

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología

**“Caracterización de los efectos de la inoculación de
Trichoderma virens Gv.29-8, sobre el crecimiento y
desarrollo de *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis

Para obtener el título de

Químico Farmacobiólogo

Presenta

p.QFB. Contreras Cornejo Hexon Angel

Morelia Michoacán, Méx. febrero de 2008.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DEPENDIENTE A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DC. JOSÉ LÓPEZ BUCIO.

Reconocimientos

Este trabajo fue apoyado por concesiones del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, concesión No. 43978) y del Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, concesión no. CIC. 2.26). Agradecemos a Athanasios Teologis, a Tom Guilfoyle, a Claire Grierson, a Joanne Chory, y a John W. Schiefelbein por proveer amablemente las semillas de las líneas transgénicas y mutantes.

Dedicatoria

A mí 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 gozo no tiene límites.

- Louis Pasteur.

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

- Louis Pasteur.

Agradecimientos

Al equipo de trabajo por permitir la realización de este trabajo los doctores: Macías-Rodríguez, L. I., y Cortés-Penagos, C. y muy especialmente al DC. López-Bucio, J., por haber hecho una excelente dirección de tesis y a mi madre por apoyarme siempre.

Resumen

Trichoderma spp. son hongos que viven libres, encontrándose comúnmente en diferentes suelos de ecosistemas, así como las raíces de las plantas. La colonización de la raíz por parte de *Trichoderma* estimula el crecimiento de la raíz y productividad de cosecha. En este trabajo mostramos que el estímulo del crecimiento vegetal utilizando como modelo *Arabidopsis* por *T. virens* induce cambios en el desarrollo de la raíz, implicando el mecanismo de señalización mediado por auxinas. La inoculación de *T. virens*, afecta positivamente el aumento de biomasa e induce el desarrollo de raíces laterales en las plantas de *Arabidopsis*. Líneas mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la función de genes implicados en transporte de auxinas, AUX1, BIG, EIR1 y AXR1 son resistentes a los efectos de la inoculación de *Trichoderma*, en el follaje y en la zona radicular. Cuando *T. virens* crece bajo condiciones axénicas, se encontró que produce compuestos derivados del indol, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol, precursores del ácido indol acético. En bioensayos aplicando de forma exógena el indol-3-acetaldehído a las plantas de *Arabidopsis*, sin inocular mimetiza los efectos del desarrollo de raíces laterales, encontrando que también activa la expresión de genes regulados por auxinas DR5:uidA y BA3:uidA. El indol-3-acetaldehído aplicado al fenotipo mutante *rhd6* de *Arabidopsis*, defectuoso en la formación de pelos radiculares, revierte el fenotipo e induce la formación de estas estructuras. Nuestros resultados destacan el papel esencial del indol-3-acetaldehído durante la señalización de promoción del crecimiento de *Arabidopsis* por parte de *Trichoderma*.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *Trichoderma virens*, auxinas, estimulación del crecimiento, sistema radicular, control biológico.

Summary

Trichoderma spp. are free-living fungi that are common in soil and root ecosystems. Root colonization by *Trichoderma* enhances root growth and crop productivity. Here we show that plant growth enhancement in *Arabidopsis* by *T. virens* involved alterations in root development mediated by auxin signals. *T. virens* inoculation increased biomass production and stimulated lateral root development in WT *Arabidopsis* seedlings. Loss-of function mutations in genes involved in auxin transport or signaling *AUX1*, *BIG*, *EIR1* and *AXR1* strongly reduce growth-promoting and root developmental effects of fungal inoculation. When grown under axenic conditions, *T. virens* was found to produce the auxin-related compounds indole-3-acetaldehyde and indole-3-ethanol. Application of indole-3-acetaldehyde to uninoculated WT *Arabidopsis* seedlings mimicked lateral root developmental effects of *T. virens*, activated auxin-regulated gene expression in both shoots and in roots of *Arabidopsis* transgenic plants harboring auxin-inducible marker constructs *DR5:uidA* and *BA3:uidA*, and complemented the root hair-defective phenotype of the *rhd6* auxin response mutant of *Arabidopsis*. Our results highlight the essential role of auxin signaling for plant growth promotion by *Trichoderma*.

Key words: *Arabidopsis*, *Trichoderma virens*, auxins, plant growth enhancement, root architecture, biological control.

Índice general

	Pag.
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Summary	viii
Índice general	ix
Índice de Figuras	x
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Género <i>Trichoderma</i>	3
2.2 Interacción de <i>Trichoderma</i> con las plantas	4
2.2.1 Evolución de la interacción <i>Trichoderma</i> – Planta	6
2.3 <i>Trichoderma</i> promueve el crecimiento de las plantas	7
2.3.1 Aumento de la raíz y crecimiento de la planta	8
2.3.2 Incremento del desarrollo de la raíz y crecimiento de la planta	9
2.3.2.1 Efecto de la colonización de raíces sobre el metabolismo de la planta	11
2.3.2.1 Interacciones captación de nutrientes	12
Justificación	13
Hipótesis	13
Objetivo General	14
Objetivos Particulares	14

III. Resultados y Discusión	15
3. 1 Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento y desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	15
3.1.1 Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> sobre el sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	17
3.2 <i>Trichoderma</i> induce la expresión de <i>CycB1,1:uidA</i> en los meristemos de las raíces de <i>Arabidopsis</i>	19
3.3 <i>Trichoderma</i> induce la expresión de <i>DR5:uidA</i> en <i>Arabidopsis</i>	21
3.4 Efecto de la inoculación de <i>T. virens</i> sobre el crecimiento y desarrollo de raíces laterales en plantas afectadas en la respuesta de auxinas en <i>Arabidopsis</i>	23
3.5 <i>T. virens</i> produce los precursores de AIA: Indol-3-acetaldehído e Indol-3-etanol	25
3.6 Indol-3-acetaldehído activa la expresión de los genes quiméricos <i>DR5:uidA</i> y <i>BA3:uidA</i>, inducibles por auxinas	26
3.6.1 Indol-3-acetaldehído regula el sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	28
3.6.2 Indol-3-acetaldehído revierte el fenotipo defectuoso de pelos radiculares en la mutante de <i>rhd6</i> <i>Arabidopsis</i>	30
3.7 Discusión	32
IV Conclusión	37
4.1 Perspectivas	37
V. Materiales y métodos	38
5.1 Cepas fúngicas y condiciones de crecimiento	38
5.2 Plantas	38
5.3 Experimentos de inoculación	39
5.4 Inducciones y análisis histoquímica	39
5.5 Extracción y análisis de los compuestos auxínicos	40
5.6 Análisis de datos	40
VI. Literatura citada	41

Índice de tablas y figuras

Fig.	Pág.
Tabla 1. Cuantificación de las concentraciones de los compuestos auxínicos	25
Figura 1. Sistema experimental de interacción planta-hongo	16
Figura 2. Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> sobre la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	18
Figura 3. Regulación de la expresión del marcador <i>CycB1:uidA</i> de división celular en la fase G2/M en meristemos de raíces primarias y raíces laterales por la inoculación de <i>Trichoderma</i>	20
Figura 4. Regulación de la expresión del marcador <i>DR5:uidA</i> de respuesta a auxinas en follaje, meristemos de raíces primarias y raíces laterales por la inoculación de <i>Trichoderma</i>	22
Figura 5. Efecto de la inoculación de <i>Trichoderma</i> en plantas afectadas en la señalización de auxinas	24
Figura 6. Análisis por GC-MS	25
Figura 7. Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre el crecimiento y desarrollo post embrionario de la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	27
Figura 8. Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre la morfogénesis de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	29
Figura 9. Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre la expresión de líneas reporteras de auxinas en <i>Arabidopsis</i>	31
Figura 10. Modelo propuesto para la regulación del crecimiento y desarrollo post embrionario de <i>Arabidopsis</i> por <i>Trichoderma virens</i>	36

I. Introducción

El crecimiento vegetal es afectado por una plétora de factores ambientales incluyendo la luz, temperatura, nutrientes y los microorganismos. La región que rodea la raíz, la rizosfera, es relativamente rica en alimentos y aproximadamente el 40% de productos de la fotosíntesis de la planta se puede obtener de las raíces (Bais *et al.*, 2006). Por lo tanto, en la rizosfera se encuentran poblaciones microbianas grandes capaces de ejercer efectos benéficos, neutrales o perjudiciales sobre crecimiento vegetal. *Trichoderma* ha sido estudiado ampliamente por su potencial para producir antibióticos, el micoparasitismo y por su ágil competencia por nutrientes (Harman *et al.*, 2004). Hasta hace poco tiempo, estos fenómenos eran considerados como las bases por las cuales *Trichoderma* ejerce efectos benéficos sobre crecimiento y desarrollo vegetal. Sin embargo es cada vez más claro que ciertas cepas también tienen influencia directa sobre el desarrollo y la productividad de la cosecha de las plantas (Harman, 2006). El estímulo del crecimiento vegetal se ha sabido por muchos años y puede ocurrir en tanto sistemas axénicos como suelos (Chang *et al.*, 1986; Yedidia, *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2007). En plantas del maíz, hay un componente genético fuerte para la producción y alteración del sistema de la raíz inducida por *Trichoderma*. Los efectos reportados incluyen la producción de biomasa de la raíz y el desarrollo de pelos radiculares (Bjorkman *et al.*, 1998; Harman *et al.*, 2004b). La ramificación de la raíz y la formación de los pelos radiculares son dos determinantes importantes en el sistema radicular. Las raíces proporcionan anclaje a la planta, contribuyen a la absorción eficaz de agua y facilitan la adquisición de alimentos minerales del suelo (López-Bucio *et al.*, 2005). Diversas líneas de evidencia experimental apoyan fuertemente el papel de que la regulación del sistema radicular es regulado en gran parte por auxinas. El uso de auxinas naturales o sintéticas aumenta el desarrollo de raíces laterales y de pelos radiculares mientras que los inhibidores del transporte de auxinas reducen la ramificación de la raíz (Casimiro *et al.*, 2001). Las plantas mutantes resistentes a auxinas *axr1* y *axr2* producen pocas raíces laterales (Estelle y Somerville, 1987). Inversamente, se ha observado

la formación de raíces laterales en plantas mutantes de *Arabidopsis* a una concentración elevada de auxinas, incluyendo la mutante *rooty* y sus alelos *alf1* y *sur1* (Boerjan *et al.*, 1995; Celenza *et al.*, 1995; Rey *et al.*, 1995). Se ha determinado que la privación de auxinas mantiene las células del periciclo en la fase G1 y la posterior adición promueve la transición de G1-S del ciclo de la célula, promoviendo así la iniciación de las raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002). A pesar de que las auxinas cumplen un papel importante en la regulación del crecimiento de la raíz, poco se sabe sobre su papel en las interacciones de *Trichoderma* con las plantas.

Para aclarar los mecanismos de señalización por los cuales *Trichoderma* promueve crecimiento y el desarrollo vegetal, evaluamos las respuestas de *Arabidopsis thaliana* a la inoculación con dos especies de *Trichoderma*. *T. virens* y *T. atroviride* (conocida antes como *Trichoderma harzianum*). Se encontró que las dos especies fúngicas tienen el potencial para promover crecimiento de la planta bajo condiciones axénicas. La promoción del crecimiento vegetal estimulada por estos hongos que se correlaciona con la formación prolífica de raíces laterales y de pelos radiculares. Un fenómeno característico de ser regulado por las auxinas. Realizando bioensayos de interacción planta-*Trichoderma*, utilizando líneas mutantes, auxina resistentes y los marcadores de respuesta a auxinas DR5:GUS y BA3:GUS, deducimos la participación de auxinas durante la promoción del crecimiento de *Arabidopsis*. Aplicaciones exógenas del indol-3-acetaldehído en las raíces de *Arabidopsis* nos permitió determinar que este compuesto estimuló el crecimiento y desarrollo de raíces laterales y formación de pelos radiculares del fenotipo *rhd6* defectuoso para estas estructuras, sugiriendo entonces que el indol-3-acetaldehído juega un papel importante en morfogénesis de la planta.

