

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

**Caracterización de las respuestas de defensa
inducidas por hongos del género *Trichoderma*
en *Arabidopsis thaliana***

**Tesis para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

Presenta

QFB. Hexon Angel Contreras Cornejo

**Asesor: DC. José López Bucio
Coasesor: Lourdes Macías Rodríguez**

Morelia Michoacán México, Octubre de 2010.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUIMICO BIOLÓGICAS, DEPENDIENTE DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES JOSÉ LÓPEZ BUCIO Y LOURDES MACÍAS RODRÍGUEZ.

RECONOCIMIENTOS

ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CLAVE 60999 Y EL CONSEJO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. AGRADECEMOS A LOS DOCTORES FEDERICK M. AUSUBEL, MARIO ROCHA SOSA Y DETLEF WEIGEL, POR SU AMABILIDAD AL PROPORCIONAR LAS SEMILLAS TRANSGÉNICAS DE *Arabidopsis thaliana*, JANE GLAZEBROOK POR EL ESTÁNDAR PURO DE CAMALEXINA Y ALFREDO HERRERA ESTRELLA POR LAS ESPECIES DE *Trichoderma*.

AGRADECIMIENTOS

AL EQUIPO DE TRABAJO POR PERMITIR QUE ESTE TRABAJO FUERA POSIBLE
LOS DOCTORES: MACÍAS RODRIGUEZ LOURDES, BELTRÁN PEÑA ELDA Y LOPÉZ
BUCIO JOSÉ. TAMBIÉN A TODOS AQUELLOS SERES QUE ME HAN APOYADO.
MUY ESPECIALMENTE A JAH Y MI MADRE.

DEDICATORIA

A mi madre Emmy...

En el campo de la observación el azar favorece sólo a las mentes preparadas.

-Louis Pasteur.

Para quienes dedican su vida a una carrera científica, nada es más gratificante que aumentar el número de sus descubrimientos. Pero cuando los resultados de sus observaciones quedan demostrados por su aplicación práctica, su goce no tiene límites.

-Louis Pasteur.

El microbio no es nada, el ambiente le es todo.

-Louis Pasteur.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
AGRADECIMIENTOS.	III
DEDICATORIA.	IV
ÍNDICE GENERAL.	VI
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	X
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN .	2
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. Los microorganismos de la rizosfera inducen la biosíntesis de hormonas y respuestas de defensa en las plantas.	5
2.2. Las respuestas de defensa son activadas específicamente después del reconocimiento del microorganismo.	6
2.3. Mecanismos implicados en la susceptibilidad y resistencia a enfermedades.	7
2.4. Participación del ácido salicílico en las respuestas de defensa.	9
2.4.1. Biosíntesis del ácido salicílico.	10
2.4.2. Vías de señalización del ácido salicílico.	12
2.5. Participación del ácido jasmónico (AJ) en las respuestas de defensa.	12
2.5.1. Biosíntesis del ácido jasmónico.	13

	PÁGINA
2.5.2. Participación de las lipoxigenasas en la biosíntesis de AJ.	13
2.5.3. Biosíntesis de oxilipinas en las plantas.	14
2.6. Respuestas de defensa mediadas por fitoalexinas.	17
2.6.1. Biosíntesis de camalexina.	17
2.7. El género de hongos <i>Trichoderma</i> .	19
2.7.1. Interacción de <i>Trichoderma</i> con las plantas.	19
2.8. <i>Trichoderma</i> induce respuestas de defensa en las plantas.	21
2.8.1. Elicitores bioquímicos para la resistencia a enfermedades.	21
2.8.2. Proteínas con actividad enzimática y otras funciones.	21
2.8.3. Homólogos Avr.	22
2.8.4. Oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular.	22
3. JUSTIFICACIÓN.	24
4. HIPÓTESIS.	24
5. OBJETIVO GENERAL.	25
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	25
6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.	25
6.2. Especies de <i>Trichoderma</i> y experimentos de inoculación.	26
6.3. Análisis histoquímico.	27

INDICE GENERAL

	PÁGINA
6.4. Determinación de antocianinas.	27
6.5. Extracción y cuantificación de ácido salicílico y ácido jasmónico.	27
6.6. Determinación de camalexina.	28
6.7. Análisis de la expresión de los genes <i>PAD3</i> y <i>NPR1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	29
6.8. Identificación y análisis de indol-3-carboxaldehído.	29
6.9. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.	30
6.10. Bioensayos para la inducción de resistencia sistémica por <i>Trichoderma</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> .	30
6.11. Análisis de datos.	31
7. RESULTADOS.	32
7.1. La colonización del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> por especies de <i>Trichoderma</i> no compromete el crecimiento vegetal.	32
7.2. <i>Trichoderma</i> induce la acumulación de antocianinas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
7.3. <i>Trichoderma</i> induce respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	37
7.4. <i>Trichoderma</i> induce respuestas de defensa dependientes de ácido jasmónico en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	43

	PÁGINA
7.5. <i>Trichoderma</i> induce la acumulación de camalexina en <i>Arabidopsis thaliana</i> y produce el precursor de la camalexina indol-3-carboxaldehído.	46
7.6. La aplicación de Indol-3-carboxaldehído induce la acumulación de camalexina en <i>Arabidopsis thaliana</i>.	49
7.7. <i>Trichoderma</i> induce resistencia sistémica en <i>Arabidopsis thaliana</i> contra el hongo necrótrofo <i>Botrytis cinerea</i>.	51
8. DISCUSIÓN.	55
9. CONCLUSIONES.	59
10. PERSPECTIVAS.	59
11. LITERATURA CITADA.	60

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Rutas de biosíntesis de ácido salicílico.	11
Figura 2. Ruta de biosíntesis de ácido jasmónico.	16
Figura 3. Mecanismo molecular para la biosíntesis de camalexina a partir de la reacción de condensación del indol-3-carboxaldehído y la cisteína.	18
Figura 4. Efectos de la inoculación de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	34
Figura 5. Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> sobre la acumulación de antocianinas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
Figura 6. Acumulación de ácido salicílico en <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculada con <i>Trichoderma</i> .	39
Figura 7. Acumulación de ácido salicílico en diferentes etapas de la interacción <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Trichoderma</i> .	40
Figura 8. Inducción de la expresión espacio-temporal del gen reportero <i>PR-1a::GUS</i> por <i>Trichoderma</i> .	41
Figura 9. Análisis de la expresión del gen <i>NON-EXPRESOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1 (NPR1)</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculadas con <i>Trichoderma</i> .	42
Figura 10. Acumulación de ácido jasmónico en <i>Arabidopsis thaliana</i> inoculada con <i>Trichoderma</i> .	44
Figura 11. Inducción de la expresión espacio-temporal del gen reportero <i>LOX2::GUS</i> por <i>Trichoderma</i> .	45
Figura 12. Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> en la acumulación y la expresión de <i>PAD3</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	47

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	PÁGINA
Figura 13. Identificación del indol-3-carboxaldehído de muestras no derivatizadas de los extractos acuosos de <i>Trichoderma virens</i>.	48
Figura 14. Acumulación de camalexina en <i>Arabidopsis thaliana</i> tratadas con ICALd.	50
Figura 15. <i>Trichoderma</i> induce resistencia al ataque de <i>Botrytis cinerea</i>.	53
Figura 16. <i>Trichoderma</i> induce resistencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> al ataque de <i>Botrytis cinerea</i> por una señal difusible.	54
Tabla I. Inducción de resistencia en las plantas por especies de <i>Trichoderma</i>.	23

RESUMEN

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* han sido reconocidos como agentes para el biocontrol de enfermedades vegetales. En este trabajo, investigamos los mecanismos implicados en las respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. La interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Trichoderma* indujo el crecimiento vegetal y activó respuestas de defensa. Estos resultados indican que ambos procesos no son inherentemente antagonistas. Estudios de la expresión de genes de respuestas de defensa conocidos como *PR1a::GUS* y *LOX2::GUS* proporcionaron evidencia de que las respuestas de defensa estimuladas por *Trichoderma* son dependientes de ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ). Mediante el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), se muestra que ambas especies de *Trichoderma* inducen la acumulación de AS y AJ en etapas avanzadas de la interacción. Se encontró que las plantas de *Arabidopsis thaliana* cuyas raíces fueron colonizadas con *T. virens* o *T. atroviride* acumularon de 10-20 veces mayor cantidad de la fitoalexina camalexina, un compuesto con actividad antimicrobiana. Cuando *T. virens* fue cultivado en condiciones axénicas, se encontró que produce indol-3-carboxaldehído (ICALd) un reactivo para la biosíntesis de camalexina. Se realizaron experimentos para evaluar la resistencia inducida por *Trichoderma* contra el hongo patógeno *Botrytis cinerea* inoculando hojas de *Arabidopsis thaliana* con esporas de *B. cinera*. En las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *T. virens* o *T. atroviride*, la severidad de la infección se redujo significativamente en comparación con las plantas inoculadas con el patógeno. Los resultados indican que el AS, AJ y la camalexina son importantes mediadores de la inmunidad conferida por *Trichoderma* en las plantas de *Arabidopsis thaliana*. Estos resultados proporcionan también información novedosa sobre la actividad biológica de los compuestos producidos por *Trichoderma* para actuar como posibles moléculas señalizadores que estimulan respuestas de defensa en plantas.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas están continuamente bajo estrés biótico causado por diferentes ataques, incluidos los ocasionados por insectos, bacterias, virus y hongos. En la rizosfera, ocurre una amplia comunicación entre las plantas y el microorganismo a través del intercambio de diferentes clases de compuestos producidos por los microorganismos y las plantas. Este diálogo molecular determinará el resultado final de la interacción, que puede ir desde el parasitismo a la simbiosis, por lo general estas interacciones implican procesos celulares estrictamente coordinados (Pozo et al., 2005; Ortiz-Castro et al., 2009). Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son habitantes comunes de la rizosfera. Han sido ampliamente estudiados por su capacidad de producir antibióticos, parasitar a otros hongos (micoparasitismo) y por la competencia por nutrientes contra otros microorganismos rizosféricos (Harman et al., 2004). Se conoce desde hace muchos años que las especies de *Trichoderma* promueven el crecimiento y mejoran la productividad vegetal tanto en sistemas de axénicos como en el campo (Chang et al., 1986; Yedidia et al., 2001; Adams et al., 2007). Recientemente, se mostró que plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *T. virens* acumularon mayor cantidad de biomasa foliar e indujeron la formación de raíces laterales, estos efectos fueron atribuidos a la producción de auxinas por este hongo (Contreras-Cornejo et al., 2009). Los hongos del género *Trichoderma* participan en el control de enfermedades de las plantas ocasionadas por microorganismos patógenos. Los escasos reportes sobre las respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma*, muestran por ejemplo; que en plantas de pepino inoculadas con *T. harzianum* hay mayor actividad de las enzimas peroxidasa y quitinasa, proporcionando con esto evidencia que *T. harzianum* puede conferir protección contra ciertos microorganismos fitopatógenos (Yedidia et al., 1999). Recientemente, se reportó que *T. asperellum* T-34 indujo respuestas de defensa contra *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans también en plantas de pepino, la protección conferida por *T. asperellum* se correlacionó con la regulación de proteínas implicadas en respuestas de estrés, isoprenoides, biosíntesis de etileno, fotorrespiración y metabolismo de carbohidratos (Segarra et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos de señalización por los cuales las diferentes especies de *Trichoderma* activan la inmunidad de plantas siguen siendo desconocidos. Las plantas poseen diversos mecanismos de defensa inducibles para la protección contra el ataque de microorganismos fitopatógenos. Un ejemplo de ello es la resistencia sistémica adquirida (RSA), que se activa después de la infección por patógenos necrotrófos (Ryals et al., 1996). Del mismo modo, la colonización de raíces

por rizobacterias no patógenas pueden inducir resistencia sistémica (IRS) en la planta huésped (van Loon et al., 1998, Fig. 1).

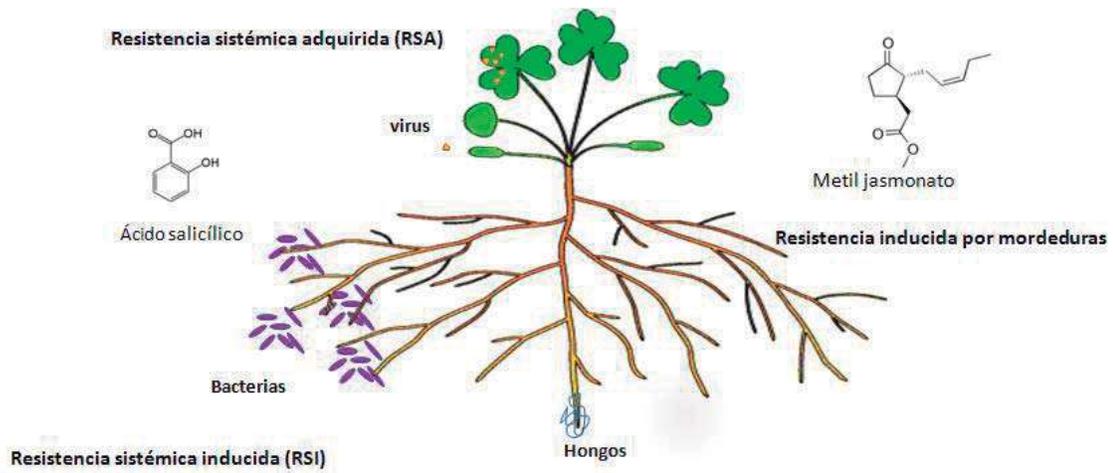


Figura 1. Respuestas de defensa clásicas mediadas por ácido salicílico y ácido jasmónico. Las respuestas de RSA y RSI pueden ser activadas por virus, bacterias y hongos, generalmente son mediadas por ácido salicílico (AS) que es producido *de novo* en los sitios infectados y es distribuido de manera sistémica para activar genes *PR*. Las respuestas de defensa inducidas por insectos masticadores son activadas por metil jasmonato (MeJA) o ácido jasmonico (AJ), sin embargo se ha mostrado que *Pseudomonas syringae* puede producir un análogo del AJ conocido como coronatina (La Camera et al., 2004).

La IRS es mediada por un mecanismo similar al de la RSA, que se inicia en la raíz y se extiende hasta el follaje, y a través de esta se confiere protección contra diferentes tipos de microorganismos fitopatógenos. En *Arabidopsis thaliana*, la RSA e IRS pueden ser reguladas por diferentes vías de señalización. La RSA activada por patógenos se asocia con un aumento local y sistémico de ácido salicílico (AS) y de una reactivación coordinada de genes que codifican proteínas relacionadas con patogénesis (*PR*) (Lawton et al., 1995). Algunas respuestas de defensa pueden activar otras rutas de señalización clásicas como las mediadas por el ácido jasmónico (AJ) o etileno (ET) (van Loon et al., 1998). Las vías de señalización que se activan por la acumulación endógena de estos mediadores son eficaces parcialmente contra distintas clases de agresores (Koornneef y Pieterse, 2008). La acumulación de metabolitos antimicrobianos y la expresión de muchos genes relacionados con las respuestas de defensa, como los que codifican proteínas PR son parte integral de protección a las plantas.

Por otro lado, las fitoalexinas son compuestos antibióticos de bajo peso molecular producidos por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos fitopatógenos (Paxton, 1981). Las estructuras químicas de las fitoalexinas pueden variar entre las diferentes familias de plantas pero por lo general incluyen: flavonoides, terpenos, e indoles (Darvill y Albersheim, 1984). Las propiedades antimicrobianas de las fitoalexinas sugieren una función potencial en los mecanismos de defensa del huésped. A pesar de que las fitoalexinas han sido ampliamente estudiadas durante muchos años, recientemente se ha reportado una participación directa contra patógenos específicos de plantas (Dixon 2001; Bednarek y Osbourn, 2009). El aislamiento y caracterización de mutantes afectadas en la producción de fitoalexinas en *Arabidopsis thaliana*, muestra que estas mutantes son susceptibles a diversos patógenos entre ellos el hongo necrotrófo *Botrytis cinerea* (Thomma et al., 1999; Ferrari et al., 2007). La principal fitoalexina que se ha detectado en *Arabidopsis thaliana* es un derivado del indol llamada camalexina (3-tiazol-2'-yl-indol) (Tsuji et al., 1992). La acumulación de camalexina se encuentra en el tejido expuesto a la infección por cepas virulentas o avirulentas de la bacteria *Pseudomonas syringae* (Tsuji et al., 1992; Glazebrook y Ausubel, 1994) y después de la inoculación con el hongo *Cochliobolus carbonum* (Glazebrook et al., 1997). En estudios *in vitro* se ha mostrado que la camalexina es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos de plantas (Jejelowo et al., 1991; Tsuji et al., 1992; Rogers et al., 1996). La biosíntesis

de camalexina en *Arabidopsis thaliana* involucra al menos dos citocromos CYP (citocromo P450). La camalexina, se sintetiza a partir de triptófano a través del intermediario indol-3-acetaldoxima, ésta es una reacción catalizada por CYP79B2 y CYP79B3 *PAD3* (Glawischnig et al., 2004). Datos basados en el fenotipo de la mutante *pad3* sugieren que este gen cataliza el paso final en la biosíntesis de camalexina (Zhou et al., 1999; Schuhegger et al., 2006). Por otro lado, se ha mostrado que la biosíntesis de camalexina puede implicar la condensación del indol-3-carboxaldehído con el aminoácido azufrado L-cisteína que continúa a la ciclación y descarboxilación (Zook y Hammerschmidt, 1997). Se ha observado que el indol-3-carboxaldehído es acumulado en la col (*Brassica oleracea*; Devys y Barbier, 1991), esto indica que la acumulación de los precursores de la camalexina es particularmente en condiciones de crecimiento o en respuesta a estrés biótico, esto podría contribuir así a la protección vegetal. *Botrytis cinerea* es el agente causal del moho gris y causa síntomas de necrosis en más de 200 especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis thaliana*. Las respuestas de defensa de *Arabidopsis thaliana* contra *B. cinerea* implican la señalización de AS y la acumulación de camalexina (Ferrari et al., 2003). Si bien muchos de los compuestos de defensa son inducidos por AS o AJ, estos mediadores de respuestas de defensa no son aparentemente esenciales para la producción de camalexina (Ferrari et al., 2007). Es posible que las primeras señales durante la interacción (óxido nítrico, peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, etc.) se integren para activar la biosíntesis de camalexina. Con base en esta información, es tentador especular que las señales capaces de regular múltiples respuestas de defensa pueden actuar en conjunto y conferir resistencia cuando las plantas son atacadas por microorganismos fitopatógenos.

