

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Papel de la Proteína SM-1 de *Trichoderma virens* en
la inducción del priming en *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis que presenta

José de Jesús Gallardo Negrete

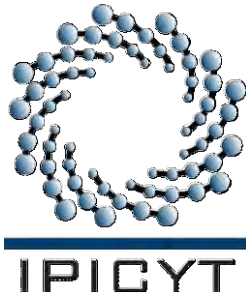
Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

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



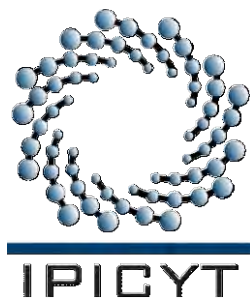
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Papel de la proteína SM-1 de *Trichoderma virens* en la inducción del priming en *Arabidopsis thaliana***" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José de Jesús Gallardo Negrete** y aprobada el **21 de Septiembre de 2012** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Director de la tesis)

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

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



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de genómica funcional y comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No.375875.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto No. 103733 CONACyT-Fondos Sectoriales-SEP otorgado al Dr. J. Sergio Casas Flores.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 104 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de septiembre del año 2012, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José de Jesús Gallardo Negrete

sobre la Tesis intitulada:

Papel de la Proteína SM-1 de Trichoderma virens en la inducción del priming en Arabidopsis thaliana

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. J. Sergio Casas Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de septiembre de 2012.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Con dedicación a mi familia por el apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Casas Flores por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, brindarme su confianza, por la enseñanza, consejos y el apoyo que me brindó durante este tiempo para la realización de este trabajo.

A la Ingeniera Agrónoma Agroecóloga María Isabel Isordia Jasso de La División de Biología Molecular por el apoyo técnico brindado, por sus consejos, ayuda y por la paciencia que me tuvo.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche y a su técnico Rosy por haberme facilitado sus instalaciones para realizar parte de este trabajo.

A mis sinodales, el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por sus comentarios acerca del trabajo.

A Claudia Ramos por su apoyo en la limpieza del material del laboratorio.

Al Laboratorio de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT, donde se realizaron los experimentos de qRT-PCR, entre otras actividades.

A mis compañeros del Laboratorio 8 por su amistad, además por hacer muy amena mi estancia en el IPICYT. Principalmente a las futuras Doctoras, Mayte y Edith, por su ayuda y consejos. Los voy a extrañar.

Especialmente quiero agradecer a mi familia, por el apoyo que siempre me han brindado, por sus consejos, por creer y estar siempre al pendiente de mí. Por aguantarme, y siempre tratar de darme lo mejor. Además, a Tania Muñoz por su apoyo incondicional, su compañía durante todos estos años y siempre estar cuando la necesito. Todos ustedes han sido y serán un gran apoyo para mí.

Gracias!!!

Contenido

Resumen	Xi
Abstract	Xii
Introducción	1
Resultados	
Análisis de la expresión del gen <i>sm-1</i> en cepas sobreexpresantes (OE) y mutantes por delección (KO) del hongo <i>T. virens</i> .	6
Selección de la cepa sobreexpresante del gen <i>sm-1</i> de <i>T. virens</i> a ser empleada en el experimento del “priming”.	6
El gen <i>sm-1</i> de <i>T. virens</i> se induce en presencia de <i>A. thaliana</i> .	7
Efecto de las cepas de <i>T. virens</i> en el “priming” de <i>A. thaliana</i> en cocultivos <i>in-vitro</i> .	11
Discusión	19
Materiales y Métodos	
Organismos y condiciones de cultivo	27
Análisis del transcrito del gen <i>sm-1</i> en las cepas OE y KO de <i>T. virens</i>	28
Análisis de la inducción del gen <i>sm-1</i> en presencia y ausencia de <i>A. thaliana</i>	29
Experimento de “priming” <i>in vitro</i>	29
Bibliografía	31
Material Suplementario	39

Lista de figuras

- Figura 1.** Análisis de los niveles de expresión del transcrito del gen *sm-1* de las cepas WT, OE y KO de *T. virens* Tv29.8. 9
- Figura 2.** Niveles de expresión del gen *sm-1* de *T. virens* Tv28.9 en presencia y ausencia de *A. thaliana* mediante qRT-PCR. 10
- Figura 3.** Papel de la proteína SM-1 en el “priming” del gen marcador de la SAR, *PR-1a*, en plantas de *A. thaliana* preinoculadas en la raíz con cepas WT, OE y KO de *T. virens* y posteriormente infectadas con *B. cinerea* o *Pst* DC3000. 14
- Figura 4.** Papel de la proteína SM-1 en el “priming” del gen marcador de la ISR, *LOX-2*, en plantas de *A. thaliana* preinoculadas en la raíz con las cepas WT, OE y KO de *T. virens*, y posteriormente infectadas con *B. cinerea* o *Pst* DC3000. 17

Material Suplementario

Figura 1. Protección conferida a plantas de <i>A. thaliana</i> por las cepas de <i>T. virens</i> contra el hongo necrotrófico <i>B. cinerea</i> y la bacteria hemibiotrófica <i>Pst</i> DC3000.	40
Tabla S1. Secuencias de los Oligonucleótidos para la cuantificación del gen <i>sm-1</i> de <i>T. virens</i> por qRT-PCR.	42
Tabla S2. Secuencias de los Oligonucleótidos para la cuantificación de los genes <i>PR-1a</i> y <i>LOX-2</i> de <i>A. thaliana</i> por qRT-PCR.	42

Resumen

“Papel de la Proteína SM-1 de *Trichoderma virens* en la inducción del priming en *Arabidopsis thaliana*”

En su ambiente natural, las plantas son susceptibles a ser atacadas por patógenos. Para contrarrestar dicho ataque poseen mecanismos conocidos como resistencia sistémica. Se conocen dos tipos de resistencia sistémica. La primera es la resistencia sistémica adquirida (SAR), mediada por el ácido salicílico y es efectiva contra patógenos biotróficos. El otro tipo es la resistencia sistémica inducida (ISR), mediada por las hormonas jasmonato y etileno, efectiva contra patógenos necrotrofos. No sólo los patógenos incrementan la resistencia sistémica en plantas. La colonización de las raíces por microorganismos benéficos le permite incrementar su capacidad de defensa que resulta en una respuesta rápida y eficiente a una subsecuente infección, éste fenómeno es conocido como “priming”. Los hongos del género *Trichoderma* spp., son utilizados en el control biológico de fitopatógenos y producen una serie de moléculas efectoras involucradas en la inducción de la resistencia sistémica, como la proteína SM-1 de *T. virens*. En este trabajo evaluamos el papel de la proteína SM-1 en el “priming” en plantas de *A. thaliana* al ser inoculadas con cepas sobreexpresantes (OE) y Knockout (KO) del gen *sm-1* y posteriormente retadas con los patógenos necrotrofos y biotróficos, *B. cinerea* y *Pst DC3000*, respectivamente. Los resultados sugieren que el producto del gen *sm-1* está involucrado en el “priming” a través de la vía de señalización ISR.

Palabras clave: Resistencia sistémica, priming, patógenos, *Trichoderma*, efectores.

Abstract

“Role of *Trichoderma virens* SM-1 protein on priming in *Arabidopsis thaliana*”

In their natural settings, plants are susceptible to pathogens attack, however they have the ability to increase the level of basal resistance to prevent infections, this process is called the systemic resistance. Two types of systemic resistance have been described. The systemic acquired resistance (SAR), mediated by the salicylic acid phytohormone, and is effective against biotrophic pathogens. On the other hand, the induced systemic resistance (ISR) is triggered against necrotrophic pathogens, and is mediated by the phytohormones jasmonate and ethylene. Root colonization by beneficial microorganisms allows the plant to enhance its defense capacity that results in a rapid and efficient defense response by a second infection to combat pathogens, this phenomenon is known as priming. *Trichoderma* spp. is used as biocontrol agent against phytopathogens, and produces a set of effectors molecules involved in the induction of the systemic resistance in plants, such as the SM1 protein of *T. virens*. In this work, we evaluated the role of the SM-1 protein on priming of *A. thaliana* when inoculated with WT, *sm-1* gene knockout (KO) and overexpressing (OE) strains and then infected with the foliar biotrophic and necrotrophic pathogens *Pst* DC3000 and *Botrytis cinerea*, respectively. The results suggest that the product of the *sm-1* gen is involved in priming through ISR signal pathway.

Key words: Systemic resistance, pathogens, priming, *Trichoderma*, elicitors.

INTRODUCCIÓN

Las plantas en su ambiente natural son susceptibles a ser afectadas por factores bióticos y abióticos. Entre los factores abióticos están la temperatura, la cantidad de nutrientes, agua y luz. Con respecto a los factores bióticos se contempla el ataque por herbívoros o microorganismos patógenos. Para contrarrestar el efecto negativo de estos factores, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten detectar cambios y así responder mediante alteraciones rápidas y complejas de su fisiología.