II. Antecedentes

2.1 Género *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongos de reproducción asexual, que son a menudo aislados del suelo; casi todos los suelos templados y tropicales contienen 10^1 – 10^3 , propágulos cultivables por gramo. Estos hongos también colonizan plantas y materiales herbáceos. Sin embargo, muchas cepas incluyendo de biocontrol, no se les conocen el estado sexual de reproducción (Harman, *et al.*, 1998). *Trichoderma* muestra un alto nivel de diversidad genética y pueden ser usados para producir un amplio rango de productos de interés comercial y ecológico. *Trichoderma* es productor prolífico de proteínas extracelulares y es mejor conocido por su habilidad para producir enzimas que degradan celulosa y quitina, aunque también producen otras enzimas útiles. Por ejemplo, existen diferentes cepas que producen más de 100 diferentes metabolitos con actividades antibióticas (Sivasithamparam, *et al.* 1998).

Trichoderma han sido ampliamente reconocidos como agente para el control de enfermedades de plantas y por sus habilidades para incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también son adecuadamente usadas en la horticultura y diversas cepas muestran la propiedad conocida como competencia por la rizosfera que es la habilidad para colonizar 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 (Bailey, 1998 y Harman, 1998). La taxonomía de estos hongos esta siendo revisada significativamente y muchas nuevas especies han sido reconocidas.

2.2 Interacción de *Trichoderma* con las plantas

Comúnmente *Trichoderma*, vive libre en suelos, raíces y diferentes ecosistemas. Recientes descubrimientos muestran que son oportunistas, simbiontes avirulentos en plantas (Harman, *et al.*, 2004) y mejor conocidos como parásitos de otros hongos. Las cepas de *Trichoderma* son bien conocidas por su habilidad para colonizar raíces, sin embargo las esporas tienen que ser aplicadas sobre los frutos, flores y follaje controlando con esto las enfermedades de las plantas en dichos sitios (Harman, 2000, Elad, *et al.* 1994). Existen algunas cepas que establecen robustas y duraderas colonizaciones sobre superficies de las raíces y penetran la epidermis y algunas células debajo de este nivel. También se ha demostrado que producen y liberan una variedad de compuestos que inducen respuestas de resistencia local o sistémica en las plantas, explicando esto su carencia de patogenicidad. Estas asociaciones raíz-microorganismo causan importantes cambios en el proteoma y metabolismo de la planta. Las plantas están protegidas de numerosas clases de microorganismos patógenos por respuestas similares a la resistencia sistémica adquirida o sistémica inducida por rizobacterias. La colonización de las raíces por *Trichoderma*, también frecuentemente estimula el crecimiento y desarrollo de la raíz repercutiendo en la productividad postcosecha, resistencia a estrés abiótico, captación y utilización de nutrientes.

Se ha demostrado que *Trichoderma* puede competir contra otros hongos fitopatógenos por exudados claves de las semillas en proceso de germinación, dichos compuestos son utilizados para la germinación de sus propágulos en el suelo (Howell, 2002) y generalmente, compiten contra otros microorganismos del suelo por nutrientes y/o espacio (Elad, 1996). Además *Trichoderma* también inhibe y degrada 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 sobre otros hongos son complejos y recientemente se han considerado como las bases por las cuales *Trichoderma* ejerce efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Investigaciones sobre estos temas han generado un amplio cuerpo de conocimientos, incluyendo el aislamiento y clonación de una gran cantidad de genes que codifican para proteínas de las cuales algunos tienen actividad antimicrobiana. Estas investigaciones ha producido también varios útiles resultados incluyendo aquellos genes que codifican para fungí toxinas, enzimas que degradan la pared celular, éstas enzimas pueden ser utilizadas para producir plantas transgénicas que son resistentes a enfermedades (Bolar, *et al.*, 2000) así como el descubrimiento de las enzimas que son útiles en el bioprocesamiento de quitina (Donzelli, *et al.*, 2003).

Algunas cepas de *Trichoderma* pueden colonizar únicamente sitios locales de las raíces (Metcalf, *et al.*, 2001), pero las cepas rizosfera competentes, colonizan superficies enteras de raíces por varias semanas (Thrane, *et al.*, 1997) o meses (Harman, 2000). En pocos casos se ha examinado a fondo los mecanismos por los que *Trichoderma* como coloniza las superficies de las raíces y se ha encontrando que a veces este fenómeno asemeja las características morfológicas observadas durante el proceso de micoparasitismo, evidenciando que las hifas invaden la epidermis de la raíz.

La penetración de los tejidos radicales es generalmente limitada a las primeras y segundas capas de células (Harman, *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha descrito que la cepa de *Trichoderma stromaticum* es endofítica, sobre los sistemas vasculares de cacao (Evans, *et al.*, 2003). La invasión de células exteriores de las raíces por cepas de *Trichoderma* puede resultar en la inducción de resistencia sistémica (Yedidia, en prensa, *Appl. Environ. Microbiol.*). Sin embargo en raros casos, algunas cepas de *Trichoderma* son fitopatógenas y se ha reportado que causan enfermedades en cosechas de manzanas, maíz y alfalfa. También algunas cepas pueden producir desfavorablemente metabolitos fitotóxicos (Bailey, *et al.*, 1998). Por otra parte se ha reportado que la gran mayoría de las cepas de *Trichoderma*, son productoras prolíficas de enzimas incluyendo las necesarias para degradar paredes celulares de las plantas (Harman, *et al.*, 1998). Así que el hecho de que *Trichoderma* y probablemente otros microorganismos como cepas no patógenas de *Fusarium*, *Rhizoctonia* y micorrizas infecten las raíces teniendo la

habilidad intrínseca de ser patógenos de plantas pero limitan su infección a las células superficiales en las raíces de las plantas, es un notable fenómeno. Algunas cepas de *Trichoderma* también crecen sobre las superficies de las hojas. Por ejemplo la aplicación de una cepa transgénica de *Trichoderma* T-22 que expresa β -glucuronidasa no resulta en la colonización de las hojas. Sin embargo, después de aplicaciones de esporas en forma de spray sobre follajes, las esporas germinan y numerosas hifas se observan, incluyendo algunas que parasitan *Rhizoctonia solani* que son residentes de la filósfera (Lo, *et al.*, 1998). Así que algunas cepas de *Trichoderma* pueden colonizar las superficies de las raíces bajo ciertas condiciones. Se ha reportado también que la presencia de *Trichoderma* frente a los microorganismos puede inducir respuestas de resistencia sistémica o afectar negativamente el crecimiento o penetración de los patógenos de las plantas (Elad, *et al.*, 1999).

2.2.1 Evolución de la interacción *Trichoderma* - Planta

Trichoderma puede proliferar, competir y sobrevivir en el suelo y otros ecosistemas complejos. Durante la interacción *Trichoderma*-planta, el hongo puede colonizar las raíces de hecho incrementa la biomasa radicular cuando estas son sanas. Como *Trichoderma* únicamente coloniza raíces debajo de la epidermis, no penetrando profundamente, esto causa la estimulación de respuestas de defensa por lo tanto, aunque *Trichoderma* probablemente tiene la habilidad intrínseca para atacar plantas, generalmente es avirulento. Las respuestas de defensa de las plantas pueden proceder a una respuesta sistémica y proteger la planta entera de un amplio rango de microorganismos patógenos igualmente cuando *Trichoderma*, crece sólo sobre las raíces y la planta entera. Debido a esta colonización, se ve incrementada la productividad de la planta y el rendimiento de los órganos reproductores. *Trichoderma* también ayudan a las plantas a prevalecer a estrés abiótico, y mejorar la toma de nutrientes (Yedidia, *et al.*, 2001).

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

2.3 *Trichoderma* promueve el crecimiento de las plantas

El estímulo del crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de *Trichoderma* ha sido conocido por muchos años pudiendo ocurrir en sistemas axénicos (Lindsey, *et al.*, 1967) y suelos naturales de campo. La cepa T-22 es uno de los ejemplos más estudiados de las diversas cepas de *Trichoderma* que han sido aisladas, y se ha encontrado que incrementa el crecimiento de raíces y esto repercute en el incremento de la productividad de las plantas. En muchos casos, estas respuestas son el resultado de efectos directos sobre las planta, disminuyendo la actividad de microflora dañina de raíces e inactivando compuestos tóxicos en la zona de la raíz. Los hongos benéficos incrementan la captación de nutrientes y la eficiencia del uso de nitrógeno y pueden solubilizar nutrientes del suelo. Las bases genéticas y moleculares de estos efectos no se conocen, pero estas respuestas son diferentes en entre líneas de plantas y cultivares, por lo menos en maíz. Recientemente se reportó fenotípicamente que similares promociones del crecimiento fueron inducidos por bacterias por la relación de compuestos volátiles como acetoina y 2,3 –butanediol (Ryu, *et al.*, 2003), pero los compuestos estimulantes promotores del crecimiento de plantas por parte de *Trichoderma* no se conocen.

2.3.1 Aumento de la raíz y crecimiento de la planta

Se ha demostrado que algunos microorganismos benéficos colonizadores de la raíz también estimulan el crecimiento de la planta y productividad, incluyendo a los hongos del género *Trichoderma*. Intuitivamente, este potencial parece contraproducente al inducir respuestas de resistencia que resultan energéticamente muy costosas para las plantas. Sin embargo, muchos hongos y bacterias que inducen resistencia incrementan el crecimiento del follaje y la raíz, ocurriendo de manera semejante por parte de *Trichoderma* (Harman, *et al.*, 2004). De hecho la resistencia inducida por rizobacterias es extensamente conocida así como también los mecanismos moleculares por los cuales promueven el crecimiento en las plantas (Kloepper, *et al.*, 1993). También se existen reportes de por lo menos algunos hongos no fitopatógenos colonizadores de raíces que también tienen similares habilidades (Lindsey, *et al.*, 1967, Pozo, *et al.*, 2002). Aunque probablemente muchas cepas de *Trichoderma* tienen esta habilidad (Lindsey, *et al.*, 1967, Chang, *et al.*, 1986), los efectos más grandes por largos períodos, probablemente ocurren con cepas de rizosfera competentes. En la industria de invernadero, la cepa de *T. harzianum* (T-22) es extensamente utilizada para el control de enfermedades en lugar de fungicidas químicos por que resultan más seguros de usarse en los cultivos. Este método de control de enfermedades dura más que los pesticidas químicos sintéticos. Así que resultan también menos costosos que los fungicidas químicos, repercuten también en el crecimiento de la raíz siendo mejor cuando se tratan las plantas con *Trichoderma* que cuando se tratan con pesticidas (Harman, 2004).