Arabidopsis thaliana es un excelente modelo para el análisis de las interacciones de las plantas con *Trichoderma*. En un trabajo anterior, se estableció un sistema *in vitro* de interacción planta-hongo, que permitió el análisis detallado de algunos compuestos producidos por *T. virens* con actividad biológica en las plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009). Al utilizar el mismo sistema experimental, se investigó algunas de las rutas de señalización de *Arabidopsis thaliana* implicadas en las respuestas de defensa estimuladas por *T. virens* y *T. atroviride*. Los resultados de nuestra investigación muestran que ambas especies de *Trichoderma* inducen la acumulación de AS y AJ así como la activación de las líneas transgénicas *PR-1a::GUS* y *LOX2::GUS*, de respuesta a AS y AJ respectivamente. Mediante el uso de técnicas de bioquímica analítica se encontró que *Trichoderma* indujo la acumulación de la fitoalexina camalexina.

Interesantemente, encontramos que el incremento de camalexina se correlaciona con la producción de indol-3-carboxialdehído, un reactivo para la biosíntesis de camalexina. Por otra parte, las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *T. virens* o *T. atroviride* fueron más resistentes a desarrollar los síntomas de la enfermedad que ocasiona *Botrytis cinerea*. En conjunto, nuestros resultados muestran la participación simultánea de las rutas de señalización mediadas por AS, AJ y la acumulación de camalexina, para conferir protección contra enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos de plantas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los microorganismos de la rizosfera inducen la biosíntesis de hormonas y respuestas de defensa en las plantas.

La inoculación de las raíces de las plantas con diferentes especies de *Trichoderma* induce cambios favorables en el desarrollo del sistema radicular de diversos sistemas vegetales. Se ha observado que las plantas inoculadas con *Trichoderma* son más robustas y verdes. En plantas de maíz se determinó que las raíces inoculadas con *Trichoderma* son más ramificadas e incrementaron su tamaño, comparando estos efectos contra las plantas control (Shoresh et al., 2010). Efectos similares fueron reportados en plantas de pinos que fueron inoculados con el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* (Frankenberger y Poth, 1987) y cuando se analizaron los extractos del hongo ectomicorrícico se encontró que produjo ácido-3-indol acético. En investigaciones más recientes se reportó que plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *T. virens* acumularon mayor cantidad de biomasa foliar y este efecto se correlacionó con el incremento en el número de raíces laterales, encontrando también que *T. virens* produce tres compuestos derivados del triptófano que pueden actuar como auxinas en las plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009). Otras investigaciones muestran que plantas de algodón inoculadas con *T. virens* inducen respuestas de defensa y este fenómeno está relacionado con la liberación de un péptido pequeño denominado *small protein* (sm1). El mecanismo de defensa que este péptido activa es mediado por AJ descartando la participación de la ruta mediada por AS (Djonović et al., 2006, 2007). Sin embargo, pocos estudios existen acerca de *Trichoderma* como microorganismo iniciador de respuestas de defensa en las plantas, además éstas pueden llegar a ser distintas entre la gran variedad de especies reconocidas.

2.2. Las respuestas de defensa son activadas específicamente después del reconocimiento del microorganismo.

Investigaciones recientes de los mecanismos moleculares que son activados para inducir respuestas de defensa en las plantas muestran una alta similitud a las que son activadas en los mamíferos. En las plantas, por un lado, los productos de los genes de resistencia (*PR*) que reconocen proteínas específicas de virulencia de los patógenos (*Avr*) tienen motivos en común con el sistema de los mamíferos y con los de *Drosophila* en sus receptores (La camera et al., 2004). Por otro lado, se ha propuesto que la percepción de elicitores que activan respuestas de defensa en las plantas se debe a la interacción y reconocimiento de los patrones moleculares asociados a los microorganismos (PMAM; Boller y Yang-He, 2009). Por lo tanto esto muestra que la inmunidad innata y los eventos de reconocimiento del microorganismo con la planta están conservados en las plantas, mamíferos e insectos. En contraste, muchas de las respuestas de defensa activadas en las células vegetales hacia algún microorganismo es específico de las plantas. Investigaciones en donde se analiza el transcriptoma de plantas inoculadas con algunos microorganismos muestran una reprogramación transcripcional (Truman et al. 2007). Entre los numerosos genes cuya expresión cambia en las células infectadas están los de respuesta a patogénesis (*PR*), los cuales están asociados con el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (RSA) que codifican para proteínas antimicrobianas. Las proteínas *PR* tienen actividades deletéreas en contra de componente estructurales de los microorganismos patógenos. Los miembros de las familias *PR-1* y *PR-5* interactúan con la membrana plasmática de los hongos, mientras otros *PRs* tienen actividad de β -1, 3-glucanasa o quitinasa que atacan la pared celular de los hongos. La actividad de muchas proteínas que codifican para genes implicados en el metabolismo secundario es también afectada tras la infección por microorganismos patógenos, induciendo a cambios significativos en el contenido de los metabolitos de las plantas. En particular, los metabolismos de las oxilipinas y fenilpropanoides fueron activados y son implicados en diferentes niveles de las respuestas de defensa de las plantas.

2.3. Mecanismos implicados en la susceptibilidad y resistencia a enfermedades.

Las hormonas de las plantas están comúnmente asociadas con la regulación del crecimiento. Sin embargo, las hormonas tienen un amplio efecto sobre la fisiología de las plantas y puede ser diferencial dependiendo del tejido o de la etapa de desarrollo. Frecuentemente, las plantas también se encuentran en condiciones de estrés y algunas veces se ha observado una pausa en el proceso de crecimiento (Seilaniantz et al., 2007). Por lo tanto no es sorprendente observar que las mutantes afectadas en rutas implicadas en procesos de desarrollo muestren una respuesta alterada de defensa a los microorganismos patógenos. Por el contrario, la compleja y regulatoria red de interacciones que ocurre entre las rutas de señalización mediada por moléculas señalizadoras como: el ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido indol-3-acético, etileno, ácido abscisícico (ABA), ácido giberélico (AG) y estringolactonas sesquiterpenoides, son modificadas para activar la señalización más apropiada para limitar la proliferación del microorganismo. Un ejemplo clásico es la interacción negativa entre la resistencia a microorganismos biotrófos controlada por AS y la resistencia a microorganismos necrótrofos controlada por AJ/ET (Seilaniantz et al., 2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*DC3000) induce interacciones negativas en las plantas para descontrolar la fisiología vegetal y proliferar en el tejido. *Pst*DC3000 produce una toxina llamada coronatina, la cual mimetiza varios efectos del AJ (Feys et al., 1994). Interesantemente, cuando la mutante *sid2* afectada en la biosíntesis de AS es inoculada con la cepa *Pst*DC3000 que está afectada en la producción de coronatina (*cor-*), el patógeno crece de manera equivalente a la cepa *Pst*DC3000 silvestre. Esto sugiere fuertemente que una de las principales funciones de la coronatina es suprimir la ruta de señalización mediada por AS. En el año 2006, se sugirió otra función para la coronatina en donde se encontró que también interfiere en la señalización mediada por ABA reprimiendo el cierre estomático inducido por esta hormona (Melotto et al., 2006). Otros estudios sugieren también que la coronatina actúa después de la entrada de la bacteria en el tejido vegetal, y así funciona como un autoinductor bacteriano que estimula el crecimiento de *Pst*DC3000 en el espacio mesófilo de las hojas. La coronatina también interfiere con la ruta mediada por AS por interacción con la señalización del AJ (Shang et al., 2006). En 1990, Robinette y Matthyse mostraron que la respuesta hipersensitiva (RH) producida por infiltración de *P. syringae* pv. phaseolicola en plantas de tabaco puede ser suprimida con la condición de que si en el mismo sitio previamente han sido infiltrados *Agrobacterium tumefaciens* o *Pseudomonas savastini*. Cuando se hicieron ensayos similares al

anterior con estas dos bacterias que tenían delecciones, mostraron que la producción de auxinas es requerida para la supresión de la RH. El efecto negativo de las auxinas ha sido mostrado con cierto detalle. Navarro et al., 2006, mostró que el reconocimiento por parte de la planta de la flagelina 22 (flg22) activa la participación de un microRNA canónico (miRNA373) que contribuye para la represión de la ruta de señalización mediada por auxinas. Estos antecedentes muestran que la represión de la señalización de las auxinas es parte de la respuesta inmune de las plantas. La participación de las auxinas en las respuestas de defensa de las plantas es poco conocida, sin embargo, la inducción de genes implicados en la biosíntesis de auxinas por microorganismos biotrofos y la represión de la RH por auxinas indican la posible participación de las auxinas como reguladores negativos de la ruta mediada por AS, tal vez por la activación de la ruta mediada por AJ. Por ejemplo, se ha observado que las auxinas activan la inducción de genes implicados en la biosíntesis de AJ (Tiryaki et al., 2002). Además la mutante *arf6/arf8*, reduce la expresión de genes implicados en la biosíntesis de AJ y muestra bajos niveles de AJ en las flores, indicando que ARF6 y ARF8 y tal vez otras proteínas ARF regulan positivamente la síntesis de AJ (Nagpal et al., 2005). Recientemente se reportó que las auxinas están implicadas en la sobrevivencia de los microorganismos en condiciones de estrés (Remans et al., 2006)

La función de las citocininas en la defensa de las plantas muestra algunas similitudes a las de las auxinas. Ambos compuestos son producidos por microorganismos biotrofos. Se cree que el retardamiento de la senescencia es debido al efecto de las citocininas (Angra-Sharma et al., 1999). Las citocininas y las auxinas están implicadas en la RH. Interesantemente, en algunos casos las citocininas han sido responsables de inducir muerte celular (Seilaniantz et al., 2007).

El ácido giberélico (AG) parece tener un efecto opuesto en la defensa de las plantas. El AG promueve el crecimiento de las plantas por la inducción de la degradación de las proteínas DELLAs, las cuales son reguladores negativos del crecimiento (Harberd, 2003). Reportes recientes sugieren que las proteínas DELLAs promueven la resistencia a microorganismos necrótrofos y la susceptibilidad a microorganismos biotrofos, tal vez por la modulación del balance entre las rutas de señalización mediadas por AS y AJ/ET.

El ácido abscísico muestra una función importante en los procesos de adaptación durante condiciones de estrés. Su participación en respuestas de defensa es pobremente conocido. Recientemente, se mostró que *PstDC3000*, estimula la

producción de ABA durante los procesos de enfermedad de la planta (Truman et al., 2006), sugiriendo que el ABA es un factor de susceptibilidad para esta bacteria. En otros estudios se encontró que el ABA parece actuar como un regulador negativo de la ruta de señalización mediada por AS (Mohr, 2003).

El tratamiento con brasinoesteroides también puede afectar la inducción de las respuestas de defensa en las plantas. El tratamiento de plantas de tabaco o arroz con brasinolidos activa la resistencia contra una gran variedad de microorganismos biótrofos. Interesantemente, este incremento en la resistencia fue independiente de la ruta de señalización del AS. Por lo tanto, parece que los mecanismos por los cuales los brasinoesteroides regulan la resistencia en contra de microorganismos patógenos es diferente de la ruta del AS. La explicación puede ser debido al complejo de la interacción entre brasinoesteroides y otras hormonas (Krishna, 2003). Algunos hongos patógenos producen toxinas que se asemejan a las hormonas esteroideas como son la zearalenona. Concebiblemente, ésta y otras moléculas relacionadas, modulan la respuesta de los brasinoesteroides de manera análoga a como éstas actúan en el sistema de los esteroides en los mamíferos (Kiesling, 1986).

2.4. Participación del ácido salicílico en las respuestas de defensa.

La participación del ácido salicílico como molécula señal en respuestas de defensa local y sistémica ha sido ampliamente estudiada. El incremento de los niveles endógenos de AS y sus conjugados en plantas inoculadas con microorganismos patógenos coincide con la elevada expresión de genes que codifican para las llamadas proteínas PR (pathogenesis-related) y la activación de la resistencia a la enfermedad. Los mecanismos de señalización mediados por AS, pueden considerarse como una red compleja de señalización. Múltiples estímulos pueden activar la síntesis y señalización del AS. El AS puede unirse específicamente a una variedad de proteínas vegetales afectando su actividad (Shah, 2003; Mohr y Cahill, 2007). El AS también puede activar la expresión de genes por múltiples mecanismos y en diferentes eventos durante la señalización de las respuestas de defensa (Pieterse et al., 2001). El estado de desarrollo y condiciones ambientales, también ejercen influencia sobre la biosíntesis y señalización de AS. Los cloroplastos son importantes también en el metabolismo de biosíntesis para los precursores del AS y de algunas moléculas lipídicas que pueden servir como señal para algunas respuestas de defensa específicas. Se ha mostrado que algunas mutaciones de genes que codifican

para proteínas con actividad en los cloroplastos alteran la síntesis de AS y son más susceptibles a enfermedades, sugiriendo que los cloroplastos cumplen funciones importantes durante las interacciones patógeno-planta (Shah et al., 2003, Fig.1).

2.4.1. Biosíntesis del ácido salicílico.

Investigaciones sobre la biosíntesis de ácido salicílico sugieren dos rutas, una dependiente de fenilalanina y otra dependiente de shikimato. Interesantemente, también ha sido reportado que algunas bacterias pueden sintetizar AS a través de la vía isocorismato (Verberne et al., 1999). La ruta de shikimato proporciona corismato, el cual puede ser convertido a AS. En el cloroplasto es donde ocurre la mayor tasa de biosíntesis de corismato. El gen *SID2* (*SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2*) de *Arabidopsis thaliana* codifica para una isocorismato sintasa (ICS). Se ha propuesto que la ICS codificada por *SID2*, cataliza la conversión de corismato a isocorismato, presumiblemente en el cloroplasto. Por analogía al mecanismo de biosíntesis de AS en bacterias, se ha sugerido que una isocorismato piruvato liasa (IPL) cataliza la conversión de isocorismato a AS. Una ruta alternativa de biosíntesis de AS se ha sugerido en plantas de tabaco a partir de la ruta fenilalanina vía ácido benzoico. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza el primer paso, el cual es una conversión de fenilalanina a ácido *trans*-cinámico. El ácido *trans*-cinámico es consecuentemente convertido a ácido benzoico. Una ácido benzoico-2-hidroxilasa (BA2H) cataliza el paso final de ácido benzoico a AS (Shah, 2003). Por otro lado, las plantas pueden conjugar el AS libre con azúcares como la glucosa o metil-esterificarlo, sin embargo también puede existir AS glicosado y metil-esterificado (Fig. 1).

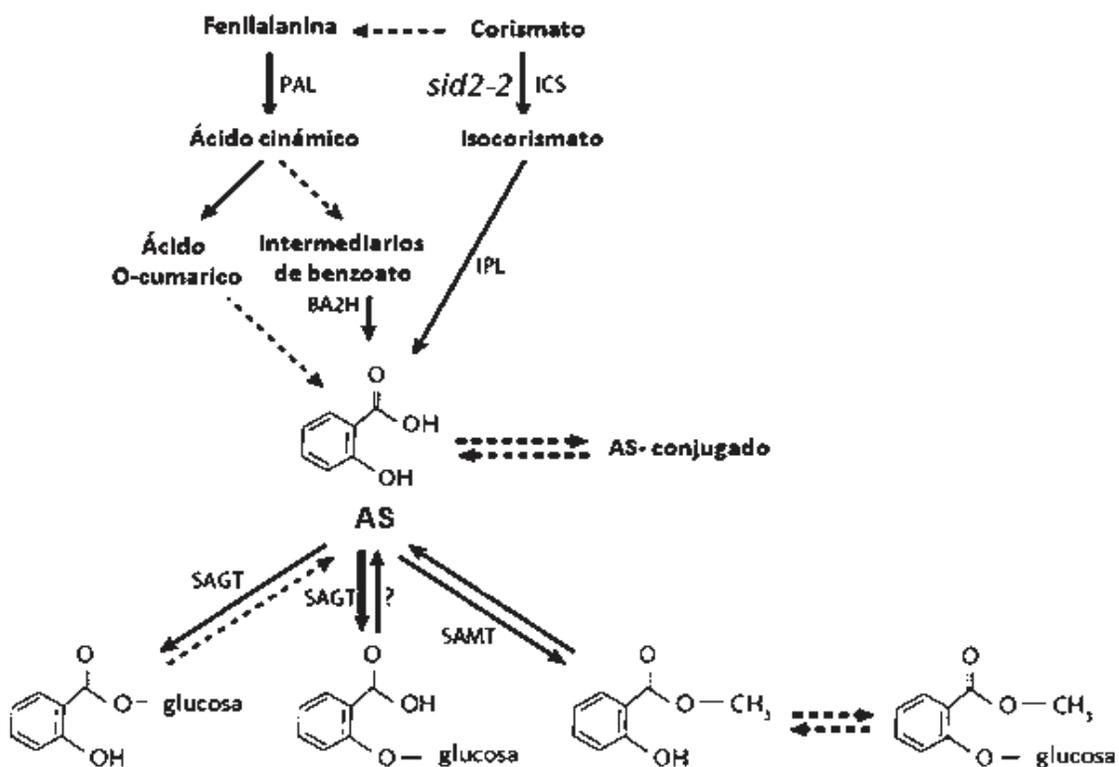


Figura 2. Rutas de biosíntesis de ácido salicílico. La imagen muestra las rutas de biosíntesis dependientes de fenilalanina vía ácido benzoico y la ruta alternativa dependiente de corismato vía isocorismato. PAL: fenilalanina amonio liasa. BA2H: ácido benzoico 2-hidroxilasa. ICS: isocorimato sintasa. IPL: isocorismato piruvato liasa. SAGT: Ácido salicílico glicosil transferasa. SAMT: Ácido salicílico metil transfererasa. *sid2-2*: Mutante de *Arabidopsis thaliana* efectada en la enzima isocorimato sintasa (Shah, 2003).