Los mecanismos de resistencia pueden ser constitutivos o inducidos, e incluyen barreras físicas y químicas para los primeros, y una inducción bioquímica y fisiológica conocida como resistencia sistémica para la segunda. La resistencia sistémica es efectiva contra una amplia gama de patógenos, y se han visto cambios asociados con el engrosamiento de la pared celular, la síntesis de fitoalexinas (Jackson y Taylor 1996), la producción de proteínas relacionadas a la patogenicidad (PR) (Van Loon *et al.*, 2006), y compuestos volátiles que atraen a depredadores de herbívoros que se alimentan de la planta (Van Poecke y Dicke, 2004). Durante el ataque por patógenos, también se induce una muerte celular programada conocida como reacción hipersensible (HR, de sus siglas en inglés) (Gilchrist, 1998; Grant y Mansfield, 1999; Lamb y Dixon, 1997; Morel y Dangl, 1997).

Dependiendo del tipo de fitopatógeno, la planta produce diferentes hormonas, las cuales servirán como una señal que va a determinar la especificidad de la respuesta (Reymond y Farmer, 1998; De Vos *et al.*, 2005). En este sentido, la

resistencia es ajustada al patógeno atacante para disminuir el costo energético debido a la activación de defensas innecesarias (Pieterse y Dicke, 2007).

En base a los diferentes mecanismos y hormonas involucradas se han descrito dos tipos de resistencia inducida. La primera es la resistencia sistémica adquirida (SAR, de sus siglas en inglés) y se produce en partes alejadas del sitio de infección ocasionada por patógenos inductores de la respuesta hipersensible (Ryals *et al.*, 1996). La SAR está controlada por un mecanismo que depende de la acumulación endógena de Ácido Salicílico (SA, de sus siglas en inglés) (Dong 2004), aunque este tipo de resistencia también puede ser inducido mediante aplicación exógena de SA o sus análogos funcionales como el ácido 2,6-Dichloroisonicotínico (INA) y el Benzotiadiazol (BTH) (Ryals *et al.*, 1996, Sticher *et al.*, 1997, Dempsey *et al.*, 1999). Este tipo de respuesta es efectiva contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos (Ton *et al.*, 2002), como es el caso de la bacteria *Pseudomona syringae*. Esta respuesta desencadena la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) (Ryals *et al.*, Sticher *et al.*, 1997, Dempsey *et al.*, 1999), de las cuales se ha demostrado, que varias poseen actividad antimicrobiana *in vivo* (Van Lon *et al.*, 1999). El otro tipo de respuesta es la resistencia sistémica inducida (ISR, de sus siglas en inglés) y es mediada por las hormonas Ácido Jasmónico (JA, de sus siglas en inglés) y Etileno (ET). Esta respuesta es efectiva contra patógenos necrotrofos como el hongo *Botrytis cinerea* (Glazebrook, 2005).

No sólo los patógenos necrotrofos inducen la ISR, también se ha reportado que algunos agentes biocontroladores (BCAs), colonizan la raíz de la planta e inducen dicha respuesta (De Meyer *et al.*, 1998, Harman *et al.*, 2004). Entre los

microorganismos benéficos que inducen la ISR, se han descrito a las rizobacterias y hongos promotores del crecimiento, (PGPR y PGPF de sus siglas en inglés respectivamente). Como ejemplos de los PGPF encontramos a las micorrizas (Pozo y Azcon-Aguilar, 2007), cepas no patógenicas de *Fusarium oxysporum* (Duijff *et al.*, 1998; Paparu *et al.*, 2007), *Penicillium* spp. (Hossain *et al.*, 2008), *Pythium oligandrum* (Hase *et al.*, 2008), *Piriformospora indica* (Waller *et al.*, 2005), *Sebacinales* spp. (Waller *et al.*, 2008) y *Trichoderma* spp. (Vinale *et al.*, 2008).

Los microorganismos integrantes del género *Trichoderma* spp., son hongos filamentosos del suelo que al interactuar con la plantas favorecen el crecimiento, la captación de nutrientes y son capaces de estimular su sistema de defensa, lo cual se ha visto asociado con la colonización de las raíces. (Shoresh *et al.*, 2010; Salas-Marina *et al.*, 2011). Además, poseen la característica de proteger a la planta de patógenos a través de su potencial antagónico y micoparasítico (Viterbo y Horwitz, 2010).

El proceso de colonización involucra el reconocimiento y la adherencia a las raíces, el cual está mediado por hidrofobinas y por proteínas semejantes a las expansinas de plantas. Después de adherirse a la raíz, *Trichoderma* penetra la planta utilizando enzimas proteolíticas y celulolíticas (Viterbo *et al.*, 2004).

Se ha reportado, que 72 horas después de la colonización de las raíces de las plantas por *Trichoderma*, hay un fortalecimiento de las células de la epidermis y corticales, así como la formación de nuevas barreras formadas por deposiciones de callosa e infiltraciones de celulosa (Chacón *et al.*, 2007). El enriquecimiento de callosa en la pared celular es aparentemente eficiente para la restricción del crecimiento del hongo en el espacio intercelular de la epidermis, previniendo la

entrada de *Trichoderma* al espacio vascular (Yedidia *et al.*, 1999; Salas-Marina *et al.*, 2011).

Se ha determinado que los microorganismos benéficos son reconocidos por las plantas por medio de componentes microbianos de superficie celular, que sirven como efectores de la resistencia sistémica. En general dichos componentes son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos o a microbios (PAMPS o MAMPS, por sus siglas en inglés respectivamente) (Schwessinger y Zipfel, 2008).

Se conocen varias moléculas efectoras de *Trichoderma* spp. que inducen el sistema de defensa de las plantas. *T. viride* produce una xilanasa inductora de la producción de etileno (Xyn2/Eix), responsable de la inducción de la defensa en plantas de tabaco y jitomate (Rotblat *et al.*, 2002). También, se ha descrito que una celulasa de *T. longibrachiatum* activa las vías del SA y ET en melón (Martínez *et al.*, 2001). La swollenina (tasSwo) de *T. asperellum* estimula la respuesta de defensa en pepino contra bacterias y hongos (Brotman *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que los peptaiboles, péptidos lineales de 5 a 20 aminoácidos con actividad antimicrobiana, producidos por péptido sintetetasas no ribosomales, promueven la biosíntesis del JA y SA en una variedad de frijol (Engelberth *et al.*, 2001).

Entre otros MAMPs descritos de *Trichoderma*, se encuentra la proteína SM-1 (small protein -1) de *T. virens* y su ortólogo EPL-1 de *T. atroviride* que inducen la resistencia sistémica en plantas de algodón, maíz, tomate y *Arabidopsis* (Djonovic *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2006; Salas-Marina *et al.*, en preparación). Las proteínas SM-1/EPL-1 pertenecen a la familia de las cerato plataninas, las cuales presentan

actividad fitotóxica y antimicrobiana, sin embargo, se demostró que la proteína purificada SM-1 carece de toxicidad contra plantas y microorganismos. Al analizar la expresión del gen *sm-1* se determinó que se expresa durante el desarrollo del hongo y se sobreexpresa por presencia de plantas de algodón (Djonovic *et al.*, 2006). Al generar cepas mutantes y sobreexpresante del gen *sm-1* de *T. virens* e inocularlas en plántulas de maíz estas presentaron un menor y mayor grado de protección contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum*, respectivamente *graminicola* (Djonovic *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que después del ataque por un patógeno o por la colonización de la raíz de las plantas por un organismo benéfico, éstas incrementan su capacidad de defensa a un segundo ataque, al cual la planta responde de una manera más rápida y eficiente, comparada con plantas que no fueron atacadas por el patógeno o colonizadas por el microorganismo benéfico. Éste mecanismo es conocido como “priming” (estado hipersensibilizado).

En este trabajo estamos interesados en evaluar el papel de la proteína SM-1 de *T. virens* en la inducción del “priming” en plantas de *A. thaliana* retadas con el hongo fitopatógeno necrotrófico *Botrytis cinerea* y la bacteria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pst* DC300).

RESULTADOS

Análisis de la expresión del gen *sm-1* en cepas sobreexpresantes (OE) y mutantes por delección (KO) del hongo *T. virens*.

Salas-Marina y colaboradores (manuscrito en preparación), generaron cepas KO y OE del gen *sm-1* de *T. virens*, las cuales no fueron caracterizadas con respecto a la expresión del gen en cuestión. Con la finalidad de verificar que aquellas cepas transformadas con la construcción para la sobreexpresión (OE), expresaran niveles elevados de transcrito que la cepa silvestre Tv29.8, y que las mutantes generadas por remplazo génico no lo expresaran, se decidió determinar los niveles del transcrito mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR). Como se observa en la **Figura 1**, el transcrito del gen *sm-1* está sobreexpresado en las cepas OE2.1 y OE2.2, 5 y 8 más veces respectivamente, al compararse con la cepa WT. Como se esperaba, no se detectó transcrito en las cepas KO2 y KO6 (**Figura 1**).

