, jasmonic acid/ethylene, oxidative burst and camalexin related genes was assessed in *Arabidopsis*. *T. atroviride* induced an overlapped expression of defence-related genes of SA and JA/ET pathways, and of the gene involved in the synthesis of the antimicrobial phytoalexin, camalexin, both locally and systemically. This is the first report where colonization of *Arabidopsis* roots by *T. atroviride* induces the expression of SA and JA/ET pathways simultaneously to confer resistance against hemibiotrophic and necrotrophic phytopathogens. The beneficial effects induced by the inoculation of *Arabidopsis* roots with *T. atroviride* and the induction of the plant defence system suggest a molecular dialogue between these organisms.

Miguel Angel Salas-Marina and Miguel Angel Silva-Flores contributed equally to this work.

M. A. Salas-Marina · M. A. Silva-Flores ·
E. E. Uresti-Rivera · S. Casas-Flores (✉)
División de Biología Molecular, Instituto Potosino de
Investigación Científica y Tecnológica,
Camino a la Presa San Jose No. 2055, Col.,
Lomas 4a Sección,
San Luis Potosí, SLP 78216, Mexico
e-mail: scasas@ipicyt.edu.mx

E. Castro-Longoria
Departamento de Microbiología, Centro de Investigación
Científica y de Educación Superior de Ensenada,
Ensenada, Baja California, Mexico

A. Herrera-Estrella
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad,
Km. 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León 36821,
Irapuato, Gto, Mexico

Keywords Plant–fungus interaction · Systemic
resistance · Camalexin · PR proteins