2.4.2. Vías de señalización del ácido salicílico.

Las hormonas vegetales AS, AJ y ET son las principales mediadoras durante las redes de señalización implicadas en las respuestas de defensa contra microorganismos benéficos, patógenos o insectos. En la última década, importantes avances se lograron en el estudio de los mecanismos mediados por AS para comprender la función del modulador de respuestas de defensa conocido como NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1). NPR1 un regulador clave de la resistencia sistémica adquirida (RSA), que es esencial para traducir la señal generada por el AS y activar la expresión del gen *PR-1* (*PATHOGENESIS-RELATED 1*) que codifica para una proteína antimicrobiana. En *Arabidopsis thaliana*, se ha mostrado que después de una infección, las plantas acumulan cantidades considerables de AS, este fenómeno induce cambios redox en el citoplasma. La forma inactiva de NPR1 es cuando se encuentra formando un oligómero (trímero), cuya unión se logra a través de las cisteínas de cada monómero. Durante los cambios redox que ocurren en el citoplasma que se oxidan las cisteínas de los trímeros, liberando a los monómeros de NPR1 que constituyen la forma reducida y activa de este factor transcripcional que posteriormente es translocado al núcleo, en el núcleo NPR1 funciona como un co-activador transcripcional uniéndose a los factores transcripcionales del gen *PR-1*. El AS, regula la participación de NPR1 y su unión a TGA1, un miembro de la familia TGA de factores transcripcionales que activan elementos de respuesta a AS en los promotores de los genes *PR* tras la unión con NPR1. Por otro lado, también existen evidencias de que el gen *PR-1* puede ser activado a través de un mecanismo independiente de NPR1, sin embargo, el mecanismo no está aún elucidado completamente (Pieterse y Van Loon, 2004).

2.5. Participación del ácido jasmónico (AJ) en las respuestas de defensa.

La señalización del AJ puede ser activada por un amplio rango de estreses incluyendo el estrés osmótico, daño por herbivoría, sequía y exposición a elicitores como: quitinasas, oligosacáridos, oligogalacturónidos y extractos de levadura (Turner et al., 2002). La biosíntesis de AJ en *Arabidopsis thaliana* es regulada por las señales que se originan en los estambres en desarrollo, en donde el AJ es requerido para el desarrollo y producción de polen. Existen evidencias de que las proteínas cinasas (ej:

Mitogen-activated protein kinase 4; MPK4) suprimen la ruta de biosíntesis del AS y promueven la expresión de genes de respuesta a AJ tal es el caso del gen *PDF1.2* que codifica para una proteína con actividad antimicrobiana mejor conocida como defensina (La Camera et al., 2004).

2.5.1. Biosíntesis del ácido jasmónico.

La biosíntesis de AJ involucra la participación de por lo menos cinco genes que codifican para enzimas clasificadas dentro de la familia de los citocromos P450, los productos de las cuales se encuentran principalmente en el cloroplasto. Estos productos son modificados por procesos de β -oxidación en el peroxisoma resultando finalmente en la biosíntesis de AJ, el cual es modificado en el citoplasma. Comúnmente el AJ es metilado por la acción de una enzima conocida como ácido jasmónico metil transferasa (AJMT). En *Arabidopsis thaliana* se ha sugerido que el AJ implicado en procesos de desarrollo es sintetizado de una ruta diferente al del AJ que esta involucrado en respuestas de defensa activadas por herbivoría (Turner et al., 2002, Fig. 2)

2.5.2. Participación de las lipoxigenasas en la biosíntesis de ácido jasmónico.

Los múltiples productos de oxidación primaria de ácidos grasos para la producción de 9 ó 13-hidroperóxidos son complejos, pero estos hidroperóxidos posteriormente pueden ser metabolizados por una serie de enzimas de distintas rutas metabólicas. Los impactos fisiológicos de los hidroperóxidos en las respuestas de defensa son conocidas con cierto detalle. En reacciones secundarias, las lipoxigenasas (LOXs) son capaces de deshidratar los hidroperóxidos a ácidos grasos cetodienoicos. La peroxigenasa es la única hemo-oxidasa que cataliza reacciones de co-oxidación formando ácidos grasos epoxy o dihidrodioles (La Camera et al., 2004). Estos precursores también son sustratos potenciales para la biosíntesis de cutina en algunas especies de plantas (Turner et al., 2002). La epoxy alcohol sintasa ha sido pobremente estudiada pero se conoce que forma ácidos grasos epoxy-hidroxidados a través de rearreglos intramoleculares de los ácidos grasos hidroperoxidados (La Camera et al., 2004; Browse, 2009). Las otras tres enzimas cuyos sustratos son ácidos grasos hidroperoxidados son la aleno oxido sintasa (AOS), hidroperóxido liasa (HPL) y divinal

éter estearasa (DES). Dichas enzimas son estructuralmente relacionadas y constituyen un grupo atípico de enzimas relacionadas con los citocromos P450 (CYP74) que no requieren una reductasa dependiente de nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno para su catálisis (Browse, 2009). Las tres enzimas utilizan un intermediario carbocatión reactivo, pero los productos finales son muy diferentes (Turner et al., 2002). La AOS fue la primera enzima descubierta en 1993 y ha sido estudiada por varios años en muchas especies de plantas y se considera que es crucial para la síntesis de AJ. El AJ en las plantas es semejante a las prostaglandinas en los mamíferos. El AJ es considerado como una de las principales moléculas señal en las plantas por su función en respuestas de defensa y procesos de desarrollo (Turner et al., 2002, La Camera et al., 2004, Browse, 2009, Fig. 2).

2.5.3. Biosíntesis de oxilipinas en las plantas.

Aunque existe clara evidencia de la acumulación de ácidos grasos durante las interacciones planta-microorganismo que fue propuesta hace más de una década, la complejidad de las rutas de biosíntesis y la diversidad de las actividades biológicas de las oxilipinas de las plantas fue descubierto recientemente. Las fitooxilipinas son sintetizadas enzimáticamente a partir de los ácidos grasos poliinsaturados a través de tres vías principalmente: I. La ruta de las LOXs, la cual ha sido la única ruta enzimática de oxidación, II. A través de citocromos P450 que se localizan en el retículo endoplasmático que catalizan la ω -hidroxilación de ácidos grasos, y III. La participación de una α -dioxigenasa que muestra similitud con las ciclooxigenasas que catalizan la α -oxigenación de los ácidos grasos. En adición algunos derivados tipo isoprostano (denominados fitoprostanos) producidos por mecanismos catalizados por radicales libres han sido identificados en las plantas. En contraste a los animales, los cuales utilizan ácido araquidónico (C20:4) como precursor para la biosíntesis de eicosanoides, las oxilipinas de las plantas se derivan principalmente del ácido linolénico (C18:3) y el ácido hexadecatrienoico (C16:3). Dichos ácidos grasos están presentes en fosfolípidos, pero una abundante fuente de ácidos grasos poliinsaturados se encuentra en los galactolípidos del cloroplasto. De hecho distintas rutas de biosíntesis de oxilipinas extra-cloroplásticas y cloroplásticas también se han reportado y producen una amplia variedad de compuestos derivados bioactivos (La Camera et al., 2004). Una gran variedad de estas rutas son inducidas diferencialmente en respuesta a estímulos ambientales, pero las actividades de específicas oxilipinas

específicas también han sido reportadas en procesos de desarrollo. El perfil de oxilipinas en las plantas depende del género y especies vegetales, así como el tipo de estrés que este participando. Se ha encontrado que numerosas isoformas de las LOXs vegetales se acumulan en etapas de desarrollo vegetal en tejidos como, flores, semillas maduras, o en semillas en proceso de germinación (Turner et al., 2002). Las LOXs vegetales catalizan la adición de oxígeno en los ácidos grasos mostrando un motivo 1, 4-pentadieno como en el caso de los ácidos linoleico y linolénico. Con estos sustratos, la actividad de las LOXs es región-específica, por ejemplo para los 9 ó 13-hidroperóxidos se ha observado que las 9-LOX ó 13-LOX son específicas respectivamente. Las determinantes moleculares de esta especificidad han sido identificadas y en plantas de pepino en donde una 13-LOX puede ser convertida a una 9-LOX en una sola mutación (La Camera et al., 2004). Por otro lado, las oxilipinas vegetales se producen en respuesta a las agresiones bióticas, en donde por la acción de acil-hidrolasas lipídicas remueven lípidos estructurales y estos ácidos grasos pueden ser oxidados por la actividad de las LOXs para producir intermediarios que pueden servir para otras rutas o generar compuestos antimicrobianos, citotóxicos o moléculas señalizadoras.

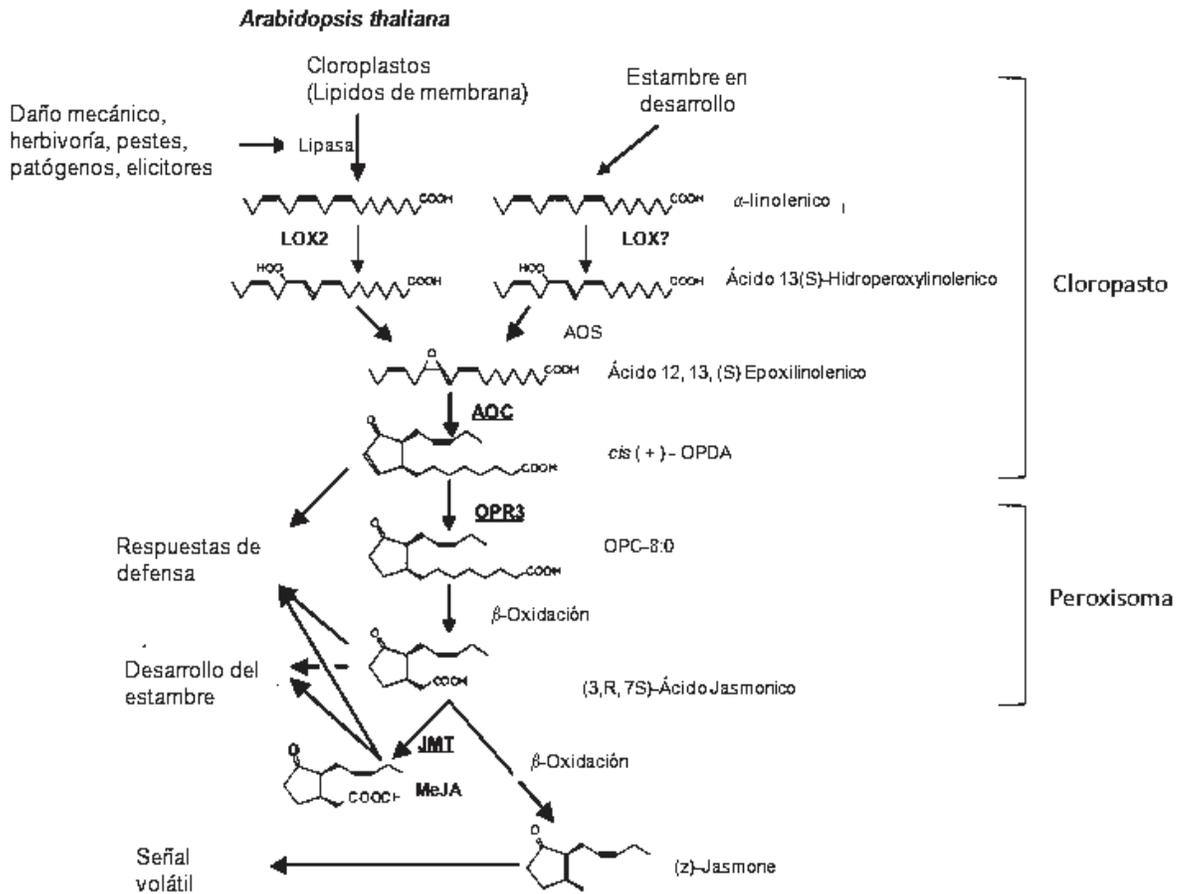


Figura 3. Ruta de biosíntesis de ácido jasmónico. El AJ se produce después de varios tipos de estrés como el daño por herbívora, infección por microorganismos rizosféricos y sustancias (elicitores) secretadas por insectos. En *Arabidopsis thaliana* diferentes estreses activan la biosíntesis de AJ vía LOX2. En procesos de desarrollo el AJ acumulado como molécula señal que puede actuar de manera sinérgica con las auxinas implica la participación de una lipoxigenasa análoga a LOX2. La biosíntesis de AJ ocurre tras la transformación del ácido linolénico (18:3) en dos sitios de la célula que son el cloroplasto y el peroxisoma en donde se lleva a cabo la β -oxidación. Una vez sintetizado el AJ puede ser modificado para formar metil-jasmonato o jasmone que son señales volátiles en la comunicación planta-planta. AOS: Aleno óxido sintasa. AOC: Aleno óxido ciclasa. OPDA: ácido (9S, 13S)-12-oxo-cis-10, 15-fitodienoico. OPR3: OPDA-reductasa. OPC: ácido 3-oxo-2-(cis-2'-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico. JMT: ácido jasmónico metil transferasea (Turner et al., 2002).

2.6. Respuestas de defensa mediadas por fitoalexinas.

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, cuya producción se activa en las plantas en respuesta a la infección por microorganismos patógenos o el tratamiento con varios elicitores químicos (ejemplo AgNO_3). La producción de fitoalexinas depende de la activación de un grupo particular de genes de biosíntesis que son citocromos P450. La producción de fitoalexinas es una de las más rápidas respuestas de defensa tras el estímulo por algún microorganismo patógeno. Aunque muchas fitoalexinas poseen clara actividad antimicrobiana *in vitro*, su papel en las respuestas de defensa no ha sido completamente elucidado (Thomma et al., 1999). Se ha observado que las fitoalexinas son acumuladas tras la infección alrededor de los sitios lesionados (Darvill y Albershem, 1984). En el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, un compuesto derivado del indol conocido como camalexina (3-tiazol-2'-yl-indol), es la principal fitoalexina que aparece después de la infección por *PstDC3000* (Tsuji et al., 1992). *In vitro*, esta fitoalexina ha mostrado ser un potente inhibidor del crecimiento de *PstDC3000*, *Cladosporium cucumerium* (Tsuji et al., 1992) y de la germinación de esporas de *Alternaria brassicae* (Browne et al., 1991). En *Arabidopsis thaliana* se han aislado varias mutantes que producen bajos niveles de camalexina conocidas como *phytoalexin-deficient* (*pad1-1*, *pad2-1*, *pad3-1*, *pad4-1* y *pad5-1*). Estas mutantes pueden ser útiles para estudiar la importancia o participación de las fitoalexinas en las respuestas de defensa en las plantas tras la infección de microorganismos. Investigaciones recientes muestran que *PAD3* codifica para un citocromo P450, que se asemeja a una enzima de maíz implicada en la producción de una fitoalexina derivada del indol, sugiriendo así que *pad3-1* es una mutante afectada en la biosíntesis de camalexina (Thomma et al., 1999).

2.6.1. Biosíntesis de camalexina.

Una característica de las plantas crucíferas es la producción de fitoalexinas que contienen nitrógeno y azufre en sus estructuras. Estos compuestos poseen actividad antimicrobiana y anticancerígena. En *Arabidopsis thaliana* se ha propuesto que la camalexina es sintetizada en una reacción de condensación entre el indol-3-carboxaldehído (ICALd) y la cisteína, cuya reacción es impulsada por $\text{NADP} \rightarrow \text{NAPH} + \text{H}$ en la cual hay liberación de H_2O y CO_2 (Zook y Hammerschmidt,

1997, Fig. 3). Recientemente se reportó que la camalexina es sintetizada a partir de una ruta dependiente de triptófano vía indol-3-acetaldoxima (IAOx), la cual es una reacción catalizada por dos citocromos conocidos como CYP79B2 y CYP79B3, el IAOx también puede ser utilizado por las plantas para la biosíntesis de indolglucosinolatos y de ácido indol-3-acético (Glawischnig et al., 2004).

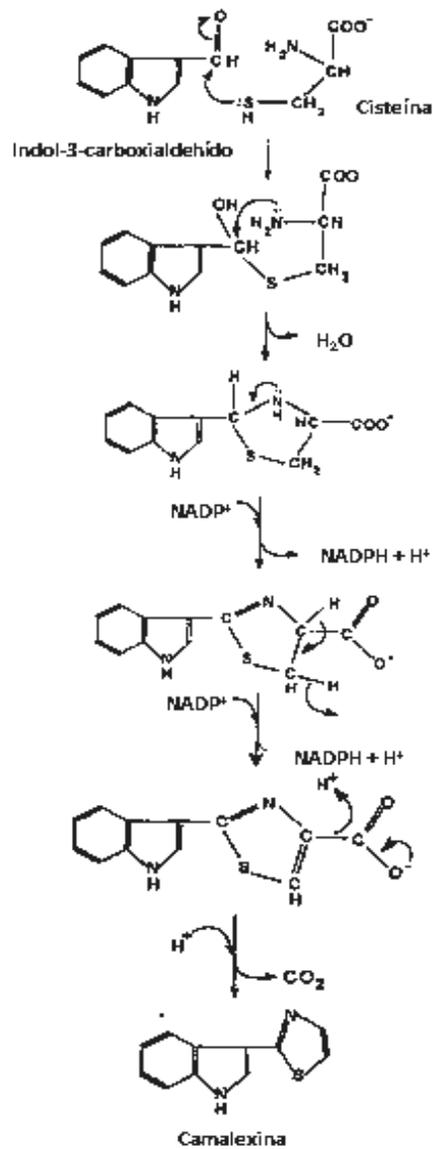


Figura 3. Mecanismo molecular para la biosíntesis de camalexina a partir de la reacción de condensación del indol-3-carboxaldehído y la cisteína (Zook y Hammerschmidt, 1997).

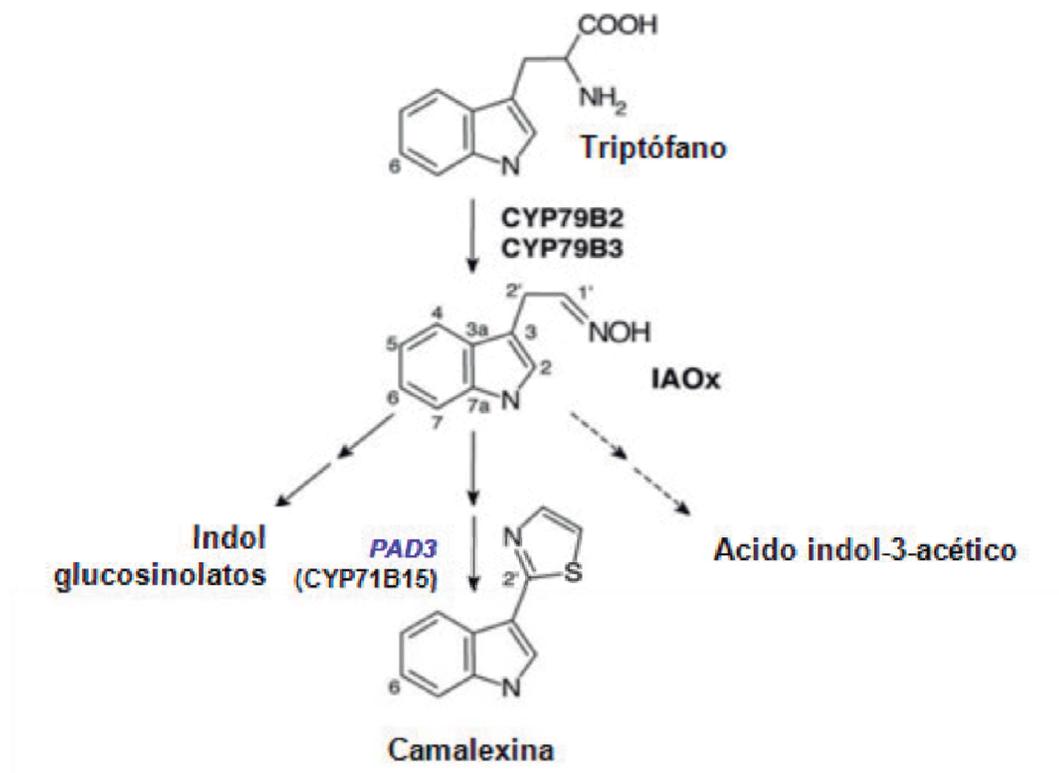


Figura 4. Mecanismo molecular para la biosíntesis de camalexina a partir de indol-3-acetaldoxima (IAOx). El IAOx puede ser transformado en la planta en indol glucosinolatos o en ácido indol-3-acético (Glawischnig et al., 2004).