Selección de la cepa sobreexpresante del gen *sm-1* de *T. virens* para ser empleada en el experimento del “priming”.

Resultados generados previamente en el laboratorio (Salas-Marina, *et al.*, en preparación), mostraron que plantas de *Arabidopsis* preinoculadas en la raíz con la cepa OE2.2 y posteriormente retadas con el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* presentaron una disminución del área foliar dañada en un 10% y 45%, en comparación con plantas inoculadas con la cepa WT y con las plantas sin inocular con *T. virens*, respectivamente. (**Figura 1A material suplementario**). Las hojas de aquellas preinoculadas con la cepa OE2.1 presentaron daño similar a las

preinoculadas con la cepa WT, mientras que las plantas preinoculadas con la cepa KO presentaron, en un 20%, mayor daño con respecto a las plantas preinoculadas con la cepa WT. Sin embargo, las plantas preinoculadas con la cepa KO mostraron una disminución en un 15% del daño causado por *B. cinerea* en comparación con las plantas sin inocular con *T. virens* (**Figura 1 A material suplementario**).

En cambio, el área foliar dañada de las plantas inoculadas con la cepa OE 2.1, OE 2.2 o KO al ser retadas la bacteria hemobiotrófica *Pst* DC3000 fue equiparable a las inoculadas con la cepa WT. Las plantas preinoculadas con las cepas de *T. virens* mostraron una disminución en un 25%, en comparación con las plantas sin inocular con *T. virens* (**Figura 1 B material suplementario**).

Tomando en consideración los datos anteriores, se eligió a la cepa OE2.2 para ensayos de “priming” realizados en el presente trabajo.

El gen *sm-1* de *T. virens* se induce en presencia de *A. thaliana*.

Con la finalidad de determinar que en nuestro sistema de interacción *in vitro* *T. virens-Arabidopsis* el hongo responde a la presencia de la planta, se midieron los niveles de transcrito del gen *sm-1* mediante qRT-PCR en presencia y ausencia de plántulas de *A. thaliana* a las 24, 48 y 72 h de coincubación. Como se muestra en la **Figura 2**, los niveles del transcrito se incrementaron en los tres tiempos medidos debido a la presencia de *A. thaliana*. Como control, se incluyó al hongo creciendo en ausencia de la planta, con los mismos tiempos de co-cultivo. En la **Figura 2**, se observa que hubo un incremento en los niveles de expresión del gen *sm-1* a las 72 y 96 horas de crecimiento en ausencia de planta, sin llegar a

alcanzar los niveles detectados en presencia de la planta. Se ha reportado que el gen *sm-1* se expresa durante el desarrollo de *T. virens* (Djonovic *et al.*, 2007).

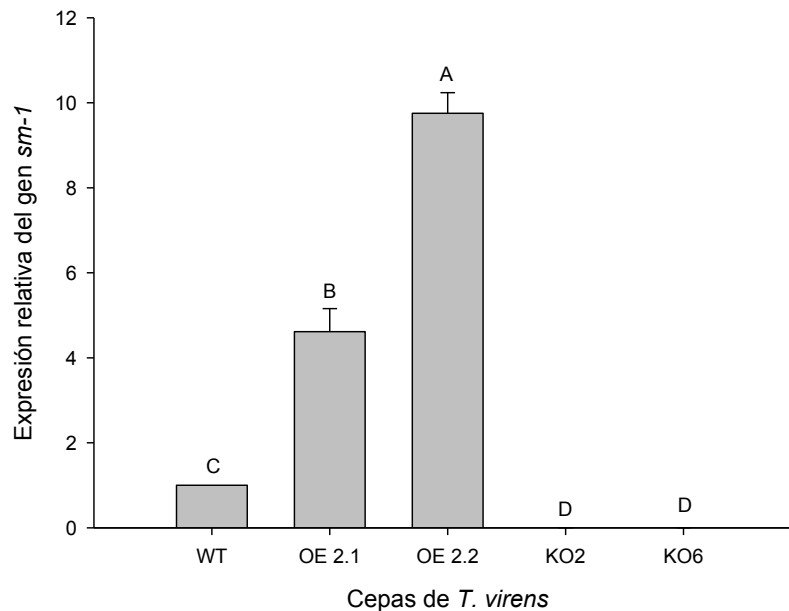


Fig 1. Análisis de los niveles de expresión del transcrito del gen *sm-1* de las cepas WT, OE y KO de *T. vires* Tv29.8. Las cepas fueron crecidas durante 7 días en medio PDA, posteriormente se colectó el micelio y se extrajo el RNA total para determinar los niveles de expresión del gen *sm-1* mediante qRT-PCR. Los datos presentados son los promedios con su respectiva desviación estándar. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo al análisis estadístico ANOVA y método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Como gen constitutivo se empleo el factor de elongación (*tef-1*).

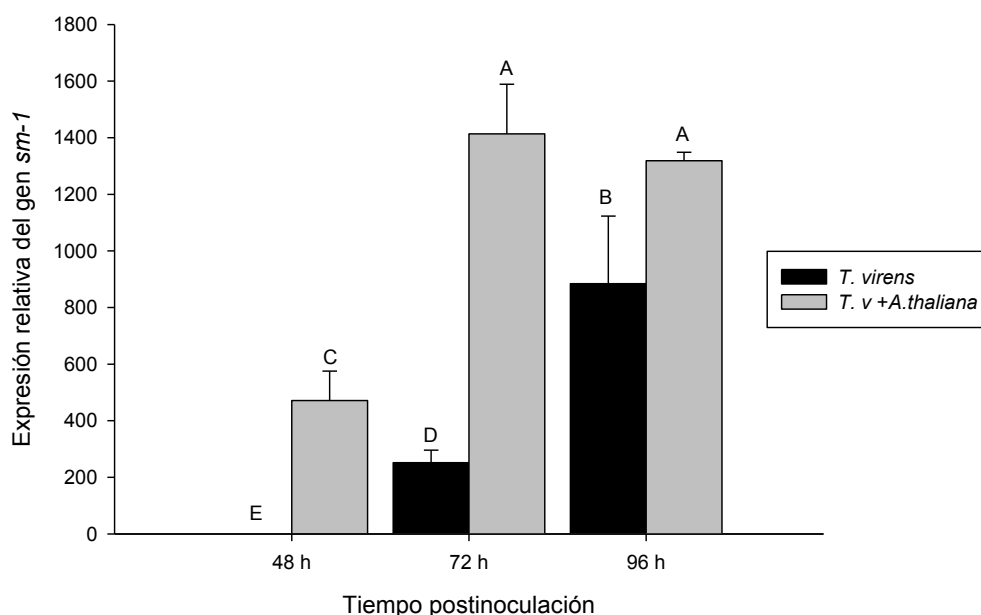


Fig 2. Niveles de expresión del gen *sm-1* de *T. virens* Tv28.9 en presencia y ausencia de *A. thaliana* mediante qRT-PCR. Plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de edad fueron inoculadas con discos miceliales de la cepa WT de *T. virens*. Como control se usaron los hongos crecidos en ausencia de planta. El micelio del hongo se colectó a las 48, 72 y 96 horas postinoculación, se extrajo el RNA total, se generó el cDNA, y se determinaron los niveles de expresión por qRT-PCR. Las barras grises representan a la cepa WT de *T. virens* en ausencia de plántulas y las barras negras al hongo en co-cultivo con *Arabidopsis*. Los datos presentados son los promedios obtenidos con su respectiva desviación estándar. Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo al análisis estadístico ANOVA y método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Como gen constitutivo se utilizó el gen *tef-1* (factor de elongación) de *T. virens*.

Efecto de las cepas de *T. virens* en el “priming” de *A. thaliana* en cocultivos *in-vitro*.

Con la finalidad de determinar el papel de la proteína SM-1 de *T. virens* en el “priming” en *A. thaliana*, se evaluaron los niveles de expresión de genes marcadores de la ISR y de la SAR en hojas de plántulas de *A. thaliana* inoculadas en la raíz con las diferentes cepas de *T. virens*, y posteriormente infectadas con los patógenos *B. cinerea* o *Pst* DC3000 [(WT (+WT+Bc/Ps), OE (+OE+Bc/Ps) y KO (+KO+Bc/Ps)] a los tiempos 0, 24 y 48 horas postinfección (hpi). Como controles se incluyeron plantas inoculadas con las diferentes cepas de *T. virens* (+WT, +OE y +KO), sin infectar con patógenos, y plantas sin inocular con *T. virens* e infectadas con patógenos (+Bc o +Ps), así como plantas solas creciendo sin microorganismos.