2.3.2 Incremento del desarrollo de la raíz y crecimiento de la planta

En experimentos de campo se ha encontrado que la cepa T-22 incrementa el crecimiento de las raíces de plantas maíz y otras numerosas plantas (Harman, 2004). Por ejemplo, plantas de maíz crecidas en campo que fueron tratadas con T-22 por varios meses se encontró que crecieron alrededor de 2 m. de largo, no así las plantas crecidas sin el inóculo de *Trichoderma*. La presencia de raíces colonizadas por la cepa T-22, induce casi el doble de la biomasa radicular encontrando su desarrollo gravitrópico a una profundidad de 25 a 75 cm. debajo de la superficie del suelo (Harman, 2004). La habilidad de la cepa T-22 y otras para inducir el incremento y formación de raíces no es restringida para cosechas de invernadero, también el crecimiento de estas plantas puede ser estimulada por la presencia de otros microorganismos benéficos colonizadores de las raíces. Existen reportes que demuestran sinergismo entre hongos micorrícicos y la cepa T-22 (Datnoff, 1995, Nemec, *et al.*, 1996), así como también sinergismo entre enzimas de *Trichoderma* y antibióticos bacterianos (Woo, *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando se hacen mezclas de diferentes agentes de biocontrol colonizadores de raíces pueden proporcionar mejores resultados que algunos agentes utilizados solos. Sin embargo, las habilidades de las combinaciones de microorganismos colonizadores de raíces que mejoran el funcionamiento y rendimiento de las plantas han sido inadecuadamente examinadas en ecosistemas controlados o naturales. Tales mejorías sobre el desarrollo de las raíces son frecuentemente asociadas con incrementos en la producción y biomasa. Los tratamientos de *Trichoderma* tienen el potencial para mejorar cabalmente el rendimiento de cosecha y esto puede ser particularmente importante en optimas condiciones de campo. Generalmente el incremento del rendimiento de las plantas es muy evidente bajo condiciones controladas. Se ha observado por lo menos en plantas de maíz que cuando se les inocula con la cepa T-22, ésta repercute directamente en la estimulación del crecimiento y en el rendimiento. Esta línea es una de las que responden más positivamente; otras líneas responden débilmente, y unas pocas muestran realmente una reducción

en el crecimiento y producción (Harman, *et al.*, 2004). Estas respuestas diferenciales proporcionan una sobresaliente oportunidad para estudiar el transcriptoma o a nivel proteoma las respuestas de plantas por microorganismos benéficos como la cepa T-22 que puede repercutir en el aumento del rendimiento e inducir gran resistencia a plagas. Esto probablemente permite el análisis genómico determinado a identificar genes y rutas implicadas en la resistencia a estrés biótico y abiótico y durante la promoción del crecimiento. Estos efectos sobre las plantas resultan como una herramienta importante para identificar cepas que son particularmente adecuadas para interactuar con las plantas y los metabolitos fúngicos que causan efectos benéficos. Es importante separar los efectos directos de *Trichoderma* sobre el crecimiento de las plantas de los mecanismos de control de microorganismos patógenos que reducen el crecimiento de las raíces. Sin embargo la interacción entre la cepa T-22 y plantas de maíz se observa un claro incremento en las raíces y follaje, incrementándose tanto en suelo estéril y no estéril así como en presencia de fungicidas (Harman, *et al.*, 2004). Por otro lado la cepa T-203 (*T. asperellum*) y otras cepas, incrementan notablemente el crecimiento de las raíces en sistemas axénicos (Lindsey, *et al.*, 1967, Yedidia, *et al.*, 2001).

Sin embargo se ha observado en muchos casos un mejor desarrollo y concomitantes incrementos en el crecimiento probablemente causados por el biocontrol de *Trichoderma* y los efectos relacionados con la microflora asociada a las raíces por el mejoramiento directo en el crecimiento de las plantas. La microflora dañina de las raíces puede reducir el crecimiento en ausencia de enfermedades obvias de plantas (Burr, *et al.*, 1987). Algunas raíces asociadas a microflora dañina producen ácido nítrico, probablemente para mantener su sitio de competencia (Harman, *et al.*, 2004).

También se ha reportado que *Trichoderma* es resistente al ácido nítrico y producen diferentes enzimas capaces de degradar la zona de la raíz (Ezzi, *et al.*, 2002). Por lo tanto, *Trichoderma* puede incrementar directamente el crecimiento de las raíces, controlar la microflora patógena y no patógena de las raíces y destruir los metabolitos tóxicos producidos por la primera. De este modo los

efectos benéficos de *Trichoderma* sobre las plantas como la estimulación del crecimiento de todo el sistema vegetal así como la resistencia a estrés, son logrados por la estimulación o inhibición de diferentes rutas metabólicas vegetales. Cada uno de estos efectos probablemente implica múltiples mecanismos moleculares, como desde entonces ha sido descrito para el control biológico.

2.3.2.1 Efecto de la colonización de raíces sobre el metabolismo de la planta

Varios estudios han demostrado que la colonización de las raíces por cepas de *Trichoderma* resultan incrementando los niveles de enzimas relacionadas con la defensa de las plantas, incluyendo varias peroxidasas, quitinasas, β -1,3-glucanasas y la ruta de la lipoxígenas, hidroperoxidasa liasa (Howell, *et al.*, 2000, Yedidia, *et al.*, 1999). En plantas de pepino, la adición de *Trichoderma asperellum*, T-203 conduce a un incremento transitorio en la producción de la fenilalanina amoniaco liasa en retoños y raíces (Harman, *et al.*, 2004), pero dentro dos días este efecto disminuye a fondo en ambos órganos, por lo tanto los cambios en el metabolismo de la planta pueden conducir la acumulación de compuestos antimicrobianos, por ejemplo se ha reportado que *T. virens* posee gran habilidad de para inducir la producción de fitoalexinas (Harman, *et al.*, 2004). En plantas de pepino, la colonización de raíces por cepas de T-203 causa un incremento en los niveles de glucósidos fenólicos dependientes de sus aglicanos (que son glucósidos fenólicos con la mitad de carbohidratos eliminados), son frecuentemente inhibidos por un amplio rango de bacterias y hongos. Así que, las cepas de *Trichoderma* no solamente producen directamente sustancias antibióticas, sino que también estimulan fuertemente a las plantas para producir los compuestos antimicrobianos. La colonización de raíces por parte de *Trichoderma* induce cambios significantes en la maquinaria metabólica en plantas de frijol y maíz (Harman, *et al.*, 2004), esos datos sugieren que estos hongos modifican fuertemente el metabolismo de la planta y en muchos casos las benefician repercutiendo en la función de los órganos reproductores.

2.3.2.1 Interacciones captación de nutrientes.

Se ha descrito que *Trichoderma* incrementa la captación de las concentraciones de una variedad de nutrientes (cobre, fósforo, hierro, magnesio y sodio) en raíces de cultivos hidropónicos, ocurriendo de manera semejante bajo condiciones axénicas (Yedidia, *et al.*, 2001). Este incremento en la captación indica una mejoría en los mecanismos de captación activa. Por otra parte, las plantas de maíz responden generalmente a los fertilizantes que contienen nitrógeno con un incremento en el verdor del follaje, crecimiento y producción, ocupando una meseta que esta considerada generalmente como el máximo en genotipos específicos bajo las condiciones de campo prevalentes. Sin embargo, las plantas que son crecidas de semillas tratadas con la cepa T-22 inducen un rendimiento mayor del 40 % que los fertilizantes sin nitrógeno ocurriendo de manera semejante con plantas que no fueron tratadas con la cepa T-22 (Harman, *et al.*, 2004). Sin embargo el rendimiento de plantas de maíz se puede incrementar por encima del rendimiento de meseta (constante máximo) cuando se tratan con la cepa T-22 adicionada a fertilizantes que contienen nitrógeno. Estos datos muestran que la cepa T-22 incrementa la eficiencia de fertilizantes que contienen nitrógeno. Por otro lado existen reportes de que *Trichoderma* tiene la habilidad para reducir nitratos como contaminación del terreno picado y agua de superficie. Que es una consecuencia desfavorable de larga escala en cultivos de maíz. En adición a los efectos sobre la eficiencia del uso de nitrógeno por parte de *Trichoderma*, existen reportes que indican que estos hongos causan un incremento generalizado en la captación de muchos elementos, incluyendo arsénico, cobalto, cadmio, como níquel, plomo, vanadio, magnesio y manganeso, cobre, boro, zinc, aluminio y sodio. Sin embargo, en muchos casos, el incremento es pequeño en sistemas típicos de agricultura. Finalmente, se ha reportado que la cepa T-22 y probablemente otras pueden solubilizar varios nutrientes como son fosfatos rocosos, Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+4} y Zn^0 , que pueden ser no disponibles para las plantas en ciertos suelos (Altomare, *et al.*, 1999).

Justificación

Actualmente el género de hongos *Trichoderma* es utilizado ampliamente en los sistemas agrícolas para el biocontrol de hongos patógenos. Sin embargo aún se desconocen los efectos directos de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo que consideramos crucialmente importante caracterizar los efectos de estos hongos sobre el crecimiento de las plantas para un mejor manejo en los ecosistemas naturales y controlados.

Hipótesis

Trichoderma participa en la rizosfera como regulador del crecimiento y desarrollo de las plantas mediante mecanismos que implican la ruta de señalización mediadas por auxina a través de su liberación y su actividad como factores difusibles.

Objetivo General

Caracterizar los efectos de la inoculación de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo postembrionario de *Arabidopsis thaliana*, para contribuir al conocimiento sobre los mecanismos por los que éstos hongos proporcionan efectos benéficos a las plantas.

Objetivos Particulares

1. Evaluar los efectos de interacción entre *Trichoderma virens* y *Arabidopsis thaliana* sobre el crecimiento y desarrollo postembrionario.
2. Evaluar el efecto de la inoculación de *Trichoderma virens* sobre la expresión de marcadores de división celular y de respuesta a auxinas.
3. Analizar los efectos de la inoculación de *Trichoderma virens* sobre plantas afectadas en las rutas de señalización de auxinas y etileno.
4. Analizar por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas los metabolitos secundarios de origen fúngico para identificar los compuestos tipo auxína.
5. Probar la actividad biológica de los precursores auxínicos con potencial para promover el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

III. Resultados y discusión

3.1 Efecto de la inoculación de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*.

La promoción del crecimiento de las plantas por cepas bacterianas y hongos micorrícicos arbúsculares ha sido estudiada ampliamente. Este fenómeno puede ocurrir por la señalización de hormonas bacterianas como el ácido indol-3-acético y recientemente se ha reportado que también por compuestos orgánicos volátiles como la acetoina y el 2,3-butenediol (Ryu, *et al.*, 2003). En este trabajo reportamos la promoción del crecimiento de *Arabidopsis*, activada por la señalización de los metabolitos secundarios de *Trichoderma*, que investigamos en el laboratorio a través de bioensayos de interacción planta-hongo en placas petri (Fig.1a, b y c), encontrando que las plantas inoculadas con *Trichoderma* (*T. virens* y *T. atroviride*) crecen de manera significativa comparadas contra las plantas no inoculadas (Fig. 2 a), indicando esto que *Trichoderma* promueve el crecimiento de *Arabidopsis* un 30% más, referente a la biomasa foliar y radicular después de cuatro días de interacción (Fig1h). Esto indica en particular que *Trichoderma* libera compuestos difusibles que estimulan fuertemente el crecimiento de las plantas.

Sin embargo uno de los efectos directos más interesantes sobre *Arabidopsis* son los cambios morfofisiológicos en la arquitectura de la raíz que se correlacionan con un aumento significativo en el crecimiento longitudinal de la raíz primaria y el incremento dramático de hasta ocho veces más en el número de raíces laterales (Fig1 d, e y f, Fig. 2.b).

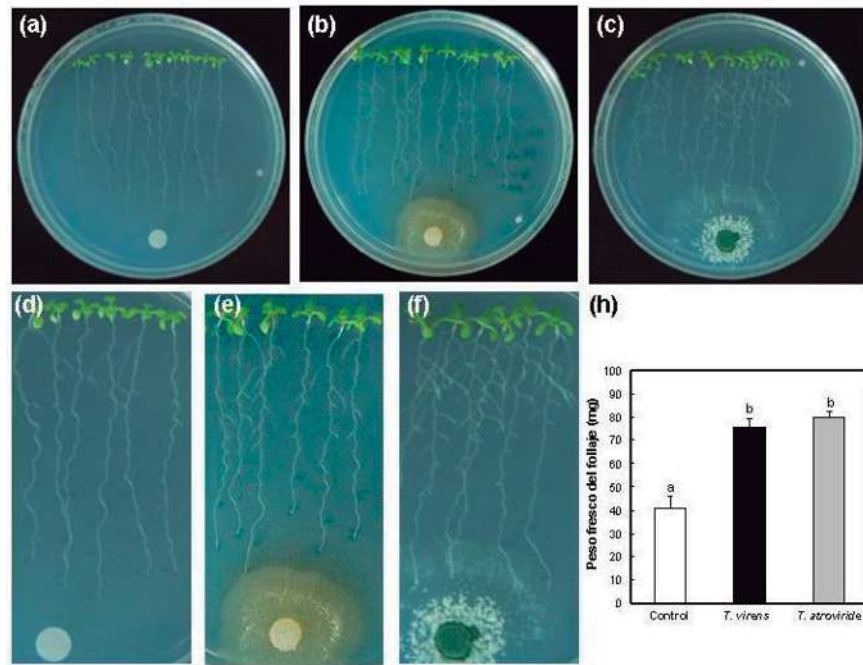


Figura 1| Sistema experimental de interacción planta-hongo. (a) Plantas control (Col-0). **(b)** Interacción *Arabidopsis* –*Trichoderma virens* Gv.29-8 (4 días después). **(c)** Interacción *Arabidopsis*-*Trichoderma atroviride* IMI 206040 (4 días después). **(d)** Formación de raíces laterales en plantas control (Col-0). **(e)** Inducción de raíces laterales en plantas inoculadas con *T.virens* después de 4 días. **(f)** Inducción de raíces laterales en plantas inoculadas con *T. atroviride* después de 4 días. **(h)**. Cuantificación de peso fresco foliar en plantas inoculadas con *Trichoderma*.