2.7. El género de hongos *Trichoderma*.

Trichoderma es un género de hongos de reproducción asexual, que a menudo son aislados del suelo. Las especies de *Trichoderma* están presentes en casi todos los tipos de suelos, por ejemplo los suelos tropicales y templados contienen $\sim 10^1$ - 10^3 propágulos viables por gramo. Estos hongos también son capaces de colonizar las raíces de las plantas y materiales herbáceos. Sin embargo, a muchas especies incluyendo las que se utilizan para el biocontrol no se les conoce el estado sexual de reproducción (Harman et al., 1998). Las especies de *Trichoderma* muestran un alto nivel de diversidad genética y pueden ser usados para producir un amplio rango de productos de interés comercial y ecológico. Se ha mostrado que las especies de *Trichoderma* son productoras prolíficas de proteínas extracelulares y son bien conocidas por su habilidad para producir enzimas que degradan celulosa y quitina, aunque también producen otras enzimas útiles. *Trichoderma* es bien conocido como parásito de otros hongos. De los exudados de *Trichoderma* se han caracterizado más de 100 metabolitos con actividades antibióticas (Sivasithamparam et al., 1998).

Trichoderma ha sido ampliamente utilizado como agente para el control de enfermedades vegetales y por sus habilidades de incrementar el crecimiento y desarrollo de estas, así como también son adecuadamente usadas en la horticultura. Algunas especies de *Trichoderma* muestran la propiedad conocida como competencia por la rizosfera, que es la habilidad para colonizar las plantas y crecer en asociación con las raíces de las plantas (Harman, 2000). Muchos de los conocimientos biológicos y de los usos de *Trichoderma* han sido documentados recientemente. La taxonomía de estos hongos está siendo revisada significativamente y muchas nuevas especies han sido reconocidas (Harman et al., 2004).

2.7.1. Interacción de *Trichoderma* con las plantas.

Trichoderma puede proliferar, competir y sobrevivir en los suelos de ecosistemas complejos. Durante la interacción *Trichoderma*-planta, el hongo puede colonizar las raíces e incrementar la biomasa radicular cuando éstas son sanas. Las respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma* en las plantas pueden proceder a una respuesta sistémica y proteger a la planta entera de un amplio rango de microorganismos patógenos. Interacciones similares han ocurrido con otros hongos y bacterias,

incluyendo especies avirulentas de patógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Harman et al., 2004). Los microorganismos de la rizosfera entre ellos *Trichoderma*, han mostrado poseer muchas habilidades para afectar la productividad de la planta y repercutir positivamente sobre su metabolismo; esto puede ser aprovechado mucho más eficientemente con una mejor comprensión sobre los mecanismos y sistemas que operan en las interacciones *Trichoderma*-planta.

Descubrimientos recientes muestran que las especies de *Trichoderma* son oportunistas, simbiontes avirulentos de las plantas (Harman et al., 2004). Interesantemente, se ha observado que la aplicación de esporas de *Trichoderma* sobre frutos, flores y follaje puede controlar las enfermedades en dichos sitios (Harman et al., 2004). Existen algunas especies que establecen colonizaciones duraderas y robustas sobre las superficies radiculares, llegando incluso a penetrar la epidermis y la corteza, siendo en este aspecto semejante a los hongos micorrícicos. También se ha mostrado que *Trichoderma* produce una variedad de compuestos que inducen respuestas de resistencia local y sistémica en diferentes modelos vegetales, explicando con esto su avirulencia. Estas asociaciones raíz-microorganismo, causan importantes cambios en el proteoma y metabolismo de la planta. Las plantas se defienden en contra de numerosos tipos de patógenos a través de respuestas semejantes a la resistencia sistémica adquirida o la resistencia sistémica inducida por rizobacterias. La colonización de *Trichoderma*, frecuentemente también estimula el crecimiento y desarrollo de la raíz repercutiendo en la productividad postcosecha, resistencia a estrés abiótico, captación y utilización de nutrientes (Harman et al., 2004; Contreras- Cornejo et al., 2009).

Se ha mostrado que diversas especies de *Trichoderma* pueden competir contra hongos fitopatógenos por exudados de las semillas en proceso de germinación, dichos compuestos son utilizados para el desarrollo de los propágulos en el suelo (Howell, 2002). Las especies de *Trichoderma*, también pueden competir contra microorganismos del suelo por nutrientes y/o espacio (Elad, 1996). *Trichoderma* también puede inhibir y degradar pectinasas y otras enzimas que son esenciales para los hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* para penetrar las superficies de las hojas (Zimand et al., 1996). Los efectos directos de *Trichoderma* sobre otros hongos son complejos y recientemente son considerados como las bases por las cuales *Trichoderma* ejerce efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Investigaciones sobre estos temas han generado un amplio cuerpo de conocimientos, incluyendo el aislamiento y la clonación de una gran cantidad de genes que codifican

para proteínas de las cuales algunas tienen actividad antimicrobiana (Harman et al., 2004).

2.8. *Trichoderma* induce respuestas de defensa en las plantas.

Se conoce que *Trichoderma* puede colonizar las raíces de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Este fenómeno induce cambios en el proteoma de la planta, entre las que se incluyen las respuestas de defensa. Algunas especies de *Trichoderma* inducen la acumulación de fitoalexinas o la expresión de genes implicados en la síntesis de moléculas señalizadoras como AS, AJ o ET (Harman et al., 2004; Djonovic et al, 2006, 2007). Las respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma* pueden ser dependientes del estímulo de compuestos químicos de bajo peso molecular o péptidos difusibles o por el contacto físico y el reconocimiento de las proteínas Avr.

2.8.1. Elicidores bioquímicos para la resistencia a enfermedades.

Se conocen tres clases de compuestos que son producidos por las especies de *Trichoderma* que inducen resistencia en las plantas. Estas son proteínas con actividad enzimática u otras funciones, homólogos de proteínas codificadas por genes de avirulencia y oligosacáridos de bajo peso molecular que son liberados de la pared celular de hongo (Harman et al., 2004).

2.8.2. Proteínas con actividad enzimática y otras funciones.

Existe evidencia de que *Trichoderma* induce respuestas de defensa en las plantas por que la liberación de una xilanasas de 22-kDa que es responsable de la emisión de etileno y (Fuchs et al., 1989; Lotan y Fluhr, 1990). Interesantemente esta pequeña proteína es translocada a través del sistema vascular de las plantas de tabaco cuando es introducida en los peciolo de las hojas y bajo estas condiciones induce respuestas de defensa local. De manera similar una serie de proteínas y péptidos activos en las plantas indujeron la acumulación de terpenos, fitoalexinas y la activación de la peroxidasa en plantas de algodón inoculadas con *T. virens* (Hanson y Howell, 2004). También se reportó que *T. virens* produce un péptido pequeño conocido como (small protein) *sm1* que induce respuestas de defensa en plantas de algodón y maíz, cuyo mecanismo de defensa es dependiente de AJ (Djonović et al., 2006, 2007).

2.8.3. Homólogos Avr.

Los productos de los genes Avr han sido bien identificados en una gran variedad de hongos y bacterias patógenos de plantas. Generalmente son elicitores específicos dependiendo de las especies de hongos y cepas bacterianas así como de los sistemas vegetales y son capaces de inducir respuestas de defensa específicas (Backer et al., 1997). El análisis del proteoma de *T. harzianum* permitió la identificación de homólogos Avr4 y Avr9 de *Cladosporium fulvum* (Harman et al., 2004).

2.8.4. Oligosacáridos y compuestos de bajo peso molecular.

Se han aislado algunas líneas transgénicas de *Trichoderma* que fueron transformadas con sistemas reporteros que están basados en la proteína verde fluorescente o actividades enzimáticas específicas (glucosa oxidasa) bajo el control de promotores implicados en el biocontrol. Esto ha permitido el aislamiento y caracterización de moléculas bioactivas que son liberadas por la acción de las enzimas degradadoras de pared celular de los hongos patógenos o de las plantas (Tabla I). Estas moléculas que son producidas durante múltiples interacciones que ocurren en la naturaleza entre *Trichoderma*, hongos patógenos y las raíces de las plantas funcionan como inductores de respuestas de defensa en las plantas (Kubicek et al., 2001).

Tabla I. Inducción de resistencia en las plantas por especies de *Trichoderma*.

Especies	Modelo vegetal	Microorganismo patógeno	Efectos	Tiempo después de la aplicación	Eficacia
<i>T. virens</i> G-6, G-6-5 y G-11	algodón	<i>Rhizoctonia solani</i>	Protección de las plantas; inducción de fngitoxinas y fitoalexinas terpenoides	4 días	78% reducción de de la enfermedad; habilidad para inducir fitoalexinas para una máxima actividad de biocontrol
<i>T. harzianum</i> T-39	Frijol	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>	Protección de las hojas cuando T-39 estuvo presente en las hojas solamente	10 días	42% de reducción en el área lesionada; se redujo el numero de lesiones
<i>T. asperellum</i> T-203	Pepino	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Protección de las hojas solamente cuando T-203 estuvo presente en las raíces; producción de compuestos antifúngicos en las hojas	5 días	Reducción de la enfermedad de las hojas por arriba del 80%.
<i>T. atroviride</i> P1	Frijol	<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>phaseoli</i>	Protección de las hojas cuando T-22 o P1 estuvieron presentes en la raíz; producción de compuestos antifúngicos	7-10 días	69% de pudrición (inducida por <i>B. cinerea</i>) con T-22; bajo nivel de control con P1 54% de reducción de los síntomas inducidos por la bacteria.
<i>T. harzianum</i> NF-9	Arroz	<i>Magnaporthe grisea</i> ; <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Protección de las hojas cuando NF-9 estuvo presente solamente en las raíces	14 días	34-50% de reducción de la enfermedad.

Fuente de la información: Harman et al., 2004.

3. JUSTIFICACIÓN.

Trichoderma es un género de hongos utilizados como biofertilizantes; sin embargo, los mecanismos para la inducción de respuestas de defensa han sido poco estudiados. El avance en el conocimiento sobre dichos procesos permitirá que la aplicación de estos se optimice para la protección de las plantas contra patógenos.

4. HIPÓTESIS.

Los hongos del género *Trichoderma* estimulan respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* y confieren protección contra *Botrytis cinerea*.

5. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar las respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* inducidas por *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Caracterizar los efectos de la inoculación de *Arabidopsis thaliana* con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* en la producción de biomasa total y la acumulación de antocianinas.
2. Determinar los efectos de la inoculación con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* en la acumulación de ácido salicílico y ácido jasmónico en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
3. Investigar los efectos de la inoculación con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* sobre la expresión de genes implicados en respuestas de defensa mediados por ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ).
4. Cuantificar la acumulación de camalexina en plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*.
5. Determinar la resistencia conferida por *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* contra *Botrytis cinerea* en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Para los diferentes experimentos se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las líneas transgénicas y la mutante que se utilizaron se obtuvieron también de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0. Las líneas reporteras que se utilizaron fueron: *PR-1a::GUS* inducible por AS (Shah et al., 1997) y *LOX2::GUS* inducible por AJ (Schommer et al., 2008) y la mutante *sid2-2* afectada en la producción de ácido salicílico (Dewdney et al., 2000). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se desinfectaron superficialmente con un 95% (v/v) de etanol durante 5 min y 20% (v/v) de blanqueador comercial durante 7 min. Después de este procedimiento las plantas se lavaron cinco veces con agua destilada, las semillas se germinaron y cultivadas en placas petri con agar que contenía medio MS (Murashige y Skoog mezcla de sales basales, Cat M5524: Sigma, St. Louis) al 0.2X. Las placas se colocaron verticalmente en un ángulo de 65 grados para permitir el crecimiento de las raíces a lo largo de la superficie del agar y el crecimiento aéreo de los hipocotílos. Las placas de petri se colocaron en una cámara de crecimiento de plantas con las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, intensidad de luz de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 24°C.

6.2. Especies de *Trichoderma* y experimentos de inoculación.

Las siguientes especies de *Trichoderma* fueron usadas en este trabajo: *Trichoderma virens* Gv.29-8 y *Trichoderma atroviride* (anteriormente conocido como *Trichoderma harzianum*) IMI 206040. *T. virens* y *T. atroviride* fueron evaluados *in vitro* para investigar su capacidad de inducir respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana*. El inóculo de *Trichoderma* en las placas petri que contenían las plantas fue de una densidad de 1×10^6 esporas y se colocaron 4 cm por debajo de las raíces de plantas de 4-días de edad (20 plantas por placa). Las placas fueron colocadas completamente al azar. Las plantas se cultivaron por diferentes períodos de tiempo (2, 4, 6 y 8 días) en una cámara de crecimiento AR95L Percival. Los porcentajes de las raíces primarias colonizadas por *Trichoderma* fueron determinados con una regla midiendo la longitud de la raíz primaria y la superficie cubierta por hifas fúngicas.

6.3. Análisis histoquímico.

Para el análisis histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa (GUS), las plantas de *Arabidopsis thaliana* después del tratamiento se incubaron de 12 a 14 horas a 37°C en un buffer de reacción para la β -glucuronidasa (0,5 mg/ml de D-glucurónido en 100 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato de sodio, pH 7). Las plántulas fueron clarificadas con el método descrito por Malamy y Benfey (1997). Para cada línea reportera y para cada tratamiento, al menos 20 plantas transgénicas fueron analizadas. Una planta representativa de cada tratamiento fue elegida y fotografiada, utilizando un microscopio estereoscópico Leica MZ6.

6.4. Determinación de antocianinas.

El contenido de antocianinas se determinó en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) a los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación con diferentes densidades de inóculo de 1×10^1 , 1×10^3 y 1×10^6 esporas de *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. Al término de cada período se pesaron 100 mg de tejido de tratamiento y colocados en un tubo eppendorf, posteriormente se añadió 1 ml de HCl 0.1% en metanol durante 48 horas a 4°C en oscuridad para extraer las antocianinas por maceración. Después de este período los extractos metanólicos se analizaron en un espectrofotómetro a 530 nm y 657nm. La cantidad de antocianinas se calculó mediante la fórmula $A_{530} - (0.3A_{657})$ según lo descrito por Bate y Rothstein (1998). Cada experimento se hizo por lo menos cuatro veces.

6.5. Extracción y medición de ácido salicílico y ácido jasmónico.

La extracción y cuantificación de ácido salicílico y ácido jasmónico libres se realizó de la zona foliar de *Arabidopsis thaliana* a los 8 días después de la inoculación con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. Para la preparación de las muestras, las plantas fueron seccionadas entre la raíz y el follaje. Posteriormente, de 30 a 100 mg del tejido foliar fue molido hasta obtener un polvo fino con N_2 líquido y fueron transferidos a un tubo eppendorf en donde se le agregaron 300 μ l de isopropanol/ H_2O /HCl concentrado (2:1:0.002, v/v) y 200 ng de ácido orto-anísico (AO; Sigma) como estándar interno para cuantificar el AS, al término de este procedimiento

se agitaron los tubos durante 30 s. Los tubos se centrifugaron a 11,500 rpm durante 3 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le añadió 200 μ L de diclorometano y se agitó por 30 s, posteriormente la fase del diclorometano fue transferida a un reactivial y llevado a sequedad total para ser derivatizado. A la muestra se le añadieron 500 μ l de cloruro de acilo en 2 ml de MeOH y fueron sonicados por 15 min. Al término de este periodo fueron calentados a 75°C por 1 h. Posteriormente la muestra fue enfriada y secada totalmente con N₂ gaseoso y añadidos 20 μ l de acetato de etilo para el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Para la cuantificación de ácido salicílico metil esterificado (AS-ME) se monitoreó el ión m/z 152 y el tiempo de retención (2.3 min) y para el estándar interno ácido orto-anísico metil esterificado (OA-ME; 3.2 min, m/z 166), respectivamente. Las cantidades de ácido jasmónico metil esterificado (AJ-ME) se calcularon haciendo una curva estándar. Este procedimiento se realizó cuatro veces para cada tratamiento.

6.6. Determinación de camalexina.

La camalexina fue extraída de plantas de *Arabidopsis thaliana* 8 días después de la inoculación con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. Como control positivo para la inducción de camalexina, se trataron plantas de 12 días con 5mM de AgNO₃ durante 12 h. En los experimentos para evaluar la participación del indol-3-carboxaldehído (ICALd) en la acumulación de camalexina, plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) fueron sembradas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con 150, 300 y 600 μ M de ICALd durante 15 días. Al término de este tiempo la camalexina fue extraída. Se utilizaron dos métodos para evaluar los niveles de camalexina, según lo descrito por Glazebrook y Ausubel (1994) y el análisis por GC-MS. La extracción de camalexina se llevó a cabo a partir de 100 mg de tejido colocados en un tubo eppendorf que se le añadió 800 μ l de metanol puro y se mantuvo a 80°C durante 20 min. El sobrenadante se transfirió a un vial y se evaporó a sequedad total bajo una corriente de N₂ gaseoso y la muestra fue redissuelta en 10 μ l de metanol para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas creando un método de selección de iones moleculares (GC-MS-SIM). El volumen de muestra inyectado fue de 2 μ l. Los iones moleculares con los que la camalexina fue monitoreada fueron m/z 58, 142 y 200. El tiempo de retención de la camalexina fue de 18.0 min. La camalexina fue cuantificada con una curva estándar hecha con

camalexina obtenida por síntesis química y disuelta en metanol para el análisis químico.