Para determinar si a nivel molecular la vía SAR está involucrada en la inducción del “priming” se determinó los niveles del gen *PR1-a*. En la **Figura 3** se muestran los niveles de inducción del gen *PR-1a* de los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. Tomando en cuenta que todos los experimentos se llevaron a cabo en paralelo, los controles de las plantas inoculadas únicamente con las cepas de *T. virens* son los mismos para la **Figura 3A** y **Figura 3B**. En ambas figuras se observa que a las 72 horas de interacción (0 h postinfección) las plantas +OE presentaron 12 veces más transcrito del gen *PR-1a* en comparación con las plantas +WT y 3 veces más a diferencia de la plantas inoculadas con la cepa KO. Interesantemente las plantas +KO presentaron mayor inducción del gen *PR-1a* en comparación con las +WT.

Como se puede observar en la **Figura 3A**, a las 24 hpi con *B. cinerea*, las plantas +KO+Bc presentaron un incremento en los niveles de expresión comparados con sus plantas control (+KO) y con las plantas +Bc. En el caso de las plantas +WT+Bc y +OE+Bc el nivel de expresión disminuyó en comparación con sus controles (+WT y +OE).

Comparando el tiempo 24 h con respecto al tiempo 0, los niveles de inducción disminuyeron drásticamente en las plantas +WT, +OE y +KO. En cambio, a las 48 hpi, las plantas +WT+Bc y +OE+Bc presentaron un incremento en los niveles de expresión al compararse con sus respectivas plantas control (+WT y +OE), aunque claramente el nivel de expresión de las plantas +WT+Bc son mayores que los de las plantas +OE+Bc. Contrario a lo que ocurrió en el tiempo 24 hpi, el nivel de expresión de *PR-1a* en las plantas +KO+Bc disminuyó con respecto a sus plantas control (+KO).

En la **Figura 3B**, se puede observar que a las 24 hpi las plantas +OE+Ps y +KO+Ps presentaron un incremento en los niveles de expresión del gen *PR-1a* comparados con sus plantas control, +OE y +KO, respectivamente. Aunque, las +KO+Ps muestran un incremento ligeramente mayor que las +OE+Ps. A las 48 hpi las únicas plantas que presentaron un incrementó en los niveles de *PR-1a* fueron las +OE+Ps, ya que los niveles de *PR-1a* en la +KO+Ps se mantuvieron iguales que en la +KO. A pesar de que en este tiempo los niveles de inducción presentados por la +OE+Ps y +KO+Ps son estadísticamente diferentes, numéricamente la diferencia entre ellos es mínima. En el caso de las plantas +WT+Ps, éstas no presentaron cambios significativos en comparación a las

plantas +WT, el comportamiento fue muy parecido a las plantas únicamente infectadas con el patógeno (+Ps).

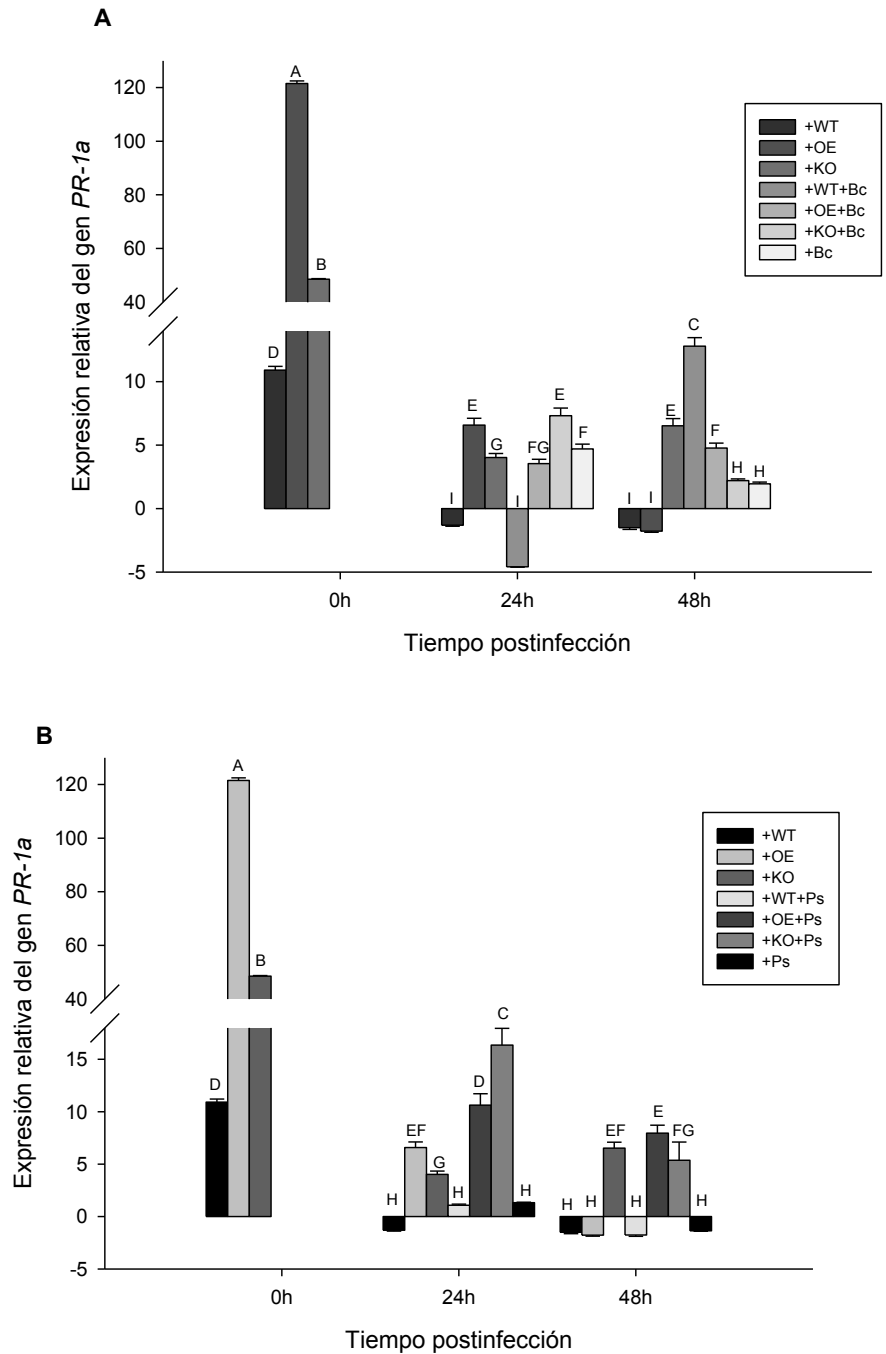


Fig 3. Papel de la proteína SM-1 en el “priming” del gen marcador de la SAR, *PR-1a*, en plantas de *A. thaliana* preinoculadas en la raíz con cepas WT, OE y KO de *T. virens* y posteriormente infectadas con *B. cinerea* (A) o *Pst* DC3000 (B). Veinte plántulas de *A. thaliana* de 11 días de edad fueron inoculadas en la raíz con 3 discos miceliales de las diferentes cepas de *T. virens*, y 72 horas

después (0 h). Tres hojas de cada planta fueron inoculadas con los patógenos *B. cinerea* (A) o *Pst* DC3000 (B). Se colectó la parte aérea de las plantas de cada tratamiento a las 0, 24 y 48 hpi para extraer el RNA total, generar el cDNA y medir los niveles de inducción del gen *PR-1a* por qRT-PCR. Las barras representan los promedios obtenidos de un experimento independiente por triplicado con sus respectivas desviaciones estándar. Las barras que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo al análisis estadístico ANOVA y método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Como gen de referencia se utilizó el gen de actina (*ACT8*).

Para determinar si a nivel molecular la vía ISR está involucrada en la inducción del “priming” se determinó los niveles del gen *LOX-2*. En la **Figura 4** se muestran los niveles de inducción del gen *LOX-2* de los diferentes tratamientos mencionados anteriormente. A las 72 horas post-infección hay un incremento en los niveles de inducción de *LOX-2* las plantas +WT, +OE y +KO, siendo mayor el incremento de los 2 primeros con respecto al último.

En la **Figura 4A** se observa que no hubo diferencia a las 24 hpi entre las plantas inoculadas sólo con las cepas de *T. virens* y las inoculadas con *T. virens* y posteriormente infectadas con *B. cinerea*. Mientras, que a las 48 hpi es evidente el incremento en los niveles de expresión de *LOX-2* en las plantas +OE+Bc comparado con el control +OE y +Bc, y los tratamientos +WT+Bc y +KO+Bc. Estos dos últimos tratamientos muestran un nivel de expresión de *LOX-2* equivalente entre ellos, pero hay un incremento en los niveles de inducción en comparación con sus respectivos controles, +WT y +KO, así como con respecto a las plantas +Bc.

Los niveles de inducción del gen *LOX-2* debidos a la inoculación de *Pst* DC3000 se incrementaron a las 24 y 48 hpi en los tres tratamientos (+WT+Ps, +OE+Ps, +KO+Ps) comparados con sus respectivos controles, +WT, +OE y +KO, aunque presentan el mismo nivel de inducción que el control de +Ps. A pesar de que numéricamente el nivel de inducción del tratamiento +OE+Ps a las 24 hpi es menor a los tratamientos donde se infecto con *Pst* DC300, estadísticamente no hay diferencia significativa entre ellos (**Figura 4B**).