3.1.1 Efecto de la inoculación de *Trichoderma* sobre el sistema radicular de *Arabidopsis*.

Para analizar detalladamente los efectos de la inoculación de *Trichoderma* sobre el sistema radicular de *Arabidopsis*, el sistema de interacción *Arabidopsis-Trichoderma*, se monitoreo 5 días después encontrando que *Trichoderma* estimula el crecimiento y desarrollo de las raíces laterales (Fig.2b), no encontrando cambios significativos en el crecimiento longitudinal de la raíz primaria (Fig.2a). Sin embargo, el aumento de raíces laterales se incremento cuatro veces más cuando se inoculo con ambas especies de *Trichoderma*. El efecto de *Trichoderma* sobre el aumento en el número de raíces laterales podría ser debido a un estímulo del crecimiento de raíces laterales o a la formación de primordios de raíces laterales (PRL) por la activación de las células del periciclo. Para distinguir entre estas dos posibilidades, los (PRL) fueron cuantificados 5 días después de la inoculación fúngica. Las raíces de las plantas fueron contadas y cada PRL fue clasificado según su etapa del desarrollo según lo divulgado por Malamy y Benfey (1997). Encontramos que la distribución de la etapa de PRL fue afectada positivamente por *T. virens* y *T. atroviride* en la etapa VII de PRL, que corresponden a PRL emergentes con los meristemas completamente activos (Fig. 2c). Estos datos sugieren que *Trichoderma* puede promover la ramificación de la raíz, induciendo crecimiento de raíces laterales más bien que en la formación de nuevos PRL.

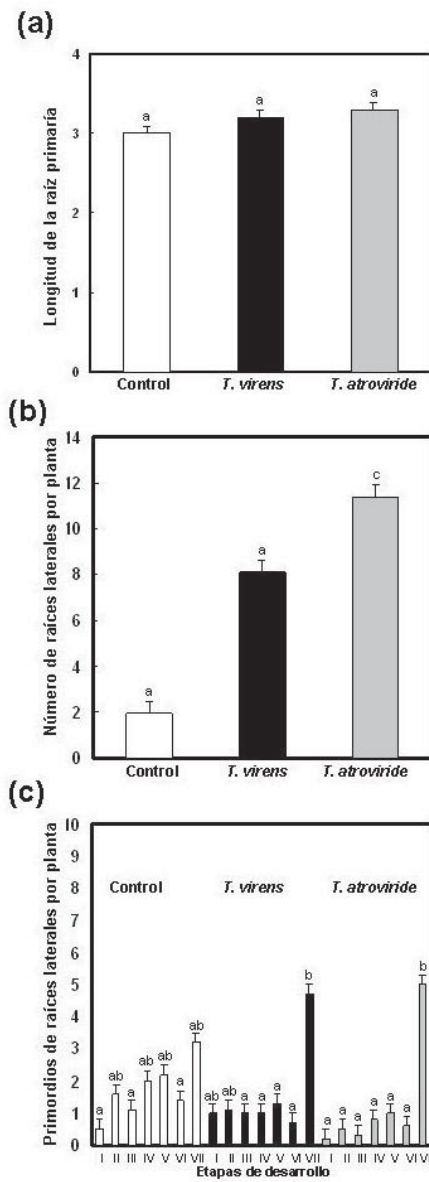


Figura 2| Efecto de la inoculación de *Trichoderma* sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. (a). Crecimiento longitudinal de la raíz primaria en plantas silvestres (Col-0) inoculadas con *Trichoderma* (4 días después de la inoculación, n=30 plantas). (b). Cuantificación del número de raíces laterales en plantas silvestres inoculadas con *Trichoderma* (4 días después de la inoculación). (c). Cuantificación del desarrollo de primordios de raíces laterales en plantas inoculadas con *Trichoderma* (4 días después del inoculo).

3.2 *Trichoderma* induce la expresión de *CycB1,1:uidA* en los meristemos de las raíces de *Arabidopsis*.

El crecimiento de las plantas responde rápidamente a las señales de desarrollo endógenas y del medio ambiente. En este trabajo es evidente que los metabolitos difusibles de *Trichoderma*, tienen efectos directos sobre la morfogénesis radicular de *Arabidopsis*, iniciando así la señalización y mecanismo para promover el crecimiento de las plantas. Entonces para determinar la participación directa de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*, la realización de experimentos *in vitro* con plantas transgénicas con el gen reportero *CycB1,1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999) de división celular en la fase G2/M, que mediante tinción histoquímica reporta la actividad mitótica de las células individualmente, encontramos que *Trichoderma* regula el crecimiento de las plantas interviniendo directamente en el ciclo de división celular en esta fase. Estos bioensayos indican que las células de las plantas inoculadas tienen una mayor actividad en el ciclo de división celular y que expanden su tamaño para la zona del meristemo de las raíces primarias y laterales, existiendo cambios en la expresión de *CycB1,1:uidA* con una mayor inducción en las plantas inoculadas, encontrando que las células de los meristemos de las raíces primarias expresan tres veces más este gen (Fig. 3-b) y en los meristemos de las raíces laterales se induce la expresión dramáticamente, hasta diez veces más cuando se inocula con *Trichoderma* (Fig. 3c y d).

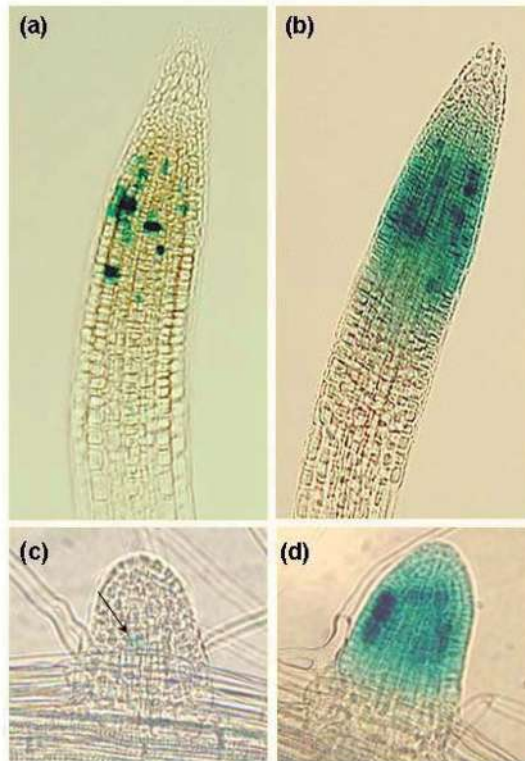


Figura 3| Regulación de la expresión del marcador *CycB1:uidA* de división celular en la fase G2/M en meristemas de raíces primarias y raíces laterales por la inoculación de *Trichoderma*. (a) Expresión del marcador *CycB1:uidA* en el meristemo de la raíz primaria en plantas no inoculadas. **(b)** Inducción de la expresión del marcador *CycB1:uidA* en el meristemo de la raíz primaria en plantas inoculadas con *T. virens*. **(c)** Expresión del marcador *CycB1:uidA* en el meristemo de la raíz lateral en plantas no inoculadas. **(d)** Inducción de la expresión del marcador *CycB1:uidA* en el meristemas de la raíz lateral en plantas inoculadas con *T. virens*.

3.3 *Trichoderma* induce la expresión de *DR5:uidA* en *Arabidopsis*.

Las auxinas, hormonas de las plantas, desempeñan importantes funciones en el crecimiento y desarrollo vegetal, por lo menos en gran parte regulando la expresión de genes relacionados con estas fitohormonas e interviniendo directamente en el ciclo de división celular. Muchas especies de bacterias producen auxinas o compuestos afines a auxinas y etileno (Bowen-Rovira, 1999). Se ha demostrado que las auxinas y etileno reprimen el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*. Para determinar si durante la promoción del crecimiento de las plantas están implicados compuestos difusibles de tipo auxina utilizamos plantas transgénicas con el gen reportero *DR5:uidA* de respuesta a auxinas (Sabatini, *et al.*, 1999; Stepanova, *et al.*, 2005; Ulmasov *et al.*, 1997), encontrando interesantemente que al cabo de cuatro días después de la interacción entre la planta y el hongo, existen cambios en la expresión de *DR5:uidA* en distintas zonas de la planta, para la parte aérea, en las hojas y meristemas de los cotiledones, así como en el meristemo apical (Fig. 4 a y d) y para la parte radicular en la cofia, meristemo y zona de elongación (Fig. 4 b y e). Sin embargo el efecto más impresionante, es la inducción de la expresión de *DR5:uidA* en las raíces laterales (Fig. 4 c y f), indicando esto que *Trichoderma* produce compuestos de tipo auxina, que son transportados, metabolizados y redistribuidos por toda la planta.

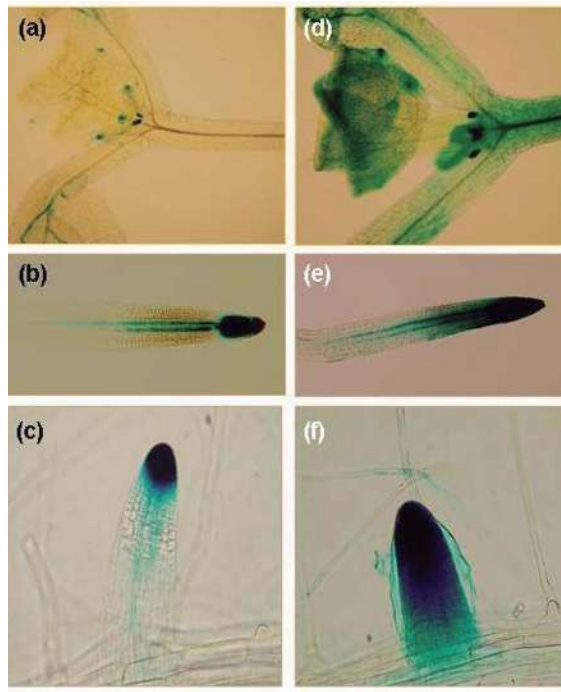


Figura 4| Regulación de la expresión del marcador *DR5:uidA* de respuesta a auxinas en follaje, meristemas de raíces primarias y raíces laterales por la inoculación de *Trichoderma*. (a) Expresión del marcador *DR5:uidA* en la parte foliar de plantas no inoculadas. (b) Expresión del marcador *DR5:uidA* en el meristemo de la raíz primaria en plantas no inoculadas. (c) Expresión del marcador *DR5:uidA* en el meristemo de la raíz lateral en plantas no inoculadas. (d) Inducción de la expresión del marcador *DR5:uidA* en la parte foliar de plantas inoculadas con *T. virens*. (e) Inducción de la expresión del marcador *DR5:uidA* en el meristemo de la raíz primaria en plantas inoculadas con *T. virens*. (f) Inducción de la expresión del marcador *DR5:uidA* en el meristemo de la raíz lateral en plantas inoculadas con *T. virens*.