6.7. Análisis de la expresión de los genes *PAD3* y *NPR1* de *Arabidopsis thaliana*.

La expresión de los genes *PAD3* y *NPR1* durante la colonización radicular de *Arabidopsis thaliana* por *Trichoderma virens* fue analizado a los 8 días después de la inoculación con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fue extraído RNA total utilizando el método descrito para TRizol (Invitrogen). Las reacciones en cadena de la polimerasa utilizando la retrotranscriptasa (RT-PCR) fueron hechos con el kit superindex Platino III SYBR Green en un solo paso RT-PCR (Invitrogen). El programa de ciclos térmicos para *PAD3* fue el siguiente: 50°C durante 30 min y 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min, y una fase de disociación de un ciclo de 95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 s. Los cebadores utilizados fueron: 5'-CGT CGT CCC CGC GAT GGT CTC TTC G-3' y 5'-TGC CAG CTC CGA CAA CAC TCC CTG 3-C' para *PAD3*. El programa de ciclos térmicos para *NPR1* fue el siguiente: 50°C durante 30 min y 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 50°C durante 1 min, y una fase de disociación de un ciclo de 95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 s. Los cebadores utilizados para *NPR1* fueron: 5'-GGA GAG CAA AGA GAC GAT CAG GG-3' y 5'-TGG CGG CTT CAA ACC CGT ACG-3' y 5'-AGA GGA AGA AGA CTT ACA CC -3' y 5'-AGT CAC TTA CCA CCA CAG AT-3'. El gen *UBQ5* se utilizó como control interno. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%, y teñidos con bromuro de etidio, las intensidades de las bandas de cada experimento se cuantificaron utilizando el software ImageJ.

6.8. Identificación y análisis de indol-3-carboxaldehído.

La identificación de indol-3-carboxaldehído se llevo a cabo en los extractos acuosos de *Trichoderma virens*. Una descarga de inóculo activo de 1×10^6 esporas de *Trichoderma virens* se colocó en 1 litro de medio líquido PDB (caldo de papa-dextrosa; Sigma) y creció durante 3 días a 28°C en agitación a 200 rpm. El medio de cultivo fue suplementado con L-triptófano (Merck) a una concentración de 100 mg/L^{-1} , para

evaluar el efecto del triptófano sobre la acumulación de ICALd. La caracterización del ICALd en los extractos acuosos de *T. virens*, se llevo a cabo después de filtrar el sobrenadante y ajustarse a pH:7 con NaOH 2N. El ICALd presente en el sobrenadante se extrajo tres veces con 1 L de acetato de etilo. Los extractos se combinaron y se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y se hicieron diluciones de 1:10 (v/v) para los cultivos sin L-Trp y 1:100 (v/v) para los cultivos con L-triptófano. Posteriormente las muestras fueron analizadas por GC-MS. Inicialmente el ICALd fue identificado por comparación del espectro de masas de la muestra contra el de la librería de espectros (NIST/EPA/NIH, "Station" Hewlett Packard de Chem). La identidad del ICALd en los extractos acuosos fue confirmada también por comparación del tiempo de retención del ICALd puro obtenido de Sigma. El espectro obtenido del ICALd de las muestras fue analizado tras su fragmentación con un bombardeo de 70 eV. Para estimar las cantidades producidas de ICALd por *T. virens*, fue construida una curva estándar monitoreando el ión molecular m/z 144.

6.9. Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

La identificación y determinación de todos los compuestos investigados se realizo con un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6850 Series II equipado con un detector MS Agilent modelo 5973. Las muestras fueron corridas en una columna de 30m X 0.2 mm X 0.25 μ m, 5% fenil metil silicona (HP-5 MS). Las condiciones de corrida fueron utilizando helio como gas acarreador $1\text{ml}/\text{min}^{-1}$, temperatura del detector de 300°C , y la temperatura del inyector de 250°C . La columna se calentó durante 3 minutos a 80°C y fue programado para incrementarse $6^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ para una temperatura final de 230°C durante 5 min.

6.10. Bioensayos para la inducción de resistencia sistémica por *Trichoderma* contra *Botrytis cinérea*.

Para los bioensayos de resistencia inducida por *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* en *Arabidopsis thaliana* (Col-0), las plantas fueron inoculados primero con una densidad de esporas de 1×10^6 de *Trichoderma* a 1 cm de los extremos de placas de agar que contenían plantas de 8 días de edad (20 plantas por placa). Las especies de *Trichoderma* se crecieron por 3 días para inducir las respuestas de defensa por el

contacto físico del micelio con el sistema radicular. Al término de este periodo la zona aérea de *Arabidopsis thaliana* fue inoculada con una densidad de 1×10^6 esporas de *Botrytis cinerea*. La resistencia inducida a la infección ocasionada por *Botrytis cinerea* se evaluó a las 48 h para el caso de las hojas sintomáticas por planta y 72 h después para el caso de plantas muertas. En el caso de los experimentos de inducción de resistencia a través de compuestos difusibles, se llevaron a cabo antes de que las plantas y *Trichoderma* entraran en contacto físico. Las plantas fueron transplantadas a medio MS 0.2X y fueron inoculadas con *Botrytis cinerea* en la zona aérea. El nivel de resistencia se evaluó en los mismos intervalos de tiempo. Las plantas se colocaron en una cámara de crecimiento con foto período de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, intensidad de luz de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 24°C.

6.11. Análisis de datos.

Los resultados estadísticos de los experimentos de los análisis bioquímicos y los diferentes bioensayos fueron analizados estadísticamente en el programa SPSS 10 (SPSS, Chicago). Los resultados de los experimentos fueron evaluados por análisis de univarianza y multivarianza con el método de análisis post hoc Tukey. Las diferentes letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P \leq 0,05$).

7. RESULTADOS.

7.1. La colonización del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* por especies de *Trichoderma* no compromete el crecimiento vegetal.

Previamente, se reportó que la inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con hongos del género *Trichoderma* estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas por medio de compuestos difusibles (Contreras-Cornejo et al., 2009). Estos efectos se presentaron sin el contacto físico entre el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* y las hifas de *Trichoderma*. Para evaluar la respuestas de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* durante el contacto físico con *Trichoderma*, se realizaron bioensayos en los que semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) se germinaron y crecieron durante 4 días en placas petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X y 4 días después de la germinación, en el lado opuesto de las placas fueron inoculados. Los tratamientos fueron con agua destilada (controles) y con 1×10^6 esporas de cada especie fúngica disueltas en agua. Las esporas de *Trichoderma* fueron colocadas a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz primaria. El sistema de interacción fue analizado durante 8 días después de la inculcación con *Trichoderma*. Observamos que del 2^{do} al 4^{to} día después de la inoculación, no existió contacto físico lo que indica el estado de precolonización, sin embargo al 6^{to} día se observó un incremento en el número de raíces laterales que muestra la capacidad de la planta para absorber agua y captar nutrientes. El incremento en la proliferación de raíces laterales fue una respuesta típica de las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma* (Datos no mostrados), estos datos están en concordancia con la producción de auxinas que actúan como señales difusibles (Contreras-Cornejo et al., 2009). Por otro lado al 6^{to} días es cuando observamos el comienzo de la etapa temprana de colonización, que bajo estas condiciones de interacción el sistema radicular fue cubierto un 30% y a los 8 días el sistema radicular fue cubierto un aproximadamente 75% (Fig. 1A-C).

Para detallar las repuestas de crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y/o describir los posibles efectos nocivos de la elevada colonización de raíces por *Trichoderma*, fue cuantificada la acumulación de biomasa total y registrada cada dos días después de la inoculación (d.d.i.) por un período de 8 días. En los dos primeros días después de la inoculación, no se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa entre las plantas sin inocular en comparación con las plantas inoculadas con *T. virens* o *T. atroviride* (Fig. 1D). Sin embargo, a partir del 4^{to} al 8^{vo} día, se pudo observar un aumento de aproximadamente el 40% en el peso fresco total. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* colonizadas por el micelio de *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* no presentaron síntomas perjudiciales, tales como clorosis o necrosis, esta descripción se puede observar en las hojas de las plantas inoculadas (Fig. 1, A-C).

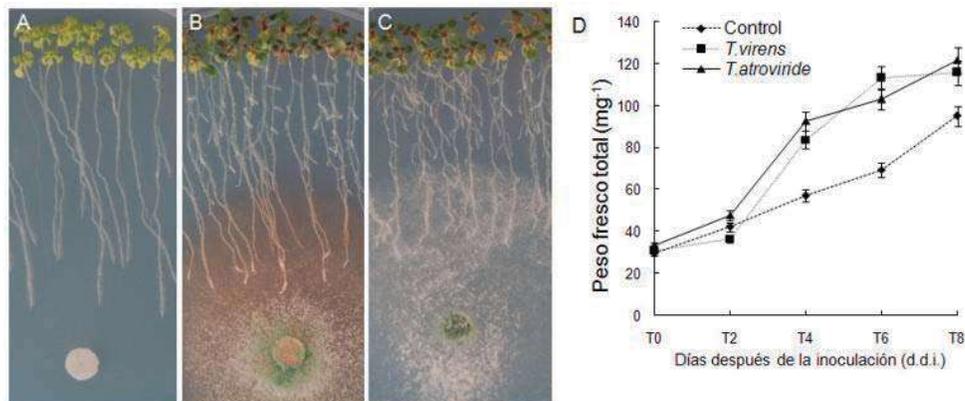


Figura 4. Efectos de la inoculación de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. **A**, La imagen muestra plantas de *Arabidopsis thaliana* de 10 días de edad (plántulas Col-0) creciendo en la superficie de las placas de agar con medio MS 0.2X. Las plantas fueron tratadas con agua estéril en el día 4 de su crecimiento y fotografiado 6 días después. **B**, Fotografía representativa de plantas de *Arabidopsis thaliana* que fueron inoculados con *Trichoderma virens* a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz a los 4 días después de la germinación y crecidas por un período de 6 días. **C**, Fotografía representativa de plantas de *Arabidopsis thaliana* que fueron inoculados con *Trichoderma atroviride* a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz a los 4 días después de la germinación y crecidas por un período de 6 días. **D**, Efectos de *Trichoderma* sobre la producción de biomasa total en *Arabidopsis thaliana*. Las barras de error muestran los valores calculados después del \pm error esta dar después de los días indicados en el experimento de cinética.

7.2. *Trichoderma* induce la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis thaliana*.

Una característica respuesta de estrés general de las plantas es la acumulación de antocianinas. Las antocianinas pueden ser inducidas por diversos estímulos bióticos o abióticos, por ejemplo en plantas de frijol se ha observado su acumulación tras la exposición a luz ultravioleta, estrés por sequía, la aplicación de hormonas vegetales como las auxinas o citocininas y algunos elicitores de origen fúngico. En el sistema de interacción diseñado observamos que las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma* al inicio del contacto físico (6 d.d.i) presentaron la acumulación de un pigmento rojo que es característico de las antocianinas (Fig. 2 A). Para caracterizar mejor esta respuesta y determinar si era una respuesta benéfica o perjudicial inoculamos plantas de *Arabidopsis thaliana* de 4 días de edad con distintas cantidades de inóculo (1×10^1 , 1×10^3 y 1×10^6 esporas) y evaluamos la acumulación de antocianinas cada 2 días durante un periodo de 8 días. Para las plantas inoculadas con ambas especies del 2^{do} al 4^{to} día no encontramos diferencias significativas comparando las cantidades de antocianinas con las plantas control (Fig. 2 B y C). Interesantemente al inicio del contacto físico (6^{to} día) ambas especies de *Trichoderma* indujeron la acumulación de antocianinas hasta casi el doble comparando sus cantidades contra las plantas control. Un aspecto interesante es que hubo más acumulación de antocianinas cuando la cantidad de inóculo fue mayor en el caso de *Trichoderma virens* (Fig. 2B). La acumulación de antocianinas en plantas inoculadas con bajas cantidades (1×10^1 y 1×10^3) de *Trichoderma atroviride* del 6^{to} al 8^{vo} día la cantidad de antocianinas fue mucho menor que a altas cantidades de 1×10^6 (Fig. 2 C). Por lo tanto, es posible pensar que *Trichoderma* induce la acumulación de antocianinas para amortiguar el estrés oxidativo generado por los radicales libres o especies reactivas de oxígeno que se producen como primeros mensajeros de respuestas de defensa. Por otro lado se conoce que las antocianinas también son acumuladas en las plantas por la captación de nitrógeno, así que es probable que *Trichoderma* también este favoreciendo la fijación de nitrógeno y la acumulación de antocianinas sea una respuesta benéfica.

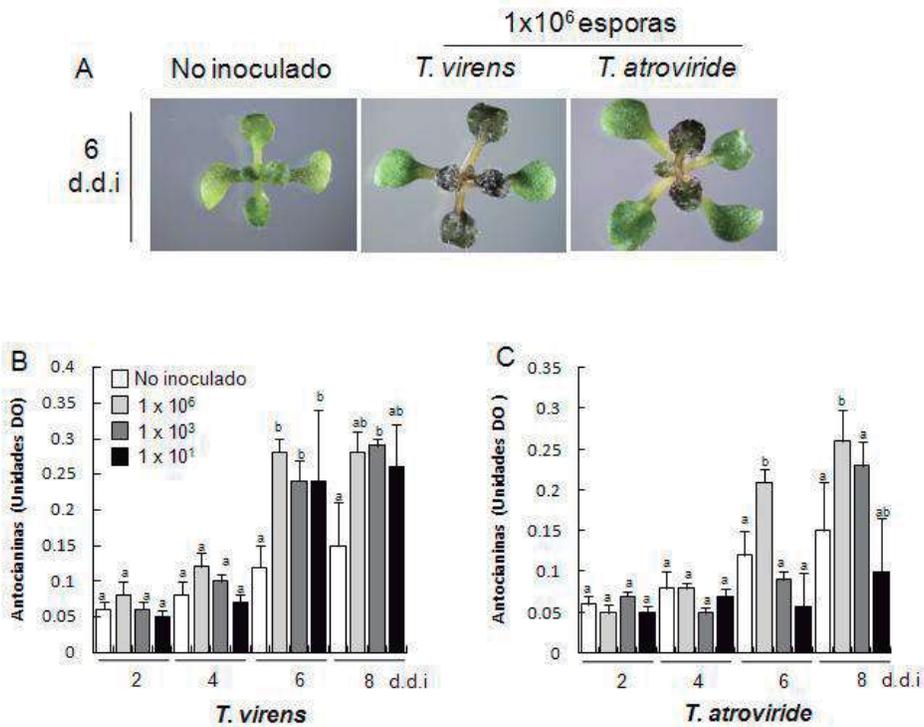


Figura 5. Efecto de la inoculación de *Trichoderma* sobre la acumulación de antocianinas en *Arabidopsis thaliana*. **A**, La imagen muestra la acumulación de antocianinas en la zona aérea de *Arabidopsis thaliana* 6 días después de la inoculación *Trichoderma* con una cantidad de inóculo de 1X10⁶ esporas. **B**, Acumulación de antocianinas en *Arabidopsis thaliana* durante diferentes periodos de tiempo (2, 4, 6 y 8 días) con distintas cantidades de inóculo (1X10¹, 1X10³ y 1X10⁶) de *Trichoderma virens*. **C**, Acumulación de antocianinas en *Arabidopsis thaliana* durante diferentes periodos de tiempo (2, 4, 6 y 8 días) con distintas cantidades de inóculo (1X10¹, 1X10³ y 1X10⁶) de *Trichoderma atroviride*. Las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes se utilizan para indicar los tratamientos que

difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió cuatro veces con resultados similares.

7.3. *Trichoderma* induce respuestas de defensa dependientes de ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana*.

La infección de plantas con microorganismos patógenos o la colonización de las raíces con ciertos microorganismos benéficos induce respuestas de defensa, que pueden ser dependientes de ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno (Koornneef y Pieterse, 2008). Los mecanismos que activan respuestas de defensa en las plantas durante la interacción con hongos del género *Trichoderma* siguen siendo ampliamente desconocidas. Para determinar si *Trichoderma* induce la acumulación de AS en *Arabidopsis thaliana*, se cuantificaron los niveles de AS libre en la zona aérea 8 d.d.i. con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. Interesantemente encontramos que ambas especies de *Trichoderma* inducen la acumulación de AS libre, en el caso de *Trichoderma virens* las cantidades se incrementaron hasta 3 veces más y en el caso de *Trichoderma atroviride* hasta 4 veces más comparando los niveles contra las plantas control (Fig. 6). Se conoce que las plantas tienen 2 rutas de biosíntesis para el AS. Para determinar cual ruta de biosíntesis es activada por *Trichoderma*, inoculamos plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la biosíntesis de AS dependiente de la ruta de shikimato vía corismato, dicha mutante es conocida como *sid2-2* afectada en la enzima isocorismato sintasa (ICS), que convierte el corismato en isocorismato. Fueron cuantificados los niveles de AS en Col-0 y la mutante *sid2-2* a los 4 y 8 d.d.i. Ciertamente la mutante *sid2-2* produce bajos niveles de AS. En las condiciones experimentales planteadas a los 4 d.d.i. no encontramos diferencias en la acumulación de AS en las plantas silvestres inoculadas con *Trichoderma*, ni en el caso de la mutante *sid2-2* (Fig. 7A). Interesantemente a los 8 d.d.i. encontramos que la mutante *sid2-2* inoculada con *Trichoderma virens* acumula AS a niveles semejantes a los de las plantas silvestres no ocurriendo así cuando la mutante *sid2-2* fue inoculada con *Trichoderma atroviride* (Fig. 7B). Estos datos sugieren que *Trichoderma virens* induce la acumulación de AS a partir de una ruta independiente de ICS y en el caso de *Trichoderma atroviride* dependiente de ICS. Se ha reportado que tras la acumulación

de AS libre, las plantas activan la expresión de genes *PR*. Para examinar si los niveles de AS libre acumulado tras la inoculación con *Trichoderma* inducen la expresión del gen *PR-1* en *Arabidopsis thaliana*, analizamos la expresión del gen reportero de respuesta a AS conocido como *PR-1a::GUS* (Shah et al., 1997). Las semillas de las plantas transgénicas fueron sembradas en medio MS 0.2X y a los 4 días después de la germinación fueron inoculadas con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* 5 cm por debajo de las raíces, y se analizó la expresión de *PR-1a::GUS* cada 2 días durante un período de 8 días. A los 2 días después de la inoculación con ambas especies de *Trichoderma* no encontramos cambios en la expresión del gen reportero comparado su respuesta contra las plantas control. Interesantemente al 4^{to} d.d.i. es decir antes del contacto físico en el caso de las plantas inoculadas con *Trichoderma virens* encontramos que *PR-1a::GUS* se expresa en los ases vasculares y su expresión se incrementa al 6^{to} d.d.i. y se expande de manera sistémica a los 8 d.d.i. En el caso de las plantas inoculadas con *Trichoderma atroviride* también se observaron cambios en la expresión pero al 6^{to} d.d.i. y la expresión sistémica se observó al 8^{vo} d.d.i. (Fig. 8) Estos datos muestran que *Trichoderma* induce la expresión de *PR-1a::GUS*, un gen de respuesta a AS que codifica para un péptido con actividad antimicrobiana. Para determinar si el mecanismo de defensa involucraba la participación de NPR1, se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *NPR1* y se hicieron reacciones en cadena de la polimerasa a partir de RNA obtenido de tejido foliar de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 8 d.d.i. con *Trichoderma*. Los productos de amplificación de la expresión de *NPR1* no mostraron cambios en la expresión en las plantas inoculadas con *Trichoderma* y las plantas control (Fig. 9). Estos datos muestran que *Trichoderma* no induce la expresión del gen *NPR1*, pero no se descarta la participación de la proteína por lo que se requieren análisis moleculares tipo western-blot.