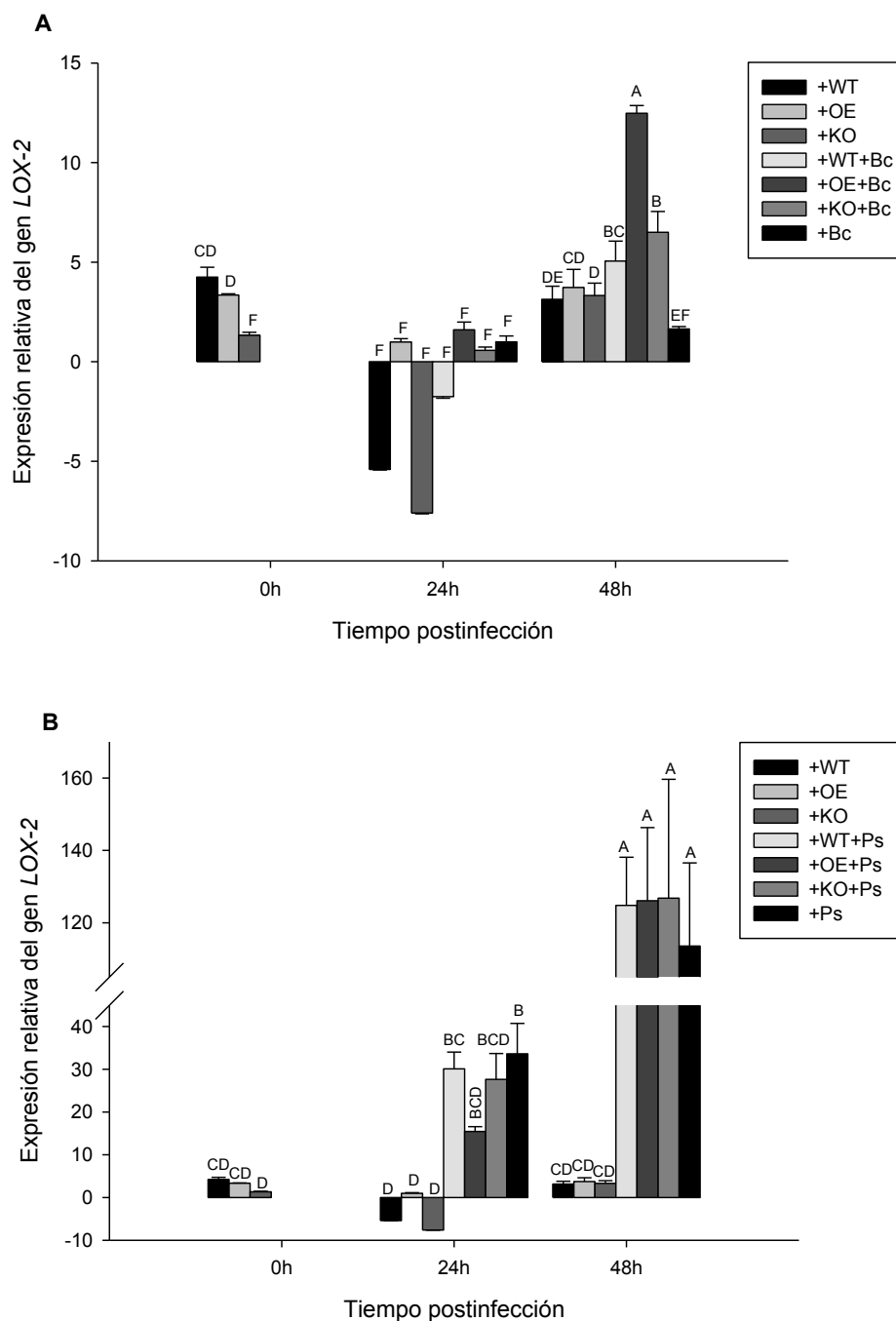


Fig 4. Papel de la proteína SM-1 en el “priming” del gen marcador de la ISR, *LOX-2*, en plantas de *A. thaliana* preinoculadas en la raíz con las cepas WT, OE y KO de *T. virens*, y posteriormente infectadas con *B. cinerea* (A) o *Pst DC3000* (B). Veinte plántulas de *A. thaliana* de 11 días de edad fueron inoculadas

en la raíz con 3 discos miceliales de las diferentes cepas de *T. virens*, y 72 horas después (0 h). Tres hojas de cada planta fueron inoculadas con los patógenos *B. cinerea* (A) o *Pst* DC3000 (B). Se colectó la parte aérea de cada tratamiento a las 0, 24 y 48 horas postinfección para extraer el RNA, generar el cDNA y medir los niveles de inducción del gen *LOX-2* por qRT-PCR. Las barras representan los promedios obtenidos de un experimento independiente por triplicado con sus respectivas desviaciones estándar. Las barras que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo al análisis estadístico ANOVA y método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Como gen de referencia se utilizó el gen de actina (*ACT8*).

DISCUSIÓN

Se han reportado varios trabajos acerca del efecto del “priming” inducido por *Trichoderma* spp. en las plantas contra una variedad de patógenos (Shores *et al.*, 2005; Djonovic *et al.*, 2007; Mathys *et al.*, 2012). La inoculación en plantas de pepino con *T. asperellum* T203, indujo la expresión de los genes relacionados con la ISR, efecto similar al ocasionado por las rizobacterias. Las plantas preinoculadas con T203 presentaron reducción del daño ocasionado por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* en comparación con las plantas sin preinocular con T203. Sin embargo, las plantas inoculadas con T203 y posteriormente retadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* presentaron inducción de genes relacionados con la SAR (Shores, *et al.*, 2005).

Se conocen varias moléculas efectoras de *Trichoderma* spp. que inducen el sistema de defensa de las plantas, entre las cuales se ha descrito a los peptaiboles, a proteínas con actividad enzimática, a una swollenina, a la proteína SM-1, entre otros (Shoresh *et al.*, 2010).

Nuestros resultados de interacción *Trichoderma*-Planta, mostraron que el gen *sm-1* es inducido en *T. virens* debido a la presencia de *A. thaliana* (Figura 2), el mismo efecto se había observado en *T. virens* por la presencia de plantas de algodón (Djonovic *et al.*, 2006). Además, el gen se indujo durante el crecimiento del hongo en ausencia de la planta, pero nunca alcanzó los niveles cuando se cocultivo con *Arabidopsis* (Figura 2), lo cual concuerda con resultados publicados (Djonovic *et al.*, 2006). A pesar de que el gen *sm-1* se induce durante el desarrollo del hongo, las cepas OE o KO no presentaron cambios morfológicos ni de crecimiento en comparación con las cepas WT (Salas-Marina *et al.*, en preparación).

En estudios de interacción entre *T. virens* con plantas de algodón, se demostró que las plantas inoculadas con la proteína SM-1 purificada presentaron menor daño contra el fitopatógeno *C. graminicola* en comparación con las plantas sin inocular con la proteína (Djonovic *et al.*, 2006). Adicionalmente, se reportó que plantas de maíz inoculadas con cepas OE presentaron menos daño foliar contra el fitopatógeno, comparadas con las plantas tratadas con la cepa WT, mientras que las plantas inoculadas con la cepa KO presentaron un mayor daño que las plantas inoculadas con la cepa WT. (Djonovic *et al.*, 2007).

Aunque se ha propuesto el papel de la proteína SM-1 en el priming (Djonovic *et al.*, 2006; Djonovic *et al.*, 2007) en plantas de algodón y maíz, no se ha demostrado experimentalmente. Hasta donde sabemos, el presente trabajo es el primero en evaluar la inducción del gen *sm-1* en presencia de *A. thaliana*. De igual manera, es el primer trabajo en explorar el papel de la proteína SM-1 en el “priming” en plantas de *Arabidopsis*, utilizando genes marcadores de la ISR y la SAR.

Los resultados generados previamente en el laboratorio (Salas-Marina *et al.*, en preparación y Figura suplementaria 1A), mostraron que plantas de *A. thaliana* preinoculadas con la cepa OE presentaron una disminución del daño foliar ocasionado por *B. cinerea*, comparadas con las plantas preinoculadas con la cepa WT. Las plantas inoculadas con la cepa KO mostraron un menor daño comparadas con las plantas no tratadas con *T. virens*, y se observó un mayor daño en comparación con las plantas preinoculadas con la cepa WT. A diferencia de los resultados reportados por Djonovic *et al.*, (2007), donde observaron que las plantas de maíz inoculadas con las cepas KO, y posteriormente inoculadas con el

patógeno *C. graminicola*, presentaron el mismo daño foliar que las plantas control (sin inocular con *T. virens*), en nuestro trabajo, las plantas de *Arabidopsis* inoculadas con las cepas KO, y posteriormente inoculadas con *Pst* DC3000 o *B. cinerea*, nunca alcanzaron los niveles de daño comparadas con las plantas sin inocular con *Trichoderma*. Estos resultados sugieren la existencia de moléculas inductoras de la resistencia sistémica adicionales en *T. virens*. Los resultados en conjunto, sugieren un dialogo molecular entre la planta y el hongo, ya que la presencia de la planta indujo la expresión del gen *sm-1* en la cepa WT, y las plantas respondieron favorablemente a la inoculación de las cepas sobreexpresantes del gen. Comparadas con las plantas tratadas con la cepa WT u OE, las plántulas tratadas con las cepas KO presentaron un mayor daño, posiblemente por la ausencia del producto del gen *sm-1*.