3.4 Efecto de la inoculación de *T. virens* sobre el crecimiento y desarrollo de raíces laterales en plantas afectadas en la respuesta de auxinas en *Arabidopsis*.

Entonces, evaluamos los efectos de la inoculación de *T. virens* sobre el crecimiento de las plantas mutantes de auxinas en *Arabidopsis*, afectadas en el transporte (*aux1-7*, *doc1* y *eir1*) o la respuesta de auxinas (*axr1-3*). Después de cuatro días de la germinación y crecimiento en medio MS 0.2x, las plantas fueron inoculadas 5 cm debajo de la raíz primaria, al término de este periodo se evaluó la promoción del crecimiento. Se observó para las plantas control una promoción del crecimiento, por el contrario, las cuatro líneas mutantes, *aux1-7*, *doc1*, *eir1* y *axr1*, mostraron respuesta disminuida o nula en la promoción del crecimiento por *T. virens* (Fig. 5 a) . También cuantificamos el número de raíces laterales en las plantas encontrado interesantemente una reducción dramática en la formación de raíces laterales para *aux1-7* y *axr1-3*, comparando contra las plantas inoculadas, no encontrando inducción de raíces laterales de la raíz para las plantas control e inoculadas (Fig. 5 b). Estos resultados indican que las respuestas de transporte de auxinas es importante para promover el crecimiento por parte de *T. virens* para promover el crecimiento vegetal y el desarrollo de raíces laterales.

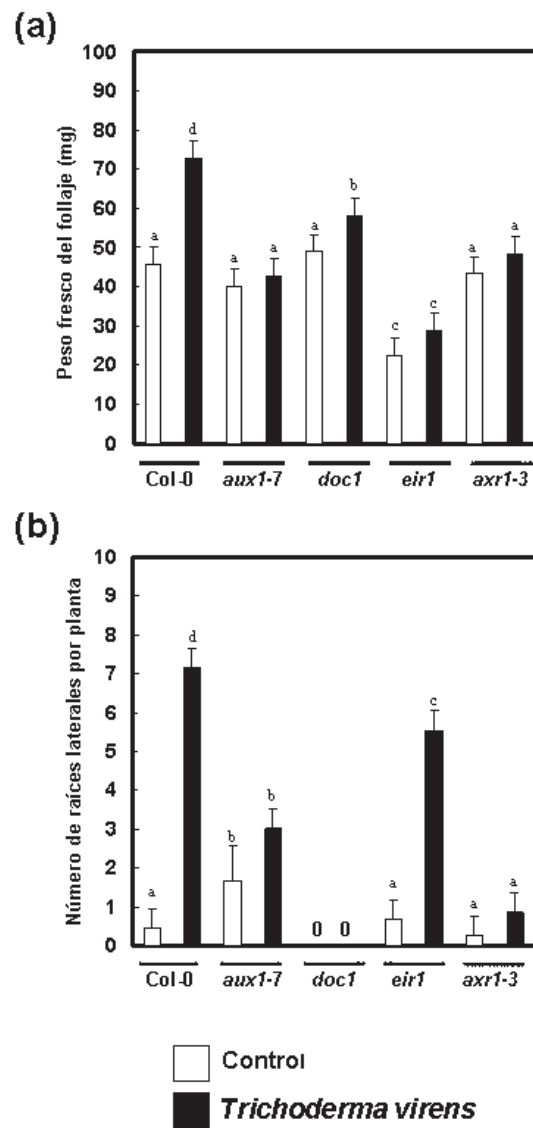


Figura 5| Efecto de la inoculación de *Trichoderma* en plantas afectadas en la señalización de auxinas. (a) Formación de biomasa foliar en plantas mutantes de respuesta a auxinas después de 4 días de la inoculación con *T. virens*. **(b)** Cuantificación del número de raíces laterales en plantas mutantes en la señalización de auxinas después de 4 días de la inoculación con *T. virens*.

3.5 *T. virens* produce los precursores del AIA: Indol-3-acetaldehído e Indol-3-etanol. La expresión inducida del marcador DR5:uidA por *T. virens* y así como la respuesta resistente de las mutantes a la inoculación, abre la posibilidad de que el hongo podría producir AIA o compuestos tipo auxinas. Entonces hicimos experimentos para identificar AIA o los compuestos relacionados a partir de los medios de cultivo líquido de *T. virens*, las muestras fueron preparadas para el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas, utilizando medios de cultivo adicionados con triptofano y sin triptofano, encontrando un aumento pequeño en las concentraciones de los compuestos producidos (Tabla 1). Interesantemente encontramos que *T. virens* produce indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol (Fig. 6), sugiriendo que IAAld e IET son probablemente los productos finales del metabolismo de Trp en *T. virens*.

Tabla 1. Cuantificación de compuestos auxínicos de *Trichoderma virens*. *T. virens* fue inoculado en 1 l de cultivo líquido con y sin 100 mg de L-Trp y determinado por GC-MS después de 3 días de crecimiento. Los datos mostrados son de cálculos $\pm$ los errores estándar pertenecen a tres muestras de medios de cultivo independientes (n=3).

Compuestos	Tiempo de retención (min)	Concentración ($\mu\text{g/l}^{-1}$)	
		-L-Trp	+L-Trp
Indol-3-acetaldehído	8.83	59.41 $\pm$ (4.47) ^a	70.15 $\pm$ (3.78) ^{ab}
Indol-3-etanol	9.97	139.10 $\pm$ (6.22) ^{ab}	202.09 $\pm$ (9.40) ^b

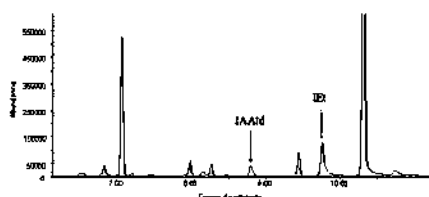


Figura 6| Cromatograma típico del análisis por GC-MS, del cultivo líquido. La muestra se ajustó a pH de 7 y los compuestos extraídos con acetato de etilo. Se muestra la elucidación de compuestos indólicos producidos por *T. virens*, Indol-3-acetaldehído (IAAld) e Indol-3-etanol (IET).

3.6 Indol-3-acetaldehído activa la expresión de los genes quiméricos DR5:uidA y BA3:uidA, inducibles por auxinas.

Para probar si el indol-3-acetaldehído podría alterar la expresión del gen DR5:uidA regulado por auxinas, según lo observado por la inoculación de *T. virens* en *Arabidopsis*, analizamos la expresión los marcadores de los genes inducibles por auxinas DR5:uidA y BA3:uidA. La figura 7 nos muestra el análisis histoquímico de las plantas transgénicas DR5:uidA y de BA3:uidA que fueron crecidas 6 días bajo el tratamiento del ácido indol-3-acético (AIA) e indol-3-acetaldehído (IAAld). Encontrando que en las plantas control la expresión de DR5:uidA esta ausente en los cotiledones y hojas así como en la región de la extremidad de la raíz (Fig. 7 a y b). Las plantas crecidas bajo una concentración de 1 μ M de AIA mostraron actividad de GUS en los cotiledones y la raíz primaria (Fig. 7 c y d). En las plantas con el marcador DR5:uidA el patrón de expresión de GUS a una concentración de 2 a 8 μ M de indol-3-acetaldehído el efecto seguía siendo similar a los efectos inducidos en las plantas tratadas con AIA (Fig. 7 e-j). Las plantas con el marcador BA3:uidA tratadas con el solvente, el marcador no mostró niveles perceptibles de la actividad de GUS (Fig. 7 k y l), mientras que cuando se trataron a una concentración 1 μ M de AIA, mostraron la expresión de GUS principalmente en petioles de los cotiledones (Fig. 7 m y n) y en la zona del alargamiento de la raíz (Fig. 7n). La expresión de GUS en las plantas tratadas con el indol-3-acetaldehído fue observada claramente en las mismas regiones que las plantas tratadas AIA (Fig. 7 o-t). Estos resultados muestran que los tratamientos con el indol-3-acetaldehído pueden activar la expresión de los marcadores inducibles por auxinas manera similar a la observada por AIA, una auxina endógena de las plantas.

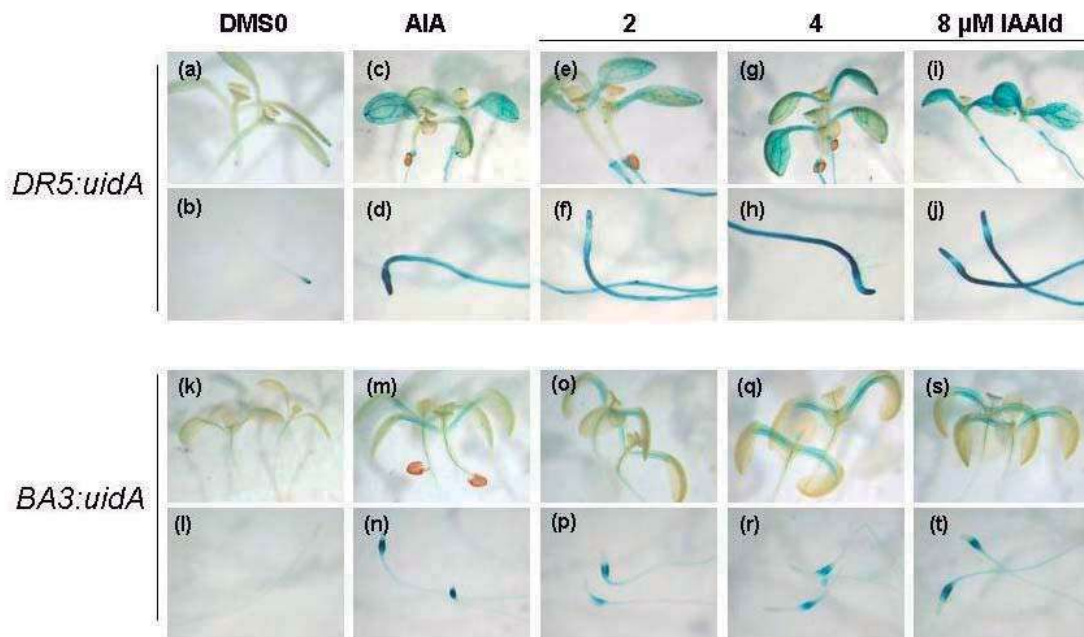


Figura 7| Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre la expresión de los genes quiméricos DR5:uidA y BA3:uidA, inducibles por auxinas en *Arabidopsis*. (a) Expresión del marcador DR5:GUS en la parte foliar de plantas tratadas con el solvente. (b) Expresión del marcador DR5:GUS en la raíz primaria de plantas tratadas con el solvente. (c) Inducción de la expresión del marcador DR5:GUS en la parte foliar de plantas tratadas a una concentración 2 μ M de AIA. (d) Expresión del marcador DR5:GUS en la raíz primaria de plantas tratadas en presencia de un gradiente 2 μ M de AIA. (e, g e i) Inducción de la expresión del marcador DR5:GUS en la parte foliar de plantas tratadas con IAAld, 2, 4 y 8 μ M, respectivamente. (f, h y j) Inducción de la expresión del marcador DR5:GUS en la parte foliar en presencia de un gradiente 2, 4 y 8 μ M, respectivamente. (k) Expresión del marcador BA3:GUS en la parte foliar de plantas tratadas con el solvente. (l) Expresión del marcador BA3:GUS en la raíz primaria de raíces primarias de plantas tratadas con el solvente. (m) Inducción de la expresión del marcador BA3:GUS en la parte foliar de plantas tratadas a una concentración 2 μ M de AIA. (n) Inducción de la expresión del marcador BA3:GUS en la raíz primaria en presencia de un gradiente 2 μ M de AIA. (o, q y s) Expresión del marcador BA3:GUS en la parte foliar de plantas tratadas con IAAld, 2, 4 y 8 μ M, respectivamente. (p, r y t) Inducción de la expresión del marcador BA3:GUS en las raíces primarias en presencia de un gradiente 2, 4 y 8 μ M, respectivamente.