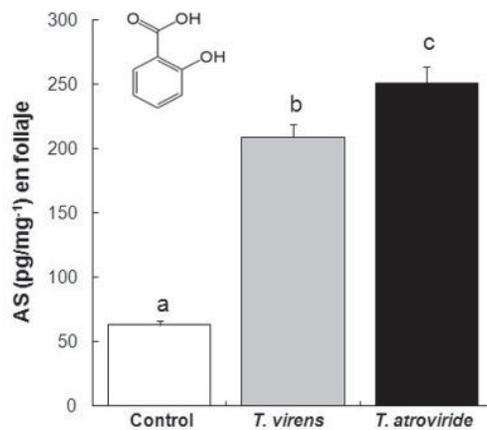


Figura 6. Acumulación de ácido salicílico en *Arabidopsis thaliana* inoculada con *Trichoderma*. La grafica muestra los niveles de AS libre en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 8 días después de la inoculación con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. El análisis fue realizado a través de GC-MS. Las barras de error representan el error estándar. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

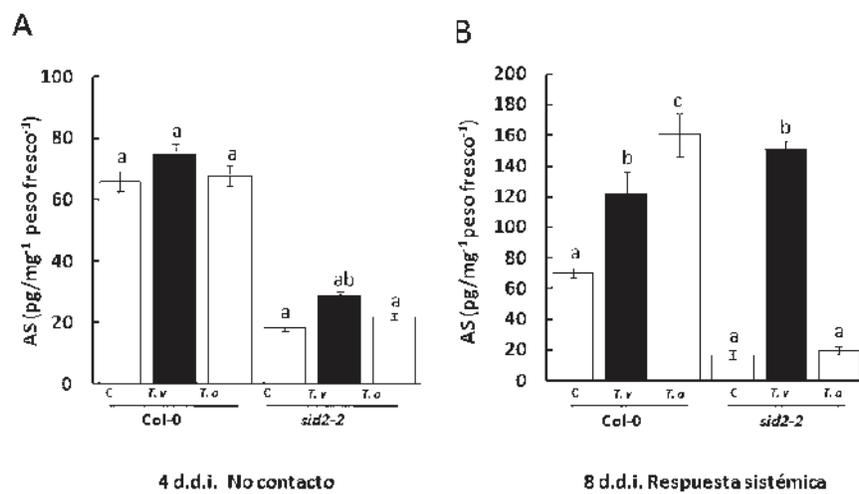


Figura 7. Acumulación de ácido salicílico en diferentes etapas de la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Trichoderma*. **A**, La grafica muestra las cantidades de AS en las plantas silvestres (Col-0) y la mutante *sid2-2* de *Arabidopsis thaliana* a los 4 d.d.i. antes del contacto físico. **B**, La grafica muestra las cantidades de AS en las plantas silvestres (Col-0) y la mutante *sid2-2* a los 8 días después de la inoculación cuando el sistema radicular esta un 75% colonizado por *Trichoderma*. Notar que la mutante *sid2-2* ciertamente produce bajos niveles de AS comparado con las plantas (Col-0) y que la mutante *sid2-2* inoculad con *Trichoderma virens* acumula cantidades similares de AS a las plantas Col-0 a los 8 d.d.i. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

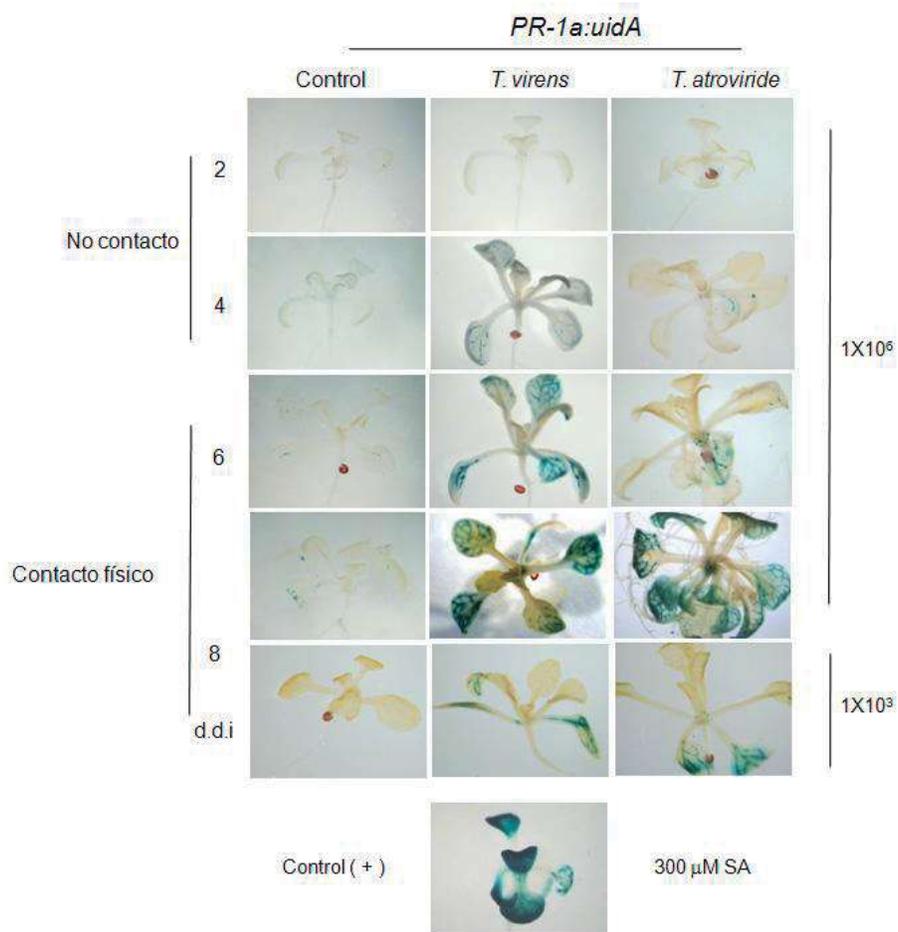


Figura 8. Inducción de la expresión espacio-temporal del gen reportero *PR-1a::GUS* por *Trichoderma*. Las imágenes muestran el patrón de expresión del *PR-1a::GUS* en diferentes etapas de la interacción con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. La expresión del gen *PR-1a::GUS* fue analizado con diferentes descargas de

inoculo (1×10^3 y 1×10^6) encontrando que *PR-1a::GUS* es expresado más intensamente a mayor cantidad de inoculo (1×10^6). La imagen inferior central muestra una imagen representativa de las plantas que fueron usadas como control positivo tratadas con 300 μ M de AS. La expresión del *PR-1a::GUS* es visualizada 18 h después de la actividad de la β -glucuronidasa. Fueron teñidas por los menos 20 plantas de cada tratamiento. El experimento fue realizado por duplicado.

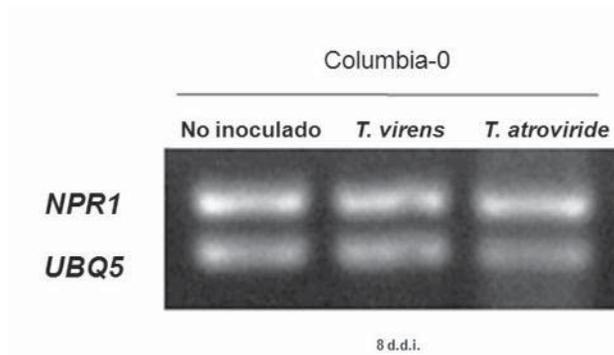


Figura 9. Análisis de la expresión del gen *NON-EXPRESOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1 (NPR1)* en plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma*. La imagen muestra la expresión de *NPR1* en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 8 días después de la inoculación con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. El análisis fue realizado después de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las bandas no muestran diferencias en la expresión de *NPR1* en las plantas inoculadas con *Trichoderma* comparado contra el control. El experimento se repitió por duplicado con resultados similares.

7.4. *Trichoderma* induce respuestas de defensa dependientes de ácido jasmónico en *Arabidopsis thaliana*.

En algunos sistemas de interacción planta-microorganismo se ha mostrado la participación de las lipoxigenasas en respuestas de defensa. Para caracterizar a detalle las respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma* investigamos si durante esta interacción se induce la acumulación de ácido jasmónico y la expresión de la lipoxigenasa 2 (LOX2) implicada en la biosíntesis de AJ. Para determinar si *Trichoderma* induce la acumulación de AJ en *Arabidopsis thaliana*, se cuantificaron los niveles de AJ libre en la zona aérea 8 d.d.i. con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. Interesantemente encontramos que ambas especies de *Trichoderma* inducen la acumulación de AJ libre, en el caso de *Trichoderma virens* las cantidades se incrementaron hasta 35 veces más y en el caso de *Trichoderma atroviride* hasta 15 veces más comparando los niveles contra las plantas control (Fig. 10). Se conoce que las plantas sintetizan AJ en respuesta a microorganismos patógenos. Para examinar si los niveles de AJ libre acumulados tras la inoculación con *Trichoderma* se correlacionan con la expresión del gen *LOX2* en *Arabidopsis thaliana*, analizamos la expresión del gen reportero de respuesta a AJ o metil jasmonato conocido como *LOX2::GUS* (Schommer et al., 2008). Las semillas de las plantas transgénicas fueron sembradas en medio MS 0.2X y a los 4 días después de la germinación fueron inoculadas con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* 5 cm por debajo de las raíces y se analizó la expresión del gen reportero *LOX2::GUS* cada 2 días durante un periodo de 8 días. A los 2 días después de la inoculación con ambas especies de *Trichoderma* no encontramos cambios en la expresión del gen reportero comparado su expresión contra las plantas control. Interesantemente al 4^{to} d.d.i. es decir antes del contacto físico en el caso de las plantas inoculadas con *Trichoderma* encontramos que *LOX2::GUS* se expresa en los cotiledones y ligeramente en las hojas, incrementando

su expresión al 6^{to} d.d.i. y de manera sistémica a los 8 d.d.i. (Fig. 11) Estos datos muestran que *Trichoderma* induce la expresión de *LOX2::GUS* un gen de implicado en la biosíntesis de AJ y que *Trichoderma* induce la participación de la ruta mediada por AJ y que puede actuar de manera sinérgica con la ruta de señalización mediada por AS.

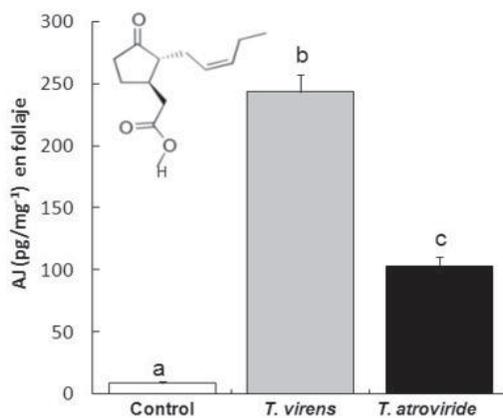


Figura 10. Acumulación de ácido jasmónico en *Arabidopsis thaliana* inoculada con *Trichoderma*. La grafica muestra los niveles de AJ libre en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 8 días después de la inoculación con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. El análisis fue realizado a través de GC-MS. Las barras de error representan el error estándar. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos

que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

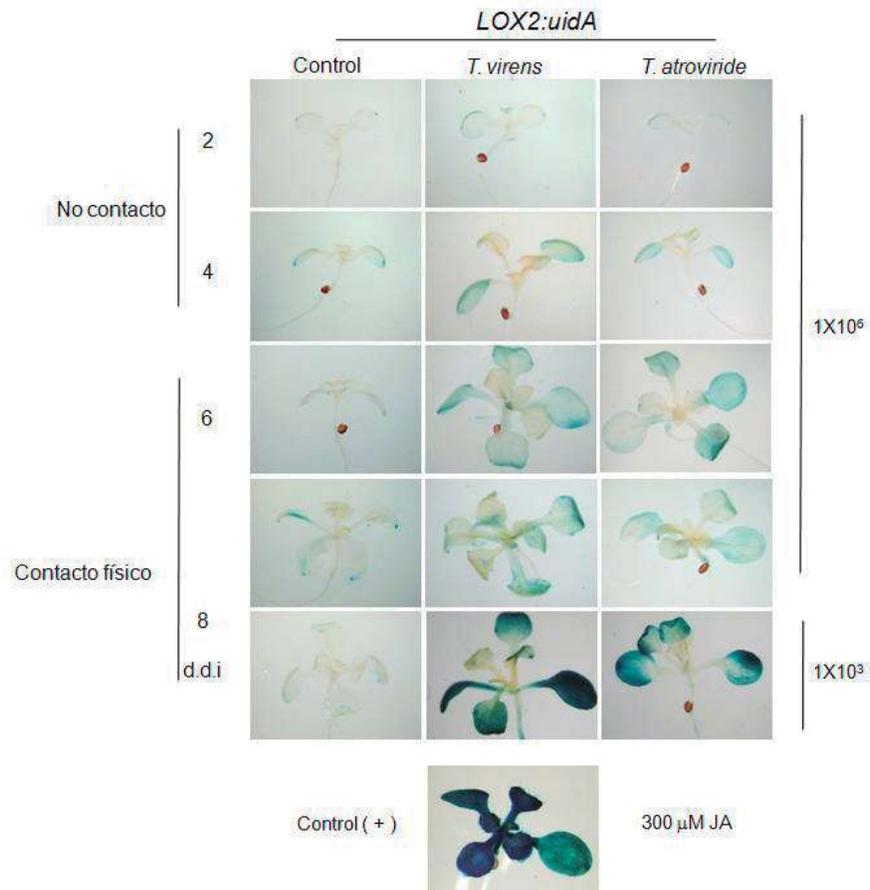


Figura 11. Inducción de la expresión espacio-temporal del gen reportero *LOX2::GUS* por *Trichoderma*. Las imágenes muestran el patrón de expresión del *LOX2::GUS* en diferentes etapas de la interacción con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride*. La expresión del gen *LOX2::GUS* fue analizado con diferentes descargas de inóculo (1×10^3 y 1×10^6) encontrando que *LOX2::GUS* es expresado más intensamente a menor cantidad de inóculo (1×10^3). La imagen inferior central muestra una imagen representativa de las plantas que fueron usadas como control positivo tratadas con 300 μ M de AJ. La expresión del *LOX2::GUS* es visualizada 18 h después de la actividad de la β -glucuronidasa. Fueron teñidas por los menos 20 plantas de cada tratamiento. El experimento fue realizado por duplicado.

7.5. *Trichoderma* induce la acumulación de camalexina en *Arabidopsis thaliana* y produce el precursor de la camalexina indol-3-carboxaldehído.

La principal fitoalexina que se acumula en *Arabidopsis thaliana* después de la infección por hongos o bacterias es la molécula de bajo peso molecular llamada camalexina (3-tiazol-2'yl-indol). Para investigar si *Trichoderma* induce la expresión del gen *PAD3* implicado en la biosíntesis de camalexina y su acumulación, fueron realizados experimentos en donde semillas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) fueron sembradas en medio MS 0.2X y a los 4 días después de la germinación fueron inoculadas con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* 5 cm por debajo de las raíces, y se analizó la expresión de *PAD3* y cuantificaron sus niveles de camalexina a los 8 d.d.i. Como control positivo se utilizaron plantas de 12 días tratadas con AgNO_3 por 12 h debido a que se conoce que es un potente inductor químico de camalexina y como control negativo se trataron con agua estéril. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma virens* indujeron la expresión del gen *PAD3* hasta 4 veces más comparando su expresión con las plantas no inoculadas (Fig. 12, A y B). Los análisis de las cuantificaciones por GC-MS mostraron que las plantas tratadas con AgNO_3 y *Trichoderma* incrementaron dramáticamente los niveles de camalexina comparado con las plantas control (Fig. 12 C). Para investigar si *Trichoderma* produce alguna molécula que actúa como elector de respuestas de defensa para activar la expresión de los genes *PR* o sobre la acumulación de camalexina, investigamos el perfil de compuestos liberados en los extractos acuosos por *Trichoderma virens*. Previamente mostramos que *Trichoderma virens* produce varios compuestos indólicos que incluyen el ácido indol-3-acético, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol (Contreras-

Cornejo et al., 2009). Interesantemente el análisis por GC-MS reveló la presencia de indol-3-carboxaldehído (ICALd), con un tiempo de retención de 10.79 min y un pico base a m/z 144 (13 A-C). El ICALd es un compuesto previamente sugerido para que actúe como reactivo para la biosíntesis de camalexina (Fig. 3). Cuando *Trichoderma virens* fue cultivado en presencia de L-triptófano, la producción de ICALd aumento considerablemente (Fig. 13 D), indicando que este aldehído puede ser producido a partir del metabolismo Trp.