Para el caso de la infección ocasionada por la bacteria *Pst* DC3000, las plantas preinoculadas con las diferentes cepas de *T. virens* (WT, KO y OE) mostraron niveles de infección cercanos al 20%, mientras que las no inoculadas fueron del 75%. Estos resultados nos sugieren que la proteína SM-1 está involucrada en el priming a través de la ISR y no por la SAR.

Lo anterior coincidió con los datos moleculares obtenidos en el presente trabajo, ya que el gen *LOX-2*, marcador de la ISR, se indujo a las 48 hpi en las plantas preinoculadas con las cepas de *T. virens* (WT, OE y KO) y posteriormente inoculadas con *B. cinerea*, comparado con las plantas inoculadas únicamente con las cepas de *T. virens* o con aquellas inoculadas solamente con el hongo necrotrófico (Figura 4 A), mientras que para el gen *PR-1a* no se observaron cambios significativos a las 24 o 48 hpi con *B. cinerea* o *Pst* DC3000. Las plantas

inoculadas con la cepa OE y postinoculadas con *B. cinerea* expresaron casi 3 y 8 veces más el gen *LOX-2* en comparación con las plantas inoculadas únicamente con la cepa OE y con aquellas inoculadas solamente con el hongo necrotrófico, respectivamente. En el caso de las plantas de *A. thaliana* preinoculadas con las diferentes cepas y posteriormente retadas con *B. cinerea* se observó claramente que los niveles de inducción del gen *LOX-2* en aquellas inoculadas con la cepa OE fueron casi el doble que aquellas inoculadas con la cepa WT y KO. Este dato correlaciona con el hecho de que las plantas inoculadas con OE presentaron una disminución del daño foliar ocasionado por *B. cinerea*.

Por lo tanto, estos datos junto con los de protección contra *B. cinerea*, soportan nuestra hipótesis de que la proteína SM-1 está involucrada en el “priming” a través de la vía de señalización ISR.

A pesar de que las plantas inoculadas con la KO presentaron mayor daño foliar ocasionado por *B. cinerea* en comparación con las plantas inoculadas con la cepa WT, los niveles de inducción del gen *LOX-2* fueron similares en ambos tratamientos. Por lo que probablemente la diferencia se deba a que la ausencia de la proteína SM-1 cause una desregulación en la cepa KO y algunos otros MAMPs desencadenen un efecto que finalmente no se ve reflejado en la disminución del gen *LOX-2*. Aunque no podemos asegurar que los genes se comporten de la misma manera a como lo hicieron *in vivo*, nos da una idea de lo que pudiera estar ocurriendo.

Un caso interesante fue que los niveles de inducción del gen *PR-1a* a las 24 hpi con *Pst* DC3000, las cepas KO y OE son las únicas que ocasionan un efecto de “priming”, inclusive la cepa KO induce mayores niveles de expresión que la cepa

OE. En este caso no hay correlación con lo observado con el daño ocasionado por *Pst* DC300 en el experimento *in vivo*.

Se ha propuesto la asociación del “priming” con la acumulación y/o modificaciones de proteínas inactivas (“proteínas latentes”) involucradas con la resistencia sistémica, las cuales, en respuesta a una segunda infección podrían ser activadas produciendo una respuesta de defensa inmediata por parte de la planta (Conrath *et al.*, 2006). Lo anterior se comprobó en plantas de *A. thaliana*, las cuales posterior al tratamiento con BTH, presentaron acumulación de mRNA y proteínas inactivas de MPK3 y MPK6, proteínas de señalización pertenecientes a la familia de proteínas cinasas activadas por mitogenos (MPK). Después de someter a las plantas tanto a estrés biótico como abiótico, las proteínas fueron activadas más rápido en comparación con las plantas sin tratar con BTH (Beckers *et al.*, 2009).

Dado que los niveles de inducción del gen *PR-1a* a las 0 hpi están elevados en las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens* (Figura 3B), probablemente los productos de estos mRNAs pudieran estar procesándose y acumulándose en la planta como se observó al aplicar BTH (Beckers *et al.*, 2009). Por lo que a las 24 y 48 hpi los niveles del transcrito de *PR-1a* no se ven incrementados tan drásticamente en las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens* y posteriormente inoculadas con *Pst* DC3000 (Figura 3B), posiblemente porque esta situación no es energéticamente favorable para la planta. Debido a que sólo las plantas inoculadas con las cepas KO y OE presentaron inducción del gen *PR-1a*, a las 24 y 48 hpi, al inocularles *Pst* DC3000 puede deberse a que las plantas estén compensando la cantidad de proteína de defensa, según sus requerimientos, para contrarrestar el ataque contra *Pst* DC300. Esto puede explicar el hecho del por

qué no hay una correlación entre los niveles de expresión del gen y los niveles de protección cuando se inoculó con *Pst* DC3000.

Al inocular las plantas de *A. thaliana* con *B. cinerea* se esperaría, que por ser un patógeno necrotrófico, indujera la expresión de genes relacionados a la ISR, pero a las 24 hpi las plantas inoculadas con *B. cinerea* expresaron 5 veces más el gen *PR-1a* en comparación con el gen *LOX-2* (Figura 3A y 4A), incluso el gen *PR-1a* se indujo más por la presencia de *B. cinerea* que por la presencia de la bacteria hemibiotrófica *Pst* DC3000 (Figura 3). Estos resultados concuerdan con datos publicados, los cuales muestran la expresión de genes relacionados con la ISR y la SAR en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *B. cinerea* (Ferrari *et al.*, 2003; Mathys *et al.*, 2012). A pesar de esto se ha visto que mutantes *co1-1* de *A. thaliana* incapaces de detectar jasmonato son más susceptibles a ser infectadas por *B. cinerea* (Thomma *et al.*, 1998).

Los niveles de expresión de *LOX-2*, ocasionados por *Pst* DC3000 son equivalentes ya sea en plantas inoculadas o sin inocular con las cepas de *T. virens* (Figura 4). Dichos niveles pueden deberse a que la bacteria produce compuesto llamado coronatina, el cual mimetiza la función de la hormona metiljasmonato (MeJA) (Bender *et al.*, 1999; Preston, 2000), por lo tanto enciende la ISR y suprime la SAR (Katagiri *et al.*, 2002). Se ha postulado que la bacteria utiliza este sistema para evadir el sistema de defensa de la planta para poder atacarla fácilmente debido al efecto antagónico de la vía del salicilato y la del jasmonato/etileno (Felton *et al.*, 1999a, 1999b; Pieterse y Van Loon, 1999; Thomma *et al.*, 2001). Esto correlaciona con nuestros resultados (Figura 3B y 4B),

ya que las plantas inoculadas únicamente con *Pst* DC300 inducen los niveles de expresión de *LOX-2* y reprimen al gen *PR-1a*.

Además, en el presente trabajo se muestra que las plantas de *A. thaliana* inoculadas con *T. virens* incrementaron los niveles de expresión de los genes *PR-1a* y *LOX-2* a las 72 horas, aunque claramente los niveles de expresión depende de la cepa de *T. virens* con la que la planta fue inoculada. La mayoría de los trabajos publicados con de *Trichoderma* spp. y otras con otras plantas sólo han detectado incrementos en la expresión de genes relacionados a alguno de los dos tipos de resistencia (SAR o ISR), pero no ambos. Sólo un par de trabajos, han reportado que *Trichoderma* spp. colonizadoras de raíz son capaces de incrementar genes relacionados con los dos tipos de resistencia en *Arabidopsis* (Mathys *et al.*, 2012; Salas-Marina *et al.*, 2011).

Se sabe que las vías de la SAR y de la ISR son mutuamente excluyentes, sin embargo, se ha reportado que a bajos niveles de SA y JA/ET, ambas vías pueden coexistir y generar altos niveles de protección contra patógenos (Van Wees *et al.*, 2000).