3.6.1 Indol-3-acetaldehído regula el sistema radicular de *Arabidopsis*.

Para determinar los efectos del indol-3-acetaldehído sobre el sistema radicular de *Arabidopsis* sembramos semillas del ecotipo columbia-0 en medio MS 0.2x a concentraciones de IAAld que se incrementaban a partir de 0.25 a 8 μ M. Evaluando, la longitud de la primaria raíz, el número de raíces laterales, y la densidad de raíces laterales. Después de 10 días de crecimiento, se observó que las concentraciones de IAAld mayor a 1 μ M inhibieron el crecimiento de la raíz primaria de manera dosis-dependiente (Fig. 8a). También se observó que las plantas tratadas con IAAld indujeron un sistema radicular altamente ramificado, encontrando un aumento dramático del doble en el número de raíces laterales en concentraciones a partir de 0.25 a 2 μ M de IAAld comparando éstos efectos contra las plantas tratadas con el solvente (Fig. 8b). La densidad de raíces laterales también fue calculada dividiendo el número de raíces laterales por la longitud de la raíz primaria, encontrando que la densidad de las raíces laterales aumentó el doble en las plantas tratadas con IAAld, comparando estos efectos contra las plantas no tratadas con el IAAld (Fig. 8c). Estos resultados indican que el IAAld regula el sistema radícula de *Arabidopsis* de una manera similar a la descrita por auxinas naturales y sintéticas.

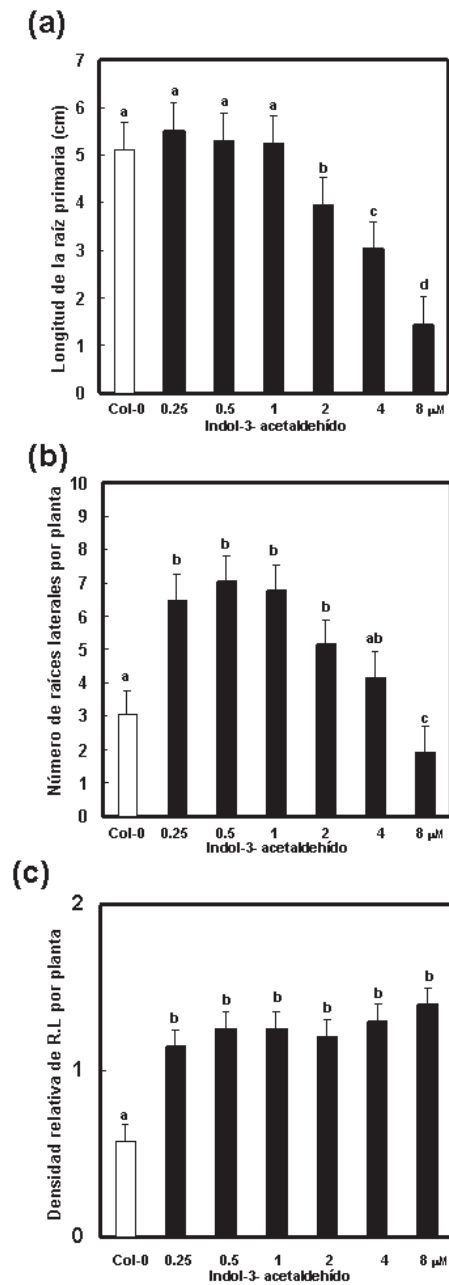


Figura 8| Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre el crecimiento y desarrollo post embrionario de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* (Col-0). (a) Crecimiento longitudinal de la raíz primaria. (b) Inducción de la formación de raíces laterales. (c) Densidad relativa de raíces laterales en la raíz primaria.

3.6.2 Indol-3-acetaldehído revierte el fenotipo defectuoso de pelos radiculares en la mutante de *rhd6* de *Arabidopsis*.

Los pelos radiculares de *Arabidopsis* son un buen sistema para estudiar la diferenciación de la célula y la morfogénesis en las plantas. El estudio de su desarrollo es también de gran interés debido a su supuesta función en la toma de agua y captación de nutrientes. Varias mutaciones relacionadas con las auxinas se han encontrado al alterar el desarrollo de pelos de la raíz (Parker *et al.*, 2000). De interés particular la mutante *rhd6*, que es defectuosa en la iniciación del pelos radiculares y se ha demostrado previamente que las auxinas revierten el fenotipo induciendo la formación de estas estructuras (Masucci y Schiefelbein, 1994). Utilizando la mutante *rhd6* como herramienta para investigar el mecanismo de acción del IAAld. Comparamos la respuesta de los pelos radiculares de las plantas silvestres (Col-0) y de la mutante *rhd6* al AIA e IAAld después 5 días de germinación. Según lo mostrado en el cuadro 9 los tratamientos con 0.05 μ M de AIA y 4 μ M de IAAld estimularon el alargamiento de los pelos radiculares y aumento en su formación en la raíz primaria (Fig. 9a-c). Las plantas de la mutante *rhd6* crecidas en medio sin auxinas eran totalmente desprovistas de pelos radiculares (Fig. 9d). Interesante, se encontró que el AIA e IAAld rescataron el fenotipo defectuoso de la mutante *rhd6* (Fig. 9e y f). El AIA e IAAld produjeron la formación de pelos radiculares en cada uno de estos experimentos mostrando crecimiento y morfología normal. Estos resultados indican que la aplicación exógena de IAAld puede suprimir los defectos de la formación de pelos radiculares de la mutante *rhd6*.

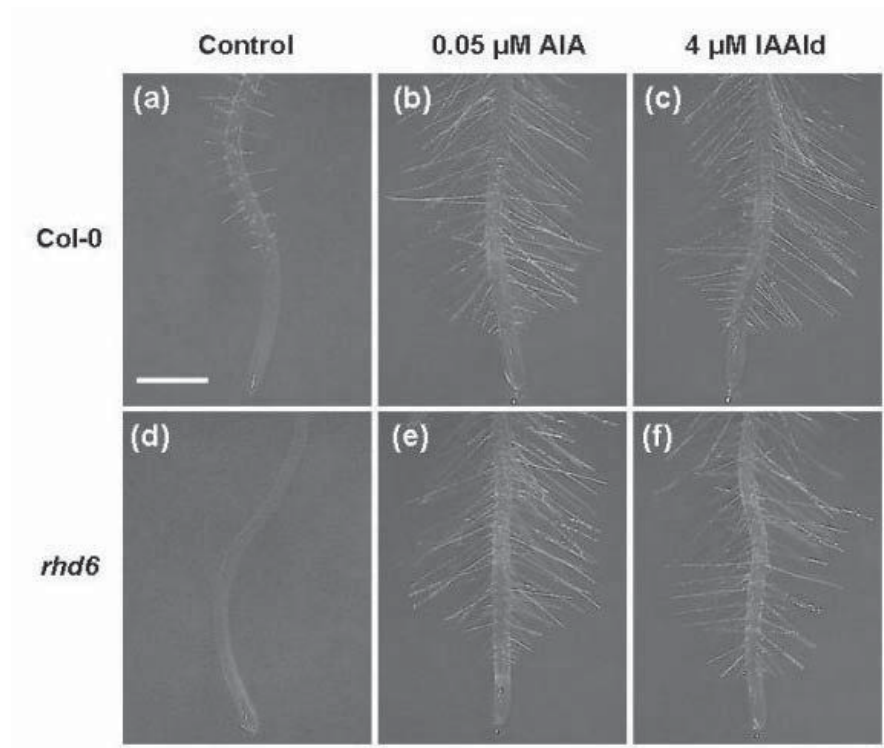


Figura 9| Efecto del Indol-3-acetaldehído sobre la morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis*.

(a) Formación de pelos radiculares en plantas silvestres (Col-0), tratadas con el solvente. **(b)** Inducción de la formación de pelos radiculares en plantas silvestres en presencia de un gradiente 0.05 μM de AIA. **(c)** Efecto del IAAld sobre la inducción de pelos radiculares en presencia de un gradiente 4 μM en plantas silvestres (Col-0), nótese que los pelos son más densos y largos comparado contra la planta control y se comporta biológicamente como el AIA. **(d)** Fenotipo *rhd6*, mutante resistente a la formación de pelos radiculares. **(e)** Fenotipo *rhd6* que revierte el fenotipo e induce la formación de pelos radiculares en un gradiente 0.05 μM de AIA **(f)**. Fenotipo *rhd6* que se ve auxiliado en la formación de pelos radiculares en presencia de un gradiente 4 μM de IAAld. El IAAld la mutante *rhd6*, lo reconoce como AIA.

3.7 DISCUSIÓN

En éste trabajo reportamos la promoción del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* por parte de *Trichoderma virens* a través de un mecanismo dependiente de auxinas. *Trichoderma* spp. son hongos que se encuentran comúnmente en el suelo y pueden colonizar las raíces, estimulando así el crecimiento de las mismas. *Trichoderma* es utilizado contra una amplia gama de microorganismos fitopatógenos así como también para estimular el crecimiento de las plantas repercutiendo esto en la producción de cosecha y el control de enfermedades. Su uso agrícola podría ser ampliado si los mecanismos de estimulación del crecimiento fuesen conocidos. Se han propuesto mecanismos moleculares para la promoción del crecimiento por parte de *Trichoderma*, pero experimentalmente no han sido probados (Harman, *et al.*, 2004). Entre éstos, se encuentra la promoción del crecimiento implicando la ruta de señalización mediado por auxinas. En nuestro trabajo se investigó el efecto de la inoculación de *Trichoderma* sobre el crecimiento y desarrollo vegetal utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo.

En el sistema de interacción hecho se encontró que las dos especies de *Trichoderma* utilizadas estimulan el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis in vitro*, sugiriendo esto que estos hongos actúan probablemente como microorganismos promotores del crecimiento de las plantas mediante mecanismos directos. Se reporto previamente que *Trichoderma* puede colonizar el sistema radicular (Harman *et al.*, 2004b). También se ha reportado que la colonización fúngica estimula el crecimiento vegetal por un mejor desarrollo del tamaño de las raíces así como la profundidad de anclaje en el suelo y la absorción de nutrientes (Yedidia *et al.*, 2001; Harman *et al.*, 2004). Es evidente que la inoculación de *Trichoderma* afectó positivamente el desarrollo de raíces laterales, así como la formación de biomasa foliar en *Arabidopsis* de manera que esto sugiere que estos efectos están mediados auxinas (Fig. 1). El ácido de Indol-3-acético (AIA) es una molécula que es sintetizada por las plantas y algunos microorganismos (Woodward y Bartel, 2005). En plantas el AIA desempeña un papel dominante en

el crecimiento y desarrollo de la raíz. La hormona se mueve a partir de una porción de la planta a otra por los sistemas específicos del transportador que implican el importador de auxinas (AUX1) y las proteínas de eflujo (PIN1-7). El AIA es un regulador dominante del desarrollo de raíces laterales y del desarrollo de pelos radiculares (Woodward-Bartell, 2004). Los estudios de la expresión del marcador inducible por auxinas DR5:uidA sugirieron que la inoculación de *T. virens* incrementa la respuesta de auxinas en las plantas *Arabidopsis* (Fig. 4).