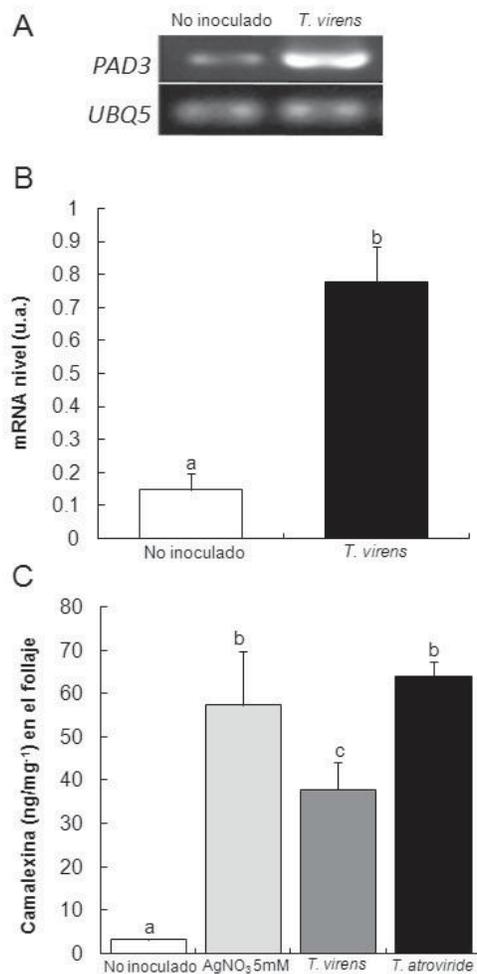


Figura 12. Efecto de la inoculación de *Trichoderma* en la acumulación y la expresión de *PAD3* en *Arabidopsis thaliana*. **A**, La imagen muestran el patrón de expresión de *PAD3* por el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa-reversa semi cuantitativo (sqRT-PCR) a los 8 d.d.i. de la interacción

con *Trichoderma virens*. El gen *UBQ5* fue utilizado como control interno. **B**, Relativa expresión de *PAD3*. Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software ImageJ y los valores expresados en unidades arbitrarias (u.a.). **C**, Acumulación de camalexina en *Arabidopsis thaliana* inoculada con *Trichoderma*. La grafica muestra los niveles de camalexina en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 8 d.d.i. cuando el sistema radicular estuvo 75% colonizado con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride*. El análisis fue realizado a través de GC-MS. Las barras de error representan el error estándar. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió tres veces con resultados similares.

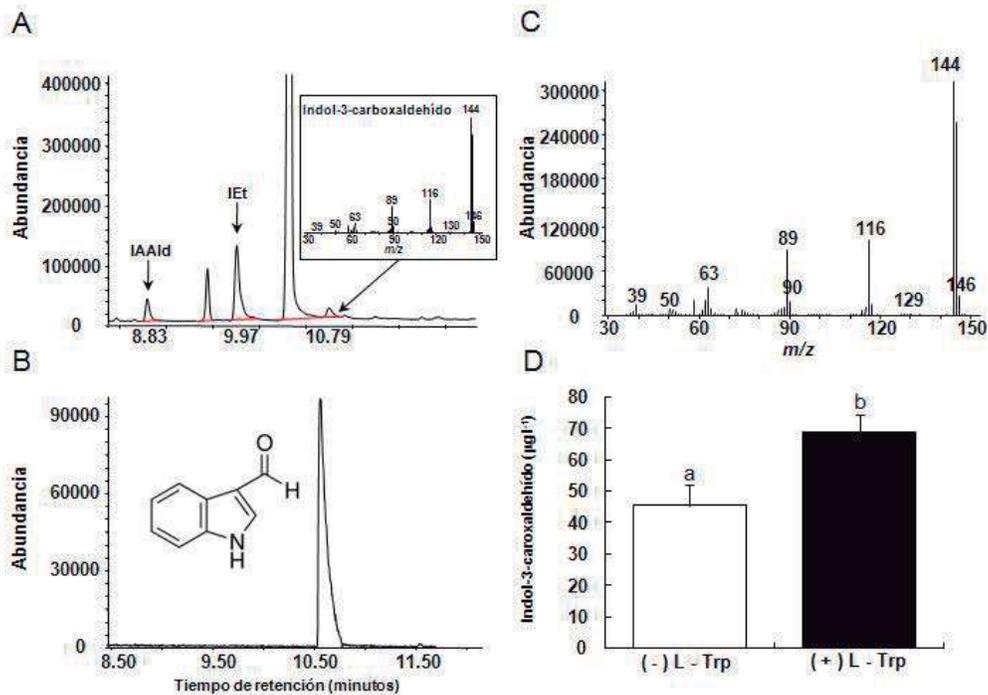


Figura 13. Identificación del indol-3-carboxaldehído de muestras no derivatizadas de los extractos acuosos de *Trichoderma virens*. **A**, Cromatograma de los compuestos extraídos con acetato de etilo de una fracción neutra del extractos obtenido a partir de 1L^{-1} de medio de cultivo de *Trichoderma virens*, las flechas muestran la presencia de diferentes compuestos indólicos: indol-3-acetaldehído

(IAAld), indol-3-etanol (IEt) y el indol-3-carboxaldehído (ICALd). **B**, Cromatograma del ICALd puro que muestra el tiempo de retención. **C**, Espectro de masas del ICAld después de su ionización y fragmentación con 70 eV a m/z 50-500. **D**, Cuantificación del ICALd a partir del medio de cultivo sin o con el suplemento de L-triptófano. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicas independientes. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

7.6. La aplicación de Indol-3-carboxaldehído induce la acumulación de camalexina en *Arabidopsis thaliana*.

Un gran número de aldehídos poseen la habilidad de reaccionar con la cisteína para formar el correspondiente ácido tiazolidin-carboxílico (Green y Wnitz, 1961). Parece ser que los grupos sulfhídrido y amino pueden reaccionar con el aldehído para inducir el cierre del anillo con pérdida de agua. Para estudiar la posible participación del ICAld en la biosíntesis de camalexina en *Arabidopsis thaliana* se realizaron estudios farmacológicos. Semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo (Col-0) se germinaron y crecieron durante 15 días en placas petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X suplementado con 150, 300 y 600 μM de ICALd. Al término de este período el tejido vegetal fue colocado en un tubo ependorff y añadido MeOH puro a 80°C durante 20 min. para la extracción de camalexina. Las cantidades de camalexina fueron calculadas por el análisis a través de GC-MS. Se encontró que en todos los tratamientos con ICAld los niveles de camalexina se incrementan, pero a partir de 300 μM las cantidades acumuladas son estadísticamente significativas comparadas con el control (Fig. 14). Estos resultados muestran que el ICAld podría ser utilizado para la biosíntesis de camalexina.

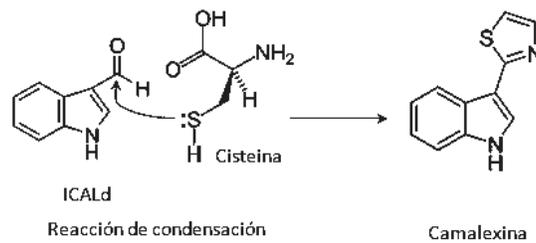
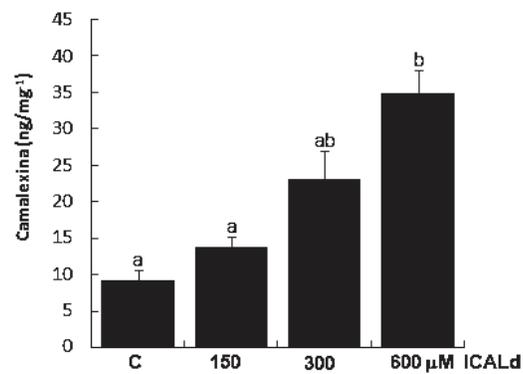


Figura 14. Acumulación de camalexina en *Arabidopsis thaliana* tratadas con ICALd. La grafica muestra los niveles de camalexina en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) 15 después de su crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de ICALd. Las estructuras químicas muestran la posible reacción de

condensación que se favorece en presencia del ICALd y durante la interacción de *Trichoderma* con las plantas. El análisis fue realizado a través de GC-MS. Las barras de error representan el error estándar. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió cuatro veces con resultados similares.

7.7. *Trichoderma* induce resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana* contra el hongo necrotrófo *Botrytis cinerea*.

La acumulación de camalexina es esencial para la resistencia contra *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis thaliana* (Ferrari et al., 2007). Los resultados de la acumulación de AS, la inducción de la expresión del gen reportero *PR-1a::GUS* y la acumulación de camalexina por la inoculación de *Trichoderma* sugieren que las plantas están siendo estimuladas para defenderse contra el ataque de microorganismos patógenos. Para estudiar si efectivamente los mecanismos de defensa activados por *Trichoderma* son suficientes para restringir la proliferación de *Botrytis cinerea*, analizamos la resistencia de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 12 días de edad, cuyas raíces fueron previamente colonizadas por *T. virens* o *T. atroviride*. Las hojas de *Arabidopsis thaliana* fueron inoculadas con 1×10^6 esporas de *B. cinerea*. Los síntomas de la enfermedad fueron evaluados a las 48 h para el caso de las hojas sintomáticas por planta y a los 3 d.d.i. del patógeno para el caso de las plantas muertas. Encontramos que más del 82% de las plantas control de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *B. cinerea* presentaron grandes lesiones necróticas y clorosis (Fig.15). Por el contrario, en las hojas de las plantas colonizadas por *T. virens* y *T. atroviride*, sólo el 22% y 25%, respectivamente, presentaron lesiones necróticas causadas por la infección de *B. cinerea* (Fig. 15 A-D). A los 3 d.d.i., se observó que alrededor del 70% de las plantas inoculadas con *B. cinerea* estaban muertas, mientras que sólo el 10% de las plantas inoculadas con *Trichoderma* habían muerto (Fig. 15 F). Estos datos sugieren que *Trichoderma* induce resistencia sistémica en contra de *B. cinerea* a través de la participación sinérgica de las rutas de AS y AJ y la acumulación de camalexina. Para determinar si *Trichoderma* es capaz de inducir respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* por algún(os) factor(es) difusible(s), fueron crecidas plantas de *Arabidopsis*

thaliana durante 4 días en medio MS 0.2X y se inocularon con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* durante un período adicional de 4 d.d.i. Previamente establecimos que a este periodo no existe contacto físico entre *Arabidopsis thaliana*-*Trichoderma*. Al termino de este periodo las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron asperjadas con ICALd, camalexina, AS y AJ a una concentración de 50 μ M durante 12 h para inducir cierto grado de resistencia. Estos tratamientos fueron utilizados como controles para elucidar la contribución de cada molécula en las respuestas de defensa inducidas por *Trichoderma*. Al termino de este periodo las plantas de los diferentes tratamientos transplantadas a nuevo medio MS 0.2X e inoculadas con una descarga de 1×10^6 esporas de *B. cinerea* en la zona aérea, las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con una humedad del 80% para favorecer la infección por *B. cinerea* durante 48 h. Al término de este periodo fueron evaluados el porcentaje de plantas sintomáticas y el porcentaje de hojas sintomáticas por planta. Cuando se evaluó el numero de plantas sintomáticas encontramos que las plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma* y las tratadas con los compuestos químicos puros (ICALd, camalexina y AS) presentaron resistencia a la proliferación de *B. cinerea*, mientras que las plantas tratadas con AJ presentaron una considerable susceptibilidad al ataque de *B. cinerea* comparando estos efectos con las plantas control (Fig. 16 A). Cuando se analizo el numero de hojas sintomáticas por planta, se encontró que las plantas inoculadas con *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* fueron fuertemente estimuladas debido a la reducción de la infección de *Botrytis cinerea* en las hojas de *Arabidopsis thaliana*, los tratamientos con el ICALd, la camalexina y el AJ fueron eficaces para inducir protección contra la infección de *B. cinerea*, interesantemente el tratamiento con AS fue el más eficiente para restringir la infección casi al mismo nivel que el tratamiento con *T. virens* (Fig. 16 B). Estos datos muestran que *Trichoderma* tiene el potencial de inducir resistencia al ataque de *B. cinerea* a través de uno o múltiples factores difusibles y que probablemente sea a nivel de la ruta mediada por AS.

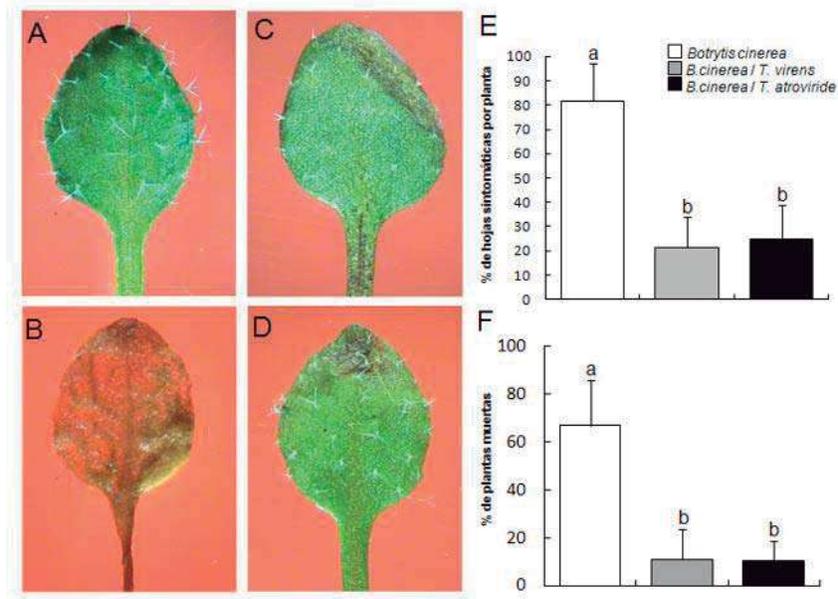


Figura 15. *Trichoderma* induce resistencia al ataque de *Botrytis cinerea*. Las imágenes muestran hojas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) de 15 d.d.i. con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* y con el hongo necrotrófo *Botrytis cinerea*. **A**, Control tratado con agua estéril. **B**, Control inculcado con *Botrytis cinerea*. **C**, Tratamiento con *Trichoderma virens* y *Botrytis cinerea*. **D**, Tratamiento con *Trichoderma atroviride* y *Botrytis cinerea*. Los paneles E y F, muestran el grado de protección inducida por *Trichoderma* en contra de *Botrytis cinerea*. **E**, Porcentaje de hojas sintomáticas por

planta 48 h con *B. cinerea*. F, Porcentaje de plantas muertas 3 d.d.i. con *B. cinerea*. Las barras de error representan el error estándar de 15 plantas por tratamiento. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

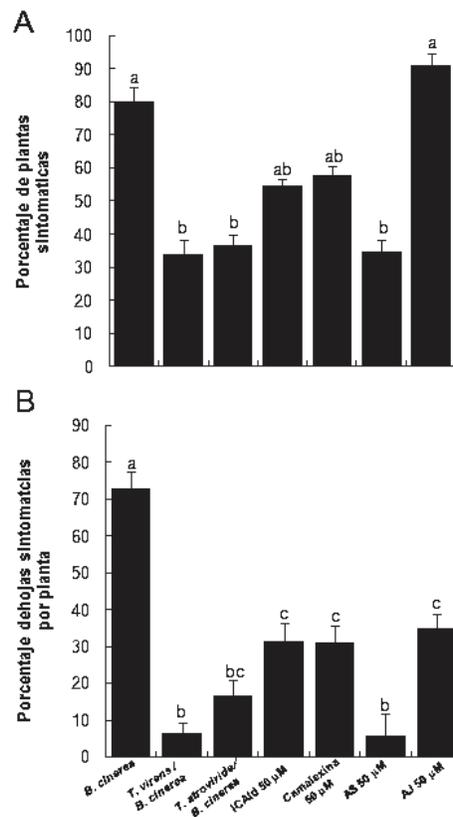


Figura 16. *Trichoderma* induce resistencia de *Arabidopsis thaliana* al ataque de *Botrytis cinerea* por una señal difusible. Las graficas muestran la resistencia de *Arabidopsis thaliana* a *B. cinerea* después del tratamiento con *Trichoderma* y varios

compuestos químicos. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* fueron transplantadas después de la previa inoculación con *Trichoderma virens* o *Trichoderma atroviride* y posteriormente fueron infectadas con el hongo necrotrófos *Botrytis cinerea*. **A**, Porcentaje de plantas sintomáticas 48 h después de la infección. **B**, Porcentaje de hojas sintomáticas por planta 48 h después de la infección. Las barras de error representan el error estándar de 20 plantas por tratamiento. Las letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$). El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

8. DISCUSIÓN.

Trichoderma puede colonizar las raíces de muchas especies de plantas e inducir efectos benéficos, como mejorar el crecimiento y reducir la susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos. Existen reportes de que los hongos son productores prolíficos de un gran número de metabolitos estructuralmente diversos, y algunos de estos compuestos pueden tener funciones importantes en las interacciones con las plantas y otros microorganismos. Descifrar los mecanismos de señalización que se establecen en estas interacciones representa un desafío (Harman et al., 2004, Contreras-Cornejo et al., 2009). Aunque la planta modelo de estudio *Arabidopsis thaliana* no es de importancia económica, ofrece una serie de ventajas en el campo experimental sobre las demás especies de cultivos, esto se debe a su tamaño pequeño, corto ciclo de vida y la idoneidad de ser cultivadas en condiciones axénicas. La adopción de este modelo en la investigación de plantas y las interacciones planta-microorganismo ha aumentado el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y las respuestas fisiológicas de crecimiento y desarrollo de *Trichoderma* sobre las plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009). Mediante el desarrollo de un sistema de interacción *in vitro* *Arabidopsis thaliana*-*Trichoderma*, Se mostró que la inoculación de *Arabidopsis thaliana* con *Trichoderma virens* y/o *Trichoderma atroviride* no perjudica el crecimiento de las plantas. Por el contrario se mostro el aumento en la producción de biomasa que fue evidente a los 6 d.d.i. (Fig. 4). Este efecto se correlaciono con la acumulación de antocianinas en las hojas (Fig. 5). Interesantemente, la inoculación de *Trichoderma* indujo la expresión del gen *PR-1a::GUS* y la acumulación de AS (Fig. 8), así como de la expresión del gen *LOX2::GUS* y la acumulación de AJ en las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 9), lo

que indica que la estimulación del crecimiento y la activación de respuestas de defensa no son inherentemente antagonistas. Las interacciones entre las plantas y los microorganismos que terminan en la inducción de respuestas de defensa implican el reconocimiento y señalización de eventos que son distintos entre la gran variedad de plantas y microorganismos que habitan en la rizosfera. Los inductores microbianos pueden ser parte estructural de los microorganismos patógenos que son conocidos como patrones moleculares asociados a los microorganismos (PMAM; Boller y Yang-He, 2009) o pueden ser liberados al exterior. A nivel celular, el resultado del reconocimiento de los microorganismos patógenos a menudo se manifiesta como una necrosis localizada en el lugar del ataque, denominada respuesta hipersensible, que se acompaña de cambios celulares como un estallido oxidativo que conduce a la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS), un aumento en los niveles de ácido salicílico, y la inducción de genes de defensa, tales como los que codifican las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR; al Asselbergh et al., 2007). Esta respuesta de defensa localizada a menudo induce la activación de mecanismos de resistencia sistémica eficaz contra un gran número de microorganismos patógenos (al Sticher et al., 1997). Este tipo de resistencia es conocida como resistencia sistémica adquirida (RSA) y puede ser alcanzada por el tratamiento previo con agentes patógenos necrotróficos o inductores químicos (Ryals et al., 1996; Zimmerli et al., 2001), la interacción de las raíces en las plantas con rizobacterias no patógenas induce un tipo de resistencia conocida como resistencia sistémica inducida (RSI; van Loon et al., 1998; van Loon 2007). La RSA y RSI se pueden distinguir con respecto a las vías de transducción de señal que son necesarias y que se activan para la inducción de las respuestas de defensa. La RSA activa un mecanismo dependiente de AS que induce la expresión de genes *PR*, mientras que la RSI es activada a través de un mecanismo dependiente de jasmonato/etileno (Pieterse et al., 2002). Las últimas dos rutas necesarias para la inducción de la expresión de genes de defensa que codifican para defensinas vegetales (Penninckx et al., 1998). Algunas especies de *Trichoderma* inducen cambios físicos o químicos relacionados con las respuestas de defensa vegetal mediante la RSI (Harman et al., 2004, Djonović et al., 2006). La RSI activada por especies de *Trichoderma* puede suprimir muchas enfermedades de las plantas causadas por microorganismos fitopatógenos, tanto en condiciones de invernadero como de campo (Howell et al., 2000, Harman et al., 2004, Segarra et al., 2007, 2009). En este estudio, para elucidar los mecanismos de defensa que son activados por *T. virens* y *T. atroviride* fueron empleadas técnicas de bioquímica analítica y líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que muestran la actividad de la β -glucuronidasa