También puede deberse a que en etapas tempranas pudiera haber una modulación hormonal entre JA/ET y SA que permita la activación de las 2 vías, ISR y SAR, como un efecto entre la transición del reconocimiento de la planta hacia *T. virens* de patógeno a benéfico (Pozo *et al.*, 2005)

Una vez establecido el papel de la proteína SM-1 y dado a que las plantas preinoculadas con la cepa KO mostraron menor daño foliar contra *B. cinerea*, en comparación con plantas sin preinocular con *T. virens*, indica que debido a la ausencia del producto del gen *sm-1* en *T. virens*, el producto de algún otro gen

este actuando como elicitador en *A. thaliana*. Este caso no sucede en plantas de maíz, ya que al ser inoculadas con una cepa KO y posteriormente retadas contra el fitopatógeno *C. graminicola* mostraron daño similar a las plantas sin preinocular con *T. virens* (Djonovic *et al.*, 2007). Posiblemente las diferencias radiquen en el efecto que puedan tener los fitopatógenos en modular el sistema de defensa de la planta o debido a vías adicionales activas o inactivas (síntesis de ácido abscísico, auxinas, giberelinas) en una u otra planta que lleven a determinar cambios en el sistema de defensa de la planta.

Aunque es importante considerar que la respuesta ocasionada por *Trichoderma* ssp. en la planta dependerán de la cepa del hongo como el genotipo de la planta (Tucci *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las semillas se sincronizaron durante 2 días a 4°C. Después esterilizadas mediante un lavado con una solución de etanol al 70% por 1 minuto, seguida de un lavado con agua destilada estéril y posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 10%, por 1 minuto, seguida de 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas por 3 días en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) 1X, y posteriormente fueron crecidas en cajas con medio MS 0.2X durante 9 días. Para la medición del transcrito del gen *sm-1* de *T. virens*, las plantas se crecieron en cajas de Petri con medio MS 1X sobre un papel celofán por 15 días. Las cepas fúngicas empleadas fueron *Trichoderma virens* Gv29-8 (Tv WT) sobreexpresantes (Tv OE2.2 y OE2.1) y knockout (Tv KO2 y KO6) del gen *sm-1* (Salas-Marina *et al.*, en preparación). Se utilizó una cepa de *B. cinerea*, amablemente proporcionada por el Dr. Alfredo Herrera Estrella (LANGEBIO, CINVESTAV-Irapuato, México). Las cepas fúngicas fueron crecidas en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (Difco, Franklin lakes, NJ) a 28°C. Las cepas de *T. virens*, se crecieron por 4 días y *B. cinerea* por 14 días. Las conidias de *B. cinerea* se colectaron con agua destilada estéril, se filtró por una malla de 10 µM (Millipore) para eliminar el micelio y se ajustaron a una concentración de 5×10^6 esporas ml⁻¹ en una suspensión suplementada con 1% de Dextrosa y 1% de K₂HPO₄. Se ha demostrado que estos suplementos son necesarios para promover una mayor eficiencia en la germinación de las conidias de *B. cinerea* (Cole *et al.*, 1996). Para la medición de los niveles del transcrito del

gen *sm-1*, las cepas de *T. virens* se crecieron por 7 días en cajas con medio PDA sobre un papel celofán.

También, se empleó a la bacteria *Pseudomonas syringae* DC3000 (Cupels, 1986) la cual fue la crecida a 200 rpm durante 24 h a 28°C en medio Kings B (King *et al.*, 1954). El cultivo bacteriano se ajustó a una densidad óptica OD=1 a 600 nm en una solución de 10mM MgCl₂.

Análisis del transcrito del gen *sm-1* en las cepas OE y KO de *T. virens*

Las cepas WT, OE2.2, OE2.1, KO2 y KO6 de *T. virens* fueron crecidas en medio PDA, contenido en cajas de Petri, con un papel celofán cubriendo el medio de cultivo. El micelio fue colectado a los 7 días de crecimiento con la ayuda de un bisturí. Posteriormente, el micelio se molió en un mortero con nitrógeno líquido y se extrajo el RNA total, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se trataron 2 µg de RNA total con la enzima TURBO DNase (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de transcripción reversa se realizó con la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). La expresión del gen *sm-1*, fue evaluada mediante qRT-PCR. Los primers se diseñaron empleando el software Primer 3 (Applied Biosystems) los cuales se muestran en la tabla S1 en materiales suplementarios. La reacción de qRT-PCR se realizó empleando el kit Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystem), con 100 ng de cDNA de cada muestra. La reacción se llevó a cabo usando el equipo Abiprism 7500 fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem), empleando las condiciones sugeridas por el fabricante. El experimento se realizó dos veces de manera independiente y cada

reacción se realizó por triplicado. El gen del factor de elongación (*tef-1*) fue empleado como gen de referencia para la normalización de los genes medidos, mediante el uso de la fórmula $-\Delta\Delta CT$.

Análisis de la inducción del gen *sm-1* en presencia y ausencia de *A. thaliana*.

Plantas de *A.thaliana* de 15 días de edad, creciendo sobre un papel celofán en cajas de Petri con medio MS 1X, fueron inoculadas con 4 discos miceliales de la cepa WT de *T. virens* sobre la raíz. Después de 48, 72 y 96 horas de co-cultivo se colectó el micelio con ayuda de un bisturí y las muestras se trataron conforme al experimento mencionado anteriormente. Como control se incluyó al hongo creciendo en medio MS 1X, por 48, 72 y 96 h. El gen del factor de elongación (*tef-1*) fue empleado como gen de referencia para la normalización de los genes medidos, mediante el uso de la fórmula $-\Delta\Delta CT$.

Experimento de “priming” *in vitro*

Plántulas de *A. thaliana* de 10 días de edad, crecidas en medio MS 0.2X, fueron inoculadas sobre la raíz con 3 discos miceliales de las distintas cepas de *T. virens*. Setenta y dos horas después, 3 hojas de cada planta fueron inoculadas con 2 μ l de las suspensiones de conidias de *B. cinerea* o bacterianas de *Pst* DC3000 a las concentraciones mencionadas en el apartado anterior (+T+B.c/P.s). Como controles se utilizaron plantas sin inocular con *T. virens* y sin inocular con los patógenos, así como plantas tratadas sólo con *T. virens* (+T) o con patógenos (+Bc/Ps). Se realizaron colectas de la parte aérea a las 0, 24 y 48 h después de la inoculación de los patógenos. Las muestras fueron molidas en un mortero con

nitrógeno líquido y se extrajo el RNA total utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se trataron 2 µg de RNA total con la enzima TURBO DNase (Life Technologies), y la reacción de transcripción reversa se realizó con la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). El experimento se realizó por duplicado con un total de 24 plantas por condición.

La expresión de los genes relacionados a la defensa de *A. thaliana*, *PR-1a* (Pathogenesis related -1) y *LOX-2* (lipooxigenase 2), fueron evaluados mediante qRT-PCR. Los primers se diseñaron empleando el software Primer 3 (Applied Biosystems) (tabla S2). La reacción de qRT-PCR se realizó empleando el kit Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystem) con 100 ng de cDNA de cada muestra. La reacción se llevó a cabo usando el equipo Abiprism 7500 fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem), empleando las condiciones sugeridas por el fabricante. El experimento se realizó dos veces de manera independiente y cada reacción se realizó por triplicado. El gen de actina (*ACT8*) fue empleado como gen de referencia y la expresión de cada gen fue normalizada mediante el uso de la fórmula $-\Delta\Delta CT$.

BIBLIOGRAFÍA

- Bender, C. L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D. C. 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:266-292.
- Beckers, G., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., and Conrath, U. 2009. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21:944–953.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., and Chet, I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* 147:779–789.
- Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. and Delgado-Jarana, J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* 10:19–27.
- Cuppels, D. A. 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:323-327.
- Cole, L., Dewey, F.M., and Hawes, C. R. 1996. Infection mechanisms of *Botrytis* species: Pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycol Res.* 100:277-286.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.-A., Pieterse, C. M. J., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U. and Mauch-Mani, B. 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol Plant-Microbe Interact.* 19:1062–1071.

- 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.
- Dempsey, D. A., Shah, J., Klessig, D. F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547–575.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M. P., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P, Van Loon, L. C., Dicke, M., Pieterse, C. M. J. 2005. Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol Plant-Microbe Interact.* 18:923-937.
- Dong, X. N. 2004. NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:547–552.
- 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. *Mol Plant-Microbe Interact.* 19:838–853.
- Djonovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M., Wiest, A., Kenerley, C. M. 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145:875–889.
- Duijff, B. J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., Lemanceau, P., 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:903–910.

- Engelberth, J., Koch, T., Schuler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J. and Boland, W. 2001. Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiol.*125:369–377.
- Felton, G. W., Bi, J. L., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Korth, K., Wesley, S. V., Lamb, C., and Dixon, R. A. 1999a. Cross-talk between the signal pathways for pathogen-induced systemic acquired resistance and grazing-induced insect resistance. *Novartis Found. Symp.* 223:166-171.
- Felton, G. W., Korth, K. L., Bi, J. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., Murphy, J. B., Lamb, C., and Dixon, R. A. 1999b. Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory. *Curr. Biol.* 9:317-320.
- Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F. M. 2003. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. *Plant J.* 35:193–205.
- Gilchrist, D. G. 1998. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicid. *Annu. Rev. Phytopatol.* 36:393–414.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205–227.
- Glazebrook, J., Chen, W, Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., Zhu, T., and Katagiri, F. 2003. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal.* 34:217-228.