Para detallar algunos aspectos de la percepción y transporte de auxinas implicado en la señalización de *T. virens*-*Arabidopsis* durante el crecimiento y las respuestas de desarrollo de las mutantes de *Arabidopsis* afectadas en los vías de transducción de señales, encontramos que las mutantes en el transporte de auxinas (*aux1-7*, *eir1* y *doc1*) tienen una respuesta reducida al hongo en términos de promoción del crecimiento (Fig.5a) y del desarrollo de raíces laterales (Fig. 5b). En particular, la mutante *doc1*, que es defectuosa en el gen BIG muestra defectos en la iniciación de raíces laterales que se pueden revertir cuando se adicionan auxinas muestra una inducción nula en la formación de raíces laterales cuando se inocula con *T.virens* (Fig. 5b). Estos resultados indican que el transporte de auxinas es importante para las respuestas de crecimiento y morfogénesis de las plantas. También se encontró que la mutante resistente a auxinas *axr1-3* también redujo sus respuesta a la inoculación por *T. virens* lo que sugiere que el gen correspondiente sea requerido por *Arabidopsis* para aumentar su crecimiento y formar raíces laterales abundantes cuando es inoculado con el hongo (Fig 5 a y b). Estos resultados indican que la promoción del crecimiento vegetal por *T. virens* implica la clásica ruta de señalización mediada por auxinas.

En este estudio, demostramos la presencia de dos compuestos asociados con la actividad de las auxinas, el indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol en el medio del crecimiento de *T. virens* (Fig. 6). Cuando el Trp fue agregado al medio de crecimiento de *T. virens*, la producción de los precursores del AIA no se podía demostrar directamente, sin embargo la presencia de IEt era evidente y su producción fue de manera creciente (tabla 1). Aunque extensamente se acepta que las plantas utilizan varias rutas para sintetizar AIA, se han propuesto varios

caminos Trp-dependientes: el camino del ácido indol-3-pirúvico (AIP), el camino del indol-3-acetamida (IAM), el camino de la triptamina, y el camino del indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Woodward y Bartel, 2004). El camino de AIP [Trp a AIP a indol-3-acetaldehído (IAAld) a AIA] es importante. El AIA que sintetizan los microorganismos (Koga, 1995) puede funcionar en las plantas también (Cooney y Nonhebel, 1991). La enzima final en el camino propuesto de AIPA es un oxidasa IAAld-específico del aldehído (AAO1) que ha aumentado la actividad en la mutante de AIA-sobre productora *superroot1* (*sur1*) (Seo, *et al.*, 1998). La identificación de AAO1 en *Arabidopsis* sugiere que esta planta y el IAAld microbiano producido se puedan utilizar para producir AIA en plantas. Varias líneas de evidencia apoyan la visión de que el índice de la biosíntesis de las auxinas es conforme a la regulación de varios precursores del AIA que actúan como compuestos del almacenaje. El IAAld se puede convertir a Indol-3-etanol (IEt) por una enzima reductasa del indol-3-acetaldehído. Esta enzima se ha caracterizado en las plantas de pepino, donde desempeña un papel importante en biosíntesis de las auxinas. El IAAld e IEt se encuentran naturalmente en las plantas (Purves y Brown, 1978, Magnus *et al.*, 1982), sugiriendo que estos compuestos pueden actuar como compuestos de reserva para la biosíntesis de AIA. La conversión de IEt a AIA se ha demostrado plantas de pepino (Rayle y Purves, 1967). Relativamente poca información está disponible en a cerca de la biosíntesis de AIA en hongos. La producción de AIA por la ruta del AIP fue identificada en *Colletotrichum* (Chungking *et al.*, 2003). Mediante cromatografía líquida de alta resolución y el análisis de las manchas cromogénicas después de que una separación en capa fina se identificaron inequívocamente el AIA, IEt, IAAld y AIP a partir de cultivos adicionados con Trp. Interesantemente, aumentando las concentraciones de Trp aumentaron drásticamente los niveles de IEt, pero no de AIA (Chungkin *et al.*, 2003). Se ha sugerido que en este caso que IEt puede ser el producto final del metabolismo de Trp más bien que un producto intermediario del AIP para *T. virens*.

En este trabajo mostramos de manera evidente que el Indol-3-acetaldehído, funciona biológicamente como una auxina en *Arabidopsis*, para estimular la actividad de los órganos para crecer o alargarse o establecer un programa de desarrollo particular tal como formación de raíces laterales, las plantas han desarrollado mecanismos para responder a los estímulos bióticos y abióticos. Muchas de las respuestas de las planta a los factores ambientales son mediadas por los fitohormonas, tales como auxinas. El ácido de Indol-3-acético, se ha considerado como la auxina típica de las plantas, encontrando que estimula principalmente el alargamiento de las célula en hipocotilos y respuestas de crecimiento de las raíces primarias (Woodward y Bartel, 2004). Sin embargo, el espacio químico, que abarca el termino "auxina"; no se alcanza realmente, puesto que muchos compuestos presentan actividad auxínica (Ferro *et al.*, 2007). Nuestra identificación del indol-3-acetaldehído, un precursor de AIA en la ruta del AIP, nos ha incitado a evaluar su actividad auxínica en *Arabidopsis*.

Tres líneas de evidencia genética robusta en *Arabidopsis* indican que el indol-3-acetaldehído actúa como una auxina: Los estudios de la expresión de los marcadores inducibles por auxinas DR5:uidA y BA3:uidA, la regulación del sistema de la raíz por la aplicación exógena del compuesto, y la complementación del fenotipo defectuoso de pelos radiculares en la mutante *rhd6* de *Arabidopsis*.

En nuestros experimentos, la expresión inducida de DR5:uidA y BA3:uidA a concentraciones de 2 - 8 μ M de IAAld en las raíces y parte foliar, son una evidencia clara de la función auxínica del indol-3-acetaldehído (Fig. 7).

Interesante, un efecto dosis-dependiente del IAAld se observó en el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales, así como la densidad de las mismas se observó (Fig.8), indicando que este compuesto tiene efectos profundos en morfogénesis de la raíz. También nuestros resultados muestran evidencias que indican que el IAAld pudiera actuar como una auxina, surge del análisis de la respuesta de la formación de pelos radiculares en la mutante *rhd6*. La asociación reportada por Masucci y Schiefelbein en el 1994, entre las auxinas y la mutación *rhd6*, nos sugirió que el gen *RHD6* se podría utilizar como herramienta para investigar el mecanismo de acción del IAAld como una auxina.

Bajo nuestras condiciones de crecimiento de las plantas mutantes *rhd6*, con IAAld se encontró que revierte el fenotipo de la formación de pelos radicales de manera similar al AIA (datos no mostrados). La inoculación con *T. virens* o el uso de los extractos de *T.virens* también indujo la formación de pelos de la raíz en la mutante *rhd6* (datos no demostrados), sugiriendo que los efectos sobre el desarrollo de la inoculación fúngica en *Arabidopsis* ocurran probablemente por la producción de una auxina, probablemente IAAld o su precursor el IET. Por lo tanto proponemos un modelo de regulación vegetal por parte de *Trichoderma virens* (Fig.10).

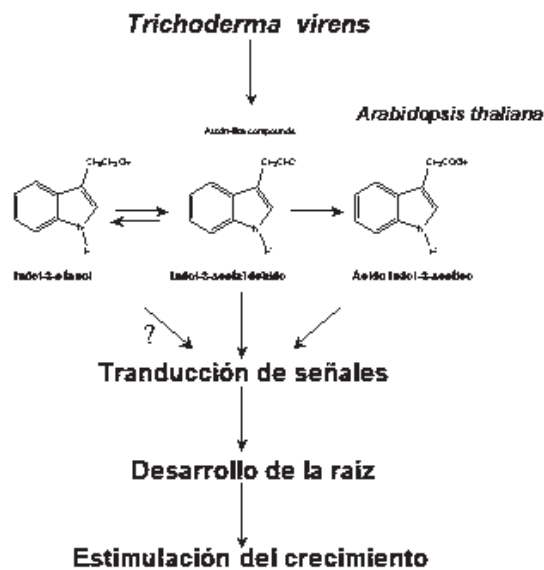


Figura 10| Modelo propuesto para la regulación del crecimiento y de sarrollo post embrionario de *Arabidopsis* por *Trichoderma virens*.

V. Conclusión

Desde hace algunos años se conocía el potencial de *Trichoderma* para promover el crecimiento de las plantas con diversos modelos vegetales, en sistemas axénicos o en el campo. Nuestro sistema de interacción planta-microorganismo nos permitió elucidar el primer mecanismo molecular que implica la ruta de señalización mediado por auxinas en la vía del ácido indol-3-pirúvico por el cual *Trichoderma* promueve el crecimiento en nuestro modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, induciendo principalmente la formación de biomasa foliar y desarrollo de raíces laterales, sin embargo se abre la posibilidad de encontrar otros mecanismos moleculares que se establezcan durante la interacción de *Trichoderma* con las plantas, ya sea durante la promoción del crecimiento o de respuestas de defensa.

4.1 Perspectivas

Los datos presentados en este trabajo sugieren un papel importante del indol-3-acetaldehído como auxina que indican la regulación del crecimiento vegetal por *T. virens*. Estamos trabajando actualmente en la identificación de los metabolitos auxínicos producidos por las plantas en respuesta a la inoculación con este hongo en *Arabidopsis*. Nuestros resultados muestran gran promesa hacia el uso de *Trichoderma* spp. como microorganismos reguladores del crecimiento vegetal, pudiéndose aplicar esto para la mejora del rendimiento de las plantas bajo condiciones controladas y del campo.

V. Materiales y métodos

5.1 Cepas fúngicas y condiciones de crecimiento. Para los diferentes bioensayos de este trabajo, se utilizaron las siguientes cepas: *Trichoderma virens* Gv 29-8 y *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (antes *T. harzianum*). Las cepas de *Trichoderma* fueron mantenidas en agar dextrosa papa (ADP; Difco). Para la producción compuestos auxínicos se preparo caldo dextrosa papa (Difco: PDB) adicionando un inoculo viable de 10^6 esporas de *T. virens* crecido por tres días a 28 °C con agitaciones de 200 rev/min. Para incrementar las concentraciones de los compuestos auxínicos producidos, el medio de cultivo fue adicionado con L-I triptofano (Trp; Merck, 100 mg/l).

5.2 Plantas. Para los diferentes bioensayos de este trabajo utilizamos *Arabidopsis thaliana* el ecotipo Columbia-0 (Col-0, plantas silvestres), las líneas transgénicas *CycB1;1:uidA* de *Arabidopsis* (Colón-Carmona et al., 1999), DR5:uidA (Ulmasov et al. 1997), BA3:uidA (Oono et al., 1998), y las líneas mutantes eir1-1 (Roman et al. 1995), doc1 (Li et al., 1994), axr1-3 (Lincoln et al., 1990), aux1-7 (Pickett et al., 1990), y rhd6 (Masucci y Schiefelbein, 1994). Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas de la superficie con etanol al 95% (vol/vol) durante 3 minutos, después con hipoclorito de sodio al 20% (vol/vol) agitando durante 7 minutos, posteriormente se lavaron en 5 tiempos, al término de estos procedimientos las semillas fueron sembradas, germinadas y crecidas en placas de Petri que contenían medio con sales Murashige-Skoog (MS; Sigma, Cat. M5524) a una concentración de 0.2 X, 1% de phyagar (Gaithersburg, MD, los E.E.U.U) y 1.5% de sucrosa, ajustando el pH a 7.0. Las placas de Petri fueron entonces colocadas verticalmente con un ángulo de 65°, para permitir el crecimiento gravitrópico de la raíz y no impedir el crecimiento aéreo de los hipocotilos, entonces se colocan las placas petri completamente al azar en una cámara de crecimiento (Sanyo scientific, Itasca, IL) bajo condiciones de fotoperíodos de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad, intensidad luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

5.3 Experimentos de inoculación. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* estériles se siembran en placas de petri de 100 X 15 mm, conteniendo medio MS 0.2 X. Al cabo de 4 días después de la germinación (d.d.g) las plantas se inoculan aproximadamente 4 cm. bajo las raíces de las plantas con aproximadamente 10^6 esporas de la cepa *Trichoderma virens* Gv. 29-8 y se permite la interacción por cuatro días, teniendo las plántulas 8 días de crecimiento d.d.g, a temperatura de $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodos de 16 horas de luz, 8 horas de oscuridad, con intensidad luminosa de $200\text{ }\mu\text{mol}^2\text{s}^{-1}$. Al término de este período las plántulas se seccionan de la parte foliar y radicular, para determinar el peso fresco de ambas partes, el peso fresco se determina en una balanza analítica inmediatamente después de cosechar las plántulas. Las raíces se miden con una regla y las raíces laterales se cuentan bajo un estereoscopio (AFX-II-A).