(GUS) tras la expresión del gen con el que fueron fusionadas. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* cuando fueron inoculadas con *Trichoderma* se encontró que *T. virens* y *T. atroviride* inducen la acumulación de AS (Fig. 6). El estudio de la mutante *sid2-2* inoculada con *T. virens* sugiere que esta especie induce la acumulación de AS por la activación de una ruta de biosíntesis independiente de ICS (Fig.7). Djonović, (2007), encontró que las plantas de maíz inoculadas con *T. virens* inducen la opresión de gen *PAL*, que codifica para una enzima implicada con la biosíntesis de AS en una ruta independiente de ICS. Por otro lado cuando la mutante *sid2-2* fue inoculada con *T. atroviride* no acumularon AS comparada con las plantas control, lo que sugiere que el AS acumulado tras la colonización por *T. atroviride* es dependiente de ICS. Se ha observado que tras la acumulación de AS en las plantas, se sigue a la expresión del gen *PR-1*. Interesantemente fue encontrado que ambas especies de *Trichoderma* inducen la expresión del gen *PR-1a::GUS*, cuya expresión inicia en los ases vasculares y luego se expande de manera sistémica (Fig. 8). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que *Arabidopsis thaliana* induce la biosíntesis *de Novo* de AS y actúa como una señal móvil para activar la expresión de genes *PR* como lo muestra *PR-1a::GUS*. La acción concertada de las proteínas PR, algunos de los cuales presentan actividad antimicrobiana puede actuar restringiendo el crecimiento de patógenos (Shah, 2003; Spoel et al., 2007). La expresión del gen *PR-1* puede estar mediada por la participación de una proteína moduladora conocida como NPR1, que actúa como co-activador transcripcional uniéndose al factor transcripcional TGA2, que se une al promotor del gen *PR-1*. Las plantas inoculadas con *Trichoderma* no indujeron la expresión del gen NPR1, lo cual no descarta la participación de la proteína, para esto se requieren análisis moleculares tipo western-blot, pero se ha reportado que los mecanismos que involucran la acumulación de AS y la acumulación de camalexina, no involucran la participación de NPR1 (Jirage et al., 1999). Los microorganismos que interactúan con las raíces de las plantas pueden inducir la acumulación de moléculas lipídicas y muchas de ellas son los sustratos de las enzimas LOXs, por lo general esos microorganismos activan la RSI dependiente de AJ/Et. En los bioensayos de interacción entre *Arabidopsis thaliana-Trichoderma* encontramos que ambas especies inducen la expresión del gen *LOX2::GUS* (Fig. 11) y su expresión se correlaciona con la acumulación dramática de AJ (Fig. 10).

Algunos compuestos antimicrobianos pueden ser producidos como parte del crecimiento y desarrollo normal de la planta y comúnmente se almacenan en los órganos o tejidos especializados tales como los tricomas, las glándulas sebáceas, o

capas de la epidermis de células (Bednarek y Osbourn, 2009). *Arabidopsis thaliana* es miembro de la familia *Brassicaceae*, que es conocida por la producción de diversos compuestos indólicos, entre ellos varios glucosinatos indólicos y algunos indolil tiazoles, incluyendo la camalexina y la 6-metoxicamalexina (Frey et al., 1997; Glawischning et al., 2004 ; Arcilla et al., 2009; Bednarek et al., 2009). La producción de camalexina puede ser estimulada por bacterias y hongos fitopatógenos. *In vitro* la camalexina posee actividad antimicrobiana (Glazebrook y Ausubel, 1994; Thomma et al., 1999). En este trabajo se mostró que las plantas de *Arabidopsis thaliana* colonizadas con *T. virens* o *T. atroviride* acumularon mayores niveles de camalexina que las plantas no inoculadas (Fig.12). Interesantemente, se encontró que *T. virens* produce ICALd, un reactivo para la producción de camalexina. Los niveles de ICALd producidos por *T. virens* se incrementaron cuando al cultivo se le adicione triptófano, lo cual indica que el ICALd es producido a partir del triptófano (Fig. 13). Una serie de aldehídos poseen la capacidad de reaccionar con la cisteína para formar el correspondiente ácido tiazolidin-carboxílico (Zook y Hammerschmidt 1997). Se ha sugerido que la síntesis de camalexina puede ocurrir por la condensación del indol-3-carboxaldehído con la cisteína (Dzurilla et al., 2001). Estos resultados muestran que no sólo las especies de *Trichoderma* pueden inducir respuestas de defensa mediadas por AS y AJ con la expresión de genes *PR*, sino también la acumulación de la fitoalexina camalexina. La señalización mediada de AS y la acumulación de camalexina se consideran mecanismos independientes en la inmunidad de las plantas. El hecho de que *T. virens* produzca ICALd sugiere que este compuesto puede ser utilizado por las plantas para la producción de camalexina (Fig. 14). La combinación de todos los mecanismos de defensa (AS, AJ y camalexina) pueden explicar la protección de las plantas por *Trichoderma*. *B. cinerea* es un moho gris que causa síntomas de necrosis o pudrición en más de 200 diferentes especies de plantas. Los resultados de resistencia a la enfermedad ocasionada por *B. cinerea* mostraron que las plantas de *Arabidopsis thaliana* son altamente susceptibles al daño causado por *B. cinerea*. Es importante destacar que la colonización de raíces de *Arabidopsis thaliana* por *T. virens* y *T. atroviride* redujo los síntomas de la enfermedad y la muerte de las plantas causadas por el patógeno (Fig. 15 y 16). Es muy posible que la acción sinérgica de la acumulación de AS y AJ y la producción camalexina inducidos por *Trichoderma* redujeron los síntomas de la enfermedad. Con base en estos análisis, se concluye que los hongos del género *Trichoderma* son capaces de regular múltiples respuestas de defensa. Además de la inducción del gen *PAD3* y la biosíntesis de

camalexina proporcionan evidencia que apoya la contribución de compuestos químicos por parte de *Trichoderma* para la producción de fitoalexinas.

9. CONCLUSIONES.

Desde hace algunos años se conoce el potencial de *Trichoderma* para inducir respuestas de defensa en diversos sistemas vegetales. El sistema de interacción *Arabidopsis thaliana-Trichoderma*, permitió elucidar los mecanismos moleculares implicados en respuestas de defensa que implican la participación del AS, AJ y la acumulación de camalexina. Los cuales actúan de manera sinérgica para restringir la proliferación de la infección del hongo necrotrófo *Botrytis cinerea*, sin embargo el proceso de colonización de las raíces por *Trichoderma* puede inducir a un mas cambios en el metabolismo de las planta, por lo que se abre la posibilidad de continuar estudiando los demás efectos de la inoculación sobre *Arabidopsis thaliana*.

10. PERSPECTIVAS.

Los datos presentados en este trabajo muestran la función importante de *Trichoderma* en la rizosfera para la protección de las plantas al ataque de hongos necrotrófos. Los cambios en el metabolismo y la expresión de genes de defensa fueron más fuertes durante el proceso de colonización. Es interesante continuar caracterizando los demás efectos de la inoculación de *Trichoderma* sobre *Arabidopsis thaliana*. Por ejemplo diferentes microorganismos inducen la emisión de compuestos orgánicos volátiles *de Novo* que pueden participar como elicitores de respuestas de defensa o actuar como compuestos antioxidantes y amortiguando diferentes tipos de estreses, repercutiendo finalmente en el buen desarrollo de las plantas. Por otro lado, uno de los fenómenos interesantes a investigar son los mecanismos que se establecen en la

interacción de las plantas con *Trichoderma* para favorecer la solubilización de fósforo y la captación de nitrógeno. Por lo que el seguir explotando el sistema de interacción *Arabidopsis-Trichoderma* promete generar nuevo conocimiento para mejores usos de *Trichoderma* en los sistemas agrícolas.

11. LITERATURA CITADA.

Adams P, De-Leij FA, Lynch JM (2007) *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of Crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. *Microb. Ecol.* **54**: 306-313.

Angra-Sharma R, Sharma DK (1999) Cytokinins in pathogenesis and disease resistance of *Pyrenophora teres*-barley and *Drechslera maydis*-maize interactions during early stages of infection. *Mycopathologia* **148**: 87-95.

Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Höfte M (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol.* **144**:1863-1877.

Backer B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**: 726-733.

Bate NJ, Rothstein SJ (1998) C₆-volatiles from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* **16**: 561-569.

Bednarek P, Osbourn A (2009) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* **324**: 746-748.

Bednarek P, Piślewska Bednarek M, Svatoš A, Scheneider B, Doubský J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez Vallet A, Molina A, Schulze Lefert P (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* **323**: 101-106.

Boller T, Yang He S (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**: 742-744.

Browse John (2009) Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 183-205.

- Chang YC, Backer R, Klefield O, Chet I** (1986) Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* **70**: 145-148.
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* **323**: 95-100.
- Contreras Cornejo HA, Macías Rodríguez L, Cortés Penagos C, López Bucio J** (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **149**: 1579-1592.
- Darvill AG, Albersheim P** (1984) Phytoalexins and their elicitors a defense against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 243-275.
- Devys M, Barbier M** (1991) Indole-3-carboxaldehyde in the cabbage *Brassica oleracea*: a systematic determination. *Phytochemistry* **30**: 389-391.
- Dewdney J, Reuber TL, Wildermuth MC, Devoto A, Cui J, Stutius LM, Drummond EP, Ausubel FM** (2000) Three unique mutants of *Arabidopsis* identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J.* **24**: 205-218.
- Dixon RA** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843–847.
- Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM** (2006) Sm1, a proteinaceous elicitor by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**: 838-53.
- Djonović S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A, Kenerley CM** (2007) A proteinaceous Elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* **145**: 875-889.
- Dzurilla M, Kutschy P, Zaletova J, Ruzinsky M, Kovacik V** (2001) Synthesis of camalexin. *Molecules* **6**: 716-720.
- Eulgem T** (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* **10**: 71-78.
- Ferrari S, Galletti R, Denoux De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires *PHYTOALEXIN DEFICIENT3*. *Plant Physiol.* **144**:367-379.
- Ferrari S, Plotnikova JM, De Lorenzo G, Ausubel FM** (2003) *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2* but not *SID2*, *EDS5* or *PAD5*. *Plant J.* **35**: 193-205.
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG** (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Figueroa Balderas RE, García Ponce B, Rocha Sosa M** (2006) Hormonal and stress induction of the gene encoding common bean acetyl-coenzyme a carboxylase. *Plant Physiol.* **142**: 609-619.

- Frankenberger WT, Poth M (1987)** Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2908-2913.
- Frey M, Chomet P, Glawischning E, Stettner C, Grün S, Winklmair A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP, Simcox K, Gierl A (1997)** Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* **277**: 696-699.
- Fuchs Y, Saxena A, Gamble HR, Anderson JD (1989)** Ethylene biosynthesis-inducing protein from cellulysin is an endoxylanase. *Plant Physiol.* **89**: 138-143.
- Glawischning E, Hansen BG, Olsen CE, Halkier BA (2004)** Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .**101**: 8245-8250.
- Glazebrook J, Ausubel FM (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.
- Glazebrook J, Zook M, Mert F, Kagan I, Rogers EE, Crute IR, Holub EB, Hammerschmidt R, Ausubel F (1997)** Phytoalexin deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**: 381–392.
- Hanson LE, Howell CR (2004)** Elicitors of plant defense responses from biological control strains or *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **94**: 171-176.
- Harberd NP (2003)** Botany. Relieving DELLA restraint. *Science* **299**: 1853-1854.
- Mohr PCD (2003)** Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Funct. Plant Bio.* **30**: 461-469.
- Harman GE (2000)** Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* **84**: 377-393.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, and Lorito M (2004)** *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* **2**: 43-56.
- Harman GE and Kubicek CP (1998)** *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2 (Taylor and Francis, London).
- Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS (2000)** Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* **90**: 248-252.
- Jejelowo OA, Conn KL, Tewari JP (1991)** Relationship between conidial concentration, germling growth and phytoalexin production by *Camelina sativa* leaves inoculated with *Alternaria brassicae*. *Mycol. Res.* **95**: 928–934.
- Jirage D, Tootle TL, Reuber TL, Frost LN, Feys BJ, Parker JE, Ausubel FM, Glazebrook J (1999)** *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:13583–13588.

- Kiessling K** (1986) Biochemical mechanism of action of mycotoxins. *Pure Appl. Chem.* **58**: 327-338.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CM** (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol.* **147**:1358-1368.
- Koornneef A, Pieterse CM** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol.* **146**:839-844.
- Krishna P** (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regulation.* **22**: 289-297.
- Kubicek CP, Mach RL, Peterbauer CJ, Lorito M.** (2001) *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *J. Plant Pathol.* **83**: 11-23.
- Kunkel BN and Brooks DM** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 325-331.
- La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T** (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews.* **198**: 267-284.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J** (1995) Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 863-870.
- Lotan T, Fluhr** (1990) Xylanase a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* **93**: 811-817.
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33-44.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980.
- Mohr PG, Cahill DM** (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Funct Integr Genomics* **7**: 181-191.
- Nagpal P, Ellis CM, Weber H, Ploense SE, Barkawi LS, Guilfoyle TJ, Hagen G, Alonso JM, Cohen JD, Farmer EE et al.,** 2005 Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**: 4107-4118.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmashiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD** (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439.
- Ortiz-Castro R, Contreras Cornejo HA, Macías Rodríguez L, López Bucio J** (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Sign. Behav.* **4**: 701-712.
- Paxton JD** (1981) Phytoalexins-a working redefinition. *Phytopathol. Z* **101**: 106-109.

- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 2103-2113.
- Pieterse CJM, Jurriaan T, Van Loon LC** (2001) Cross-talk between plant defense signaling pathways: boost or burden? *Agr. Biotech. Net.* **3**: 1-8.
- Pieterse CMJ and LC Van Loon** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-464.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC** (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol. (Stuttg)* **4**: 535-544.
- Pozo MJ, Van Loon LC, Pieterse CMJ** (2005) Jasmonates-Signals in plant-microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 211-222.
- Remans R, Spaepen S, Vanderleyden J** (2006) Auxin signaling in plant defense. *Science* **313**: 171.
- Robbinette D, Matthysse AG** (1990) Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* **172**: 5742-5749.
- Rogers EE, Glazebrook J, Ausubel FM** (1996) Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 748-757.
- Ryals JA, Urs HN, Williams MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819.
- Schommer C, Palatnik J, Aggarwal P, Chetelat A, Cubas P, Farmer E, Nath U, Weigel D** (2008) Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biology* **6**: 1991-2001.
- Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, Petersen BL, Olsen CE, Svatoš A, Halkier BA, Glawischning E** (2006) CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol.* **141**: 1248-1254.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I** (2007) Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* **7**: 3943-3953.
- Segarra G, Van der Ent S, Trillas I, Pieterse CM** (2009) MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol. (Stuttg)* **11**: 90-96.
- Seilaniantz AR, Navarro L, Bari R, Jones JDG** (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 372-379.
- Shah J** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 365-371.

- Shah J, Tsui F, Klessing DF** (1997) Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant Microbe interact.* **10**: 69-78.
- Shang y, Li X, Cui H, He P, Thilmony R, Chintamanani S, Zwiesler Vollick J, Gopalan S, Tang X, Zhou JM** (2006) RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 19200-19205.
- Shoresh M, Harman GE, Mastouri F** (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 1-23.
- Sivasithamparam K and Ghisalberti EL** (1998) In *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 1(Taylor and Francis, London).
- Spoel SH, Johnson JS, Dong Xinnian D** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different life styles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 18842-18847.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phyto.* **35**: 235-270.
- Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggeront K, Broekaert WF** (1999) deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* **19**: 163-171.
- Tiryaki I, Staswick PE** (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signalling mutant *axr1*. *Plant Physiol.* **130**: 887-894.
- Truman W, Bennett M, Kubigsteling I, Turnbull C, Grant M** (2007) *Arabidopsis* systemin immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 1075-1080.
- Truman W, de Zabala MT, Grant M** (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defense responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* **46**: 14-33.
- Tsuji J, Jackson E, Gage DA, Hammerschmidt R, Sommerville SC** (1992) Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* **98**: 1304-1309.
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* **4**: 153-164.
- van Loon LC** (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- Verberne MC, Budi Muljono AB, Verpoorte R** (1999) Salicylic acid biosynthesis. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*, vol 33. Edited by Libbenga K, Hall M, Hooykaas PJJ. London: Elsevier; 295-312.

- Verhagen BWM, Glazebrook J, Tong Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CMJ** (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**: 895-908.
- Wang D, Weaver ND, Kesarwani M, Dong X** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science* **308**: 1036-1040.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I** (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1061-70.
- Yedidia I, Shivasta AK, Kalpulnik Y, Chet I** (2001) Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil* **235**: 235-242.
- Zhang H, Xie X, Kim MS, Korniyev DA, Holaday S, Paré PW** (2008). Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels *in planta*. *Plant J.* **56**: 264-273.
- Zhou N, Tootle TL, Glazebrook J** (1999) *Arabidopsis* *PAD3*, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**: 2419-2428.
- Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert P, Somerville S** (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**:633-46.
- Zook M, Hammerschmidt R** (1997) Origin of the thiazole ring of camalexin, a phytoalexin from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **113**: 463-468.