- Grant, M., and Mansfield, J., 1999. Early events in host–pathogen interactions. *Curr. Opin Plant Biol.* 2:312–319.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo A., Chet, I., and Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. *Nat. Rev Microbiol.* 2:1–14.
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y., and Takahashi, H., 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* 57:870–876.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., and Hyakumachi, M., 2008. Differential inducible defense mechanisms against bacterial speck pathogen in *Arabidopsis thaliana* by plant-growth-promoting-fungus *Penicillium* sp. GP16-2 and its cell free filtrate. *Plant Soil.* 304:227–239.
- Jackson, A. O., and Taylor, C. B. 1996. Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *Plant Cell.* 8:1651-1668.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He. S. Y. 2002. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/ tab.0039, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Lamb, C., and Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48:251–275.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L., and Dietrich, R. A. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Geneti.* 26:403-410.

- Martínez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. and Baccou, J. C. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* 127:334–344.
- Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerkhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., Cammue, B., and De Coninck, B. 2012. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Front in Plant Science.* 3:1-25.
- Morel, J. B., and Dangl, J. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Diff.* 19:17–24.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum.* 15:473-497.
- Paparu, P., Dubois, T., Coyne, D., and Viljoen, A. 2007. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71:149–157.
- Pieterse, C. M. J., and Dicke, M. 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci.* 12:564-569.
- Pieterse, C. M., and van Loon, L. C. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4:52-58.
- Pozo, M. J., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. 2005. Jasmonates—signals in plant-microbe interactions. *J Plant Growth Regul.* 23: 211–222.
- Pozo, M. J., and Azcon-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:393–398.

- Preston, G. (2000) *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol. Plant Pathol.* 1:263-275.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., and Hunt, M. D. 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell.* 8:1808–1819.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., and Farmer, E. E. 2004. A conserved transcriptional pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *The Plant Cell.* 16:3132-3147.
- Reymond, P., and Farmer, E. E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biology.* 1:404-411.
- Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J.M., Schuster, S., and Avni, A. 2002. Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J.* 32:1049–1055.
- 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. *Eur J Plant Pathol.* 131:15–26.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., and Manners, J. M. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS.* 97:11655-11660.
- Schwessinger, B., and Zipfel, C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:389–395.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., and Kubicek, C. 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 J. 273:4346–4359.
- Shoresh, M., Harman, G. E. and Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annu. Rev. Phytopathol. 48:21–43.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Métraux, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 35:235–270.
- Thomma B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. PNAS. 95:15107–15111.
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F., and Cammue, B. P. 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. Curr. Opin. Immunol. 13:63-68.
- Ton, J., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. 2002. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. Mol. Plant Microbe Interact. 15:27–34.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., and Lorito, M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. Mol. Plant Pathol. 12:341–354.
- Van Wees, S. C. M., Chang, H. S., Zhu, T., and Glazebrook, J. 2003. Characterization of the early response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* infection using expression profiling. Plant Physiol. 132:606-617.

- Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Ann. Rev of Phytopathol.* 44:135–162.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85–97.
- Van Poecke, R. M. P., and Dicke, M. 2004. Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol* 6:387–401.
- Van Wees, S. C. M., de Swart, E. A. M., Van Pelt, J. A., Van Loon, L. C., and Pieterse, C. M. J. 2000. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS.* 97:8711-8716.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M., 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40:1–10.
- Viterbo, A., Harel, M., and Chet, I. 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiol Lett.* 238:151–158.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., and Kogel, K.H., 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*102:13386–13391.

- Waller, F., Mukherjee, K., Deshmukh, S. D., Achatz, B., Sharma, M., Schaefer, P., Kogel, K.H., 2008. Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *J. Plant Physiol.* 165:60–70.
- 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.* 65:1061–1070.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

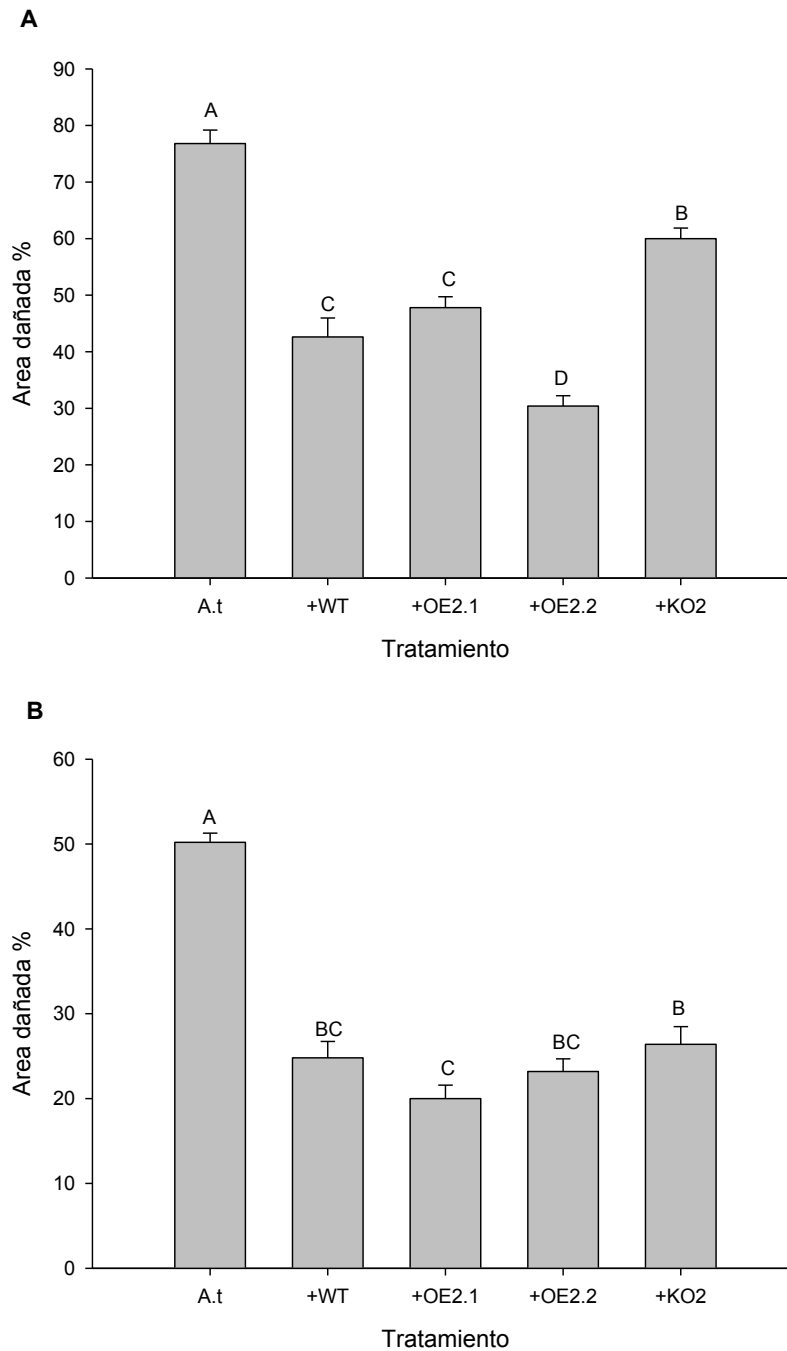


Fig 1. Protección conferida a plantas de *A. thaliana* por las cepas de *T. vires* contra el hongo necrotrófico *B. cinerea* (A) y la bacteria hemibiotrófica *Pst DC3000* (B). Plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas de edad fueron inoculadas con las diferentes cepas de *T. vires*, 2 semanas después de la inoculación las plantas

fueron infectadas con *B. cinerea* o *Pst* DC3000. El daño ocasionado en la parte aérea fue medido 7 días después de la infección. Los datos presentados son los promedios con su respectiva desviación estándar determinada de 5 hojas tomadas de 5 diferentes plantas. Como control se usaron plantas sin inocular con *Trichoderma* (A.t). Barras que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo al análisis estadístico ANOVA y método de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla S1. Oligonucleotidos de *T. virens* empleados para el qRT-PCR.

GEN	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Clave de acceso Genebank
<i>sm-1</i>	AATGGCTCCCGCTCTCTGA	TGTATTGCAGCTTCCAGCAGG	DQ121133
<i>tef-1</i>	CAGGTCGGTGCCGGATAC	TCAGAGAACTTGCAGGCAATGT	BT000595

Tabla S2. Oligonucleotidos de *A. thaliana* empleados para el qRT-PCR.

GEN	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Clave de acceso Genebank
<i>LOX-2</i>	TCCTCATTTCCGCTACACCAT	CCTCCGTTGACAAGACTTTGG	NM_114383
<i>PR-1a</i>	CGTCTCCGCCGTGAACAT	CGTGTTCCGACGCGTAGTTGT	NM_127557.2
<i>ACT8</i>	TGTGACAATGGTACCGGTATGG	CAGCCCTGGGAGCATCAT	NM_103814.3