5.4 Inducciones y análisis histoquímico. Para el análisis histoquímico de la actividad de GUS, las plántulas de *Arabidopsis thaliana* se incuban durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un buffer para la reacción de GUS (0.5 mg/mL de ácido-5-Bromo-4cloro-3- β -D-glucurónico, en fosfato de sodio 100 mM, a pH de 7.0). Las plántulas teñidas se lavan empleando el método de Malamy-Benfey (1997). Para los experimentos de inducción con las plantas transgénicas con el gen reportero DR5:GUS y BA3:GUS, se crecen en medio MS 0.2 X sólido durante 5 d.d.g. al final de este período se colocan las plantas en caldo con sales estables MS a pH: 7.0 a concentraciones de 2 mM, 4mM y 8mM, y 2mM de AIA. Entonces se dejan durante 12 horas, para inducir la expresión de dichos genes. Por cada línea transgenica y por cada tratamiento por lo menos se analizan 10 plántulas transgénicas, entonces se elige una planta representativa y se capta en imagen.

5.5 Extracción y análisis de los compuestos auxínicos. La extracción y el análisis de los precursores auxínicos se realizó a partir del medio de cultivo líquido. El caldo fúngico fue filtrado y el sobrenadante ajustado con NaOH 2N a pH 7. Los compuestos auxínicos fueron extraídos con 1l de acetato de etilo. Este paso fue repetido por triplicado. Los extractos se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno gaseoso y después resuspendida en un 1 ml de acetato de etilo. Los compuestos fueron analizados en un cromatógrafo de gases serie II de Agilent 6850 equipada con un detector MS Agilent modelo 5973, con una columna capilar con las siguientes dimensiones 30 m x 0.2 milímetro x 0.25 milímetro y 5 % de silicón-metílico-fenilo (MS HP-5). Bajo las siguientes condiciones de funcionamiento: se utilizó helio como gas portador, 1 ml/min; la temperatura del detector fue de 300°C y del inyector del 250°C. El volumen de la muestra inyectada fue de 1µl. La columna fue mantenida por 3 minutos 150 °C y programada para que se incrementara 6 °C/min para una temperatura final del 270°C por 12 minutos. Los compuestos auxínicos fueron identificados por comparación con la biblioteca de espectros (NIST/EPA/NIH, "station" Hewlett Packard de Chem). En el caso de 1H-indol-3-acetaldehído se confirmó su presencia por comparación con el espectro de masas y el tiempo de retención del estándar puro (SIGMA). La cuantificación fue hecha por medio de una curva de calibración del 1H-indol-3-acetaldehído estándar.

5.6 Análisis de datos. La arquitectura radicular de *Arabidopsis*, es observada con estereoscopio AFX-II-A. Todas las raíces laterales emergiendo de la raíz primaria observadas bajo el objetivo de 3X. La longitud de la raíz primaria, es medida con una regla. La medición de la longitud de pelos radiculares se hace sobre imágenes de los controles para los diferentes tratamientos. Los datos de los diferentes experimentos son analizados con el programa estadístico SPSS 10. La significancia estadística de ($P < 0.05$).

VI. Literatura citada

Adams, P., De-Leij F. A., Lynch J.M. (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.

Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. and Harman, G.E. (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant - growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2926-2933.

Bailey, B. A., and Lumsden, R.D. (1998) In *Trichoderma and Gliocladium* Vol 2 eds. Kubicek, C. P. and Harman G. E. 185 - 204 (Taylor and Francis).

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L., Gilroy, S., Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 233-266.

Bjorkman, T., Blanchard, L.M., Harman, G.E. (1998) Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn when colonized with *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **123**: 35-40.

Boerjan, W., Cervera, M.T., Delarue, M., Beeckman, T., DeWitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagú, M., Inzé, D. (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell.* **7**:1405-1419.

Bolar, J. P. et al., (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology.* **90**: 72 -77.

Bowen, G. D., and Rovira, A.D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* **66**:1 - 102.

Brown, H.M., Purves, W.K. (1980) Indoleacetaldehyde reductase of *Cucumis sativus* L. *Plant Physiol.* **65**: 107-113.

Burr, T. W and Schippers, B. (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp - mediated plant-growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 451-457

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., Bennett, M.** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*. **13**: 843-852.
- Celenza, J.L., Grisafi, P.L., Fink, G.R.** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **9**: 2131-2142.
- Chang, Y. C., Chang, Y. C., Baker, R., Kleifeld, O. and Chet, I.** (1986) Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* **70**: 145 - 148.
- Chung, K.R., Shilts, T., Esturk, U., Timmer, L.W., Ueng, P.** (2003) Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology letters*. **226**: 23-30.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**: 503-508.
- Cooney, T.P., Nonhebel, H. M.** (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: Measurement, mass spectral identification and incorporation of 2H from 2H₂O into indole-3-acetic acid, D and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta*. **184**: 368-376.
- Datnoff, L. E., Nemec, S., and Pemezny, K.** (1995) Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biol. Control*. **5**: 427-431.
- Donzelli, B.G. G., Ostroff, G. and Harman G. E.** (2003) Enhanced enzymatic hydrolisis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydr. Res.* **338**: 1823 –1833.
- Elad, Y, and Kapat, A.** (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 177-189.
- Elad, Y.** (1994) Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protect.* **13**: 35 - 38.
- Elad, Y.** (1996) Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 719 -732.

Estelle, M., Somerville, C. (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 200-206.

Evans, H.C., Holmes, K.A and Thomas, S.E. (2003) Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. *Mycol. Prog.* **2**: 149 - 160.

Ezzi, M.I. and Lynch, J.M. (2002) Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzymol. Microb. Technol.* **31**: 1042-1047.

Ferro, N., Bultnick, P., Gallego s, A., Jacobsen, H.J., Carbo-Dorca, R., Reinard, T. (2007) Unrevealed structural requirements for auxin-like molecules by theoretical and experimental evidences. *Phytochemistry* **68**: 237-250.

Harman , G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Dis.* **84**: 377 - 393.

Harman , G. E. and Kubicek, C. P. (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2 (Taylor and Francis, London).

Harman, G. E, Howell , Charles R. Viterbo Ada, Chet Ilan and Lor ito Mateo. *Trichoderma* species opportunistic, avirulen plant symbionts. (2004) *Nature Reviews.* **2**: 43-56.

Harman, G.E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* **96**: 190-194.

Harman, G.E., Howell, C.R., Vit erbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004a) *Trichoderma* species-Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 43-56.

Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. (2004b) Interaction between *Trichoderma harzianum* strain T-22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on disease caused by *Phytophthora ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **94**: 147-153.

Himanen, K., Boucheron, E., Vaneste, S., de Almedida-Engler, J., Inzé, D., Beeckman, T. (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* **14**: 2339-2351.

Howell, C. R., Hanson, L.E., Stipano, R. D. And Puckhaber, L.S. (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology*. **90**: 248-252.

Howell, C.R. (2002) Cotton seedling preemergence damping off incited by *Rhizopus oryzae* and *Phyrrhium* spp. And its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. **92**: 177 – 180.

King, J.J., Stimart, D.P., Fisher, R.H., Bleecker, A.B. (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**: 2023-2037.

Kloepper, J. W., Tuzun, S., Liu, L., and Wei, G. (1993) In Pest Management: Biologically Based Technologies: Proceeding of the Beltsville Symposium XVII (eds Lumsden, R.D and Vaughn, J.L.) 10 -20 (American Chemical Society, Washington DC).

Koga, J. (1995). Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1249**: 1-13.

Li, H.M., Altschmied, L., Chory, J. (1994) Arabidopsis mutants define downstream branches in the phototransduction pathway. *Genes Dev.* **8**: 339-349.

Lidsey, D. L and Baker, R. (1967) Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* . **57**: 1262 - 1263.

Lincoln, C., Britton, J.H., Estelle, M. (1990) Growth and development of the *axr1* mutant of Arabidopsis. *Plant Cell*. **2**: 1071-1080.

Lo, C. T., Nelson, E. B., Hayes, C. K and Harman, G. E. (1998) Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*. **88**: 129-136.

López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Pérez-Torres, A., Ramírez-Pimentel, J.G., Sánchez-Calderón, L., Herrera-Estrella, L. (2005b) Root architecture. In: Plant architecture and its manipulation. (C. Turnbull, eds.) Blackwell Annual Review Series, Oxford. pp. 181-206.

López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Pérez-Torres, A., Rampey, R.A., Bartel, B., Herrera-Estrella, L. (2005) An auxin transport independent pathway is involved in

phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol.* **137**: 681-691.

Magnus, V., Simaga. S., Iskrig, S., Kveder, S. (1982) Metabolism of tryptophan, indole-3-acetic acid, and related compounds in parasitic plants from the genus *Orobancha*. *Plant Physiol.* **69**: 853-858.

Malamy, J.E., Ben fey, P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33-44.

Masucci, J.D., Schiefelbein, J.W. (1994) The *rhb6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root hair initiation through an auxin and ethylene associated process. *Plant Physiol.* **106**: 1335-1346.

Metcalf, D. A and Wilson, C. R. (2001) The process of antagonism of *Slcerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathol.* **50**: 249 – 257.

Nemec, S., Datnoff, L. E., and Strandberg, J. (1996) Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protect.* **15**: 735-742.

Oono, Y., Chen, Q.G., O ver Voorde, P.J., Kohler, C., Theologis, A. (1998) age mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **10**: 1649-1662.

Parker, J.S., Cavell, A., Dolan, L., Roberts, K., Grierson, C. (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **12**: 1961-1974.

Picket, F. B., Wilson, A. K., and Estelle, M. (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* **94**: 1462-1466.

Pozo M. J. et al., (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses of *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.* **53**: 525-534.

Purves, W.K., Brown, H.M. (1978) Indoleacetaldehyde in Cucumber seedlings. *Plant Physiol.* **61**: 104-106.

Rayle, D.L., Purves, W.K. (1967) Conversion of Indole-3-ethanol to Indole-3-acetic acid in cucumber seedling shoots. *Plant Physiol.* **42**: 1091-1093.

Reed, R.C., Brady, S.R., Muday, G. (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 1369-1378.

- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J. J., Rothenberg, M., and Ecker, J. R.** (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*. **139**: 1393-1409.
- Ryu, C. M., Farag, M.A, Hu, C. H., Reddy, M, S., Wei, H. X., Paré P. W.and Kloeppel, J. W.** (2003) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **100**: 4927-4932.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murffet, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weissbeek, P., and Scheres, B.** (1999) An auxin dependent distal organizer of patter and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*. **99**: 463 - 472.
- Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., Koshiba, T.** (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. **116**: 687-693.
- Sivasithamparam, K and Ghisalberti, E. L.** (1998) In *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol 1 (Eds Kubicek, C.P. And Harman, G.E) 139 -191 (Taylor and Francis, London.
- Stepanova, A. N., Hoyt j. M., Hamilton, A. A., and Alonso J. M.** (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root specific ethylene insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **17**: 2230 – 2242.
- Thrane, C., Tronsmo, A and Jensen, D.F.** (1997) Endo-1-3- β -glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. *Eur. J. Plant Pathol*. **103**: 331 – 344.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. **9**: 1963-1971.
- Woo, S., Fogliano, V., Scala, F. and Lorito M.** (2002) Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**: 353-356.
- Woodward Andrew W. and Bonnie B artel.** (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* . **95**: 707-735.

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

Yedidia, I., Benhamou, N, Kapulnik, Y and Chet, I. (2000) Induction and accumulation of PR protein activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T - 203. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 863 - 873.

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

Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology.* **86**: 1255-1260.