



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**“Regulación del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* por
los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma
atroviride* en respuesta a la disponibilidad de azúcares”**

Tesis que presenta:

ING. AGR. SARAI ESPARZA REYNOSO

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Asesor de Tesis:

Dra. en Ciencias Lourdes Iveth Macías Rodríguez

Co-Asesor:

Dr. en Ciencias José López Bucio

Morelia, Michoacán, Agosto 2017.

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de Bioquímica Ecológica y de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D. C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez y co-dirección del D. C. José López Bucio.

RECONOCIMIENTOS

ESTA INVESTIGACIÓN FUE APOYADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON LA BECA No. 576161 Y POR EL FINANCIAMIENTO DE LOS PROYECTOS DE CIENCIA BÁSICA 177775 Y 165738, ASÍ COMO EL DE Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2014 CON CLAVE 231585.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

A la D. C. Lourdes Iveth Macías Rodríguez, por sus atenciones y apoyo para la realización de este trabajo.

Al D. C. José López Bucio, por haberme dado la oportunidad de integrarme a su grupo y enseñarme que el esfuerzo y dedicación son indispensables durante la formación como investigador, por su motivación para colaborar con otros grupos de trabajo e involucrarme en diversos proyectos y por la dirección de esta tesis.

A la D. C. Sobeida Sánchez Nieto, por permitirme realizar los ensayos moleculares en su laboratorio, por todas sus atenciones y apoyo.

A los Profesores D. C. Elda Beltrán Peña, por toda la amabilidad y apoyo que ha tenido con mi persona y por su dedicación en la revisión del manuscrito, D. C. Ernesto García Pineda y D. C. Homero Reyes de la Cruz, por el tiempo dedicado a los seminarios y sus acertadas recomendaciones y sugerencias.

A los D. C. Javier Raya González y Ramón Pelagio Flores, por responder a cada una de mis dudas, por apoyarme en la parte técnica y por involucrarme en sus líneas de investigación aún a pesar de encontrarse ya a la distancia. A la M. C. Amira Garnica Vergara por su amistad, su paciencia y enseñanzas, no sólo de técnicas de laboratorio, sino de vida.

Para el resto de mis compañeros del laboratorio: a Liz, por todo el apoyo, amor y cariño que nos tenemos, que nos une y que nos unirá por siempre, a Lupita, Viri, Marina, Edith, Juanito, Aarón, Gustavo y Carlitos, por todo lo que hemos compartido juntos dentro y fuera del laboratorio, los quiero mucho a cada uno de ustedes. También a mis compañeros del Laboratorio 102 de la Facultad de Química de la UNAM, a Pau, Montse, Alex, Dani, Tomás, Nestór, Moi y la M. C. Beti King, por brindarme su amistad y procurarme todo su apoyo.

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente en esta etapa de mi vida, por todo el trabajo, esfuerzo y sacrificio que han hecho por mí, todo lo que soy es por ustedes, los amo tanto y son lo más importante en mi vida.

A mis tres hermanos, por hacerme fuerte y valiente como ellos, por todo su cariño y protección desde niños, los quiero infinitamente.

A Renato, por todo el amor que me ha dado en tan poco tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2. 1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
2. 2. La rizósfera y los exudados radiculares	7
2. 3. El género <i>Trichoderma</i>	9
2. 3. 1. Los compuestos orgánicos volátiles de <i>Trichoderma</i>	9
2. 3. 2. <i>Trichoderma</i> y el metabolismo del carbono en las plantas	11
2.4. Metabolismo de carbono en las plantas	13
2. 4. 1. Fotosíntesis	13
2. 4. 2. Señalización y metabolismo en tejidos consumidores	17
2. 5. El transporte de azúcares.....	21
2. 5. 1. Transportadores de sacarosa tipo SUT y de monosacáridos MST	23
2. 5. 2. Transportadores SWEET	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general	29
5.2. Objetivos específicos	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30

6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	30
6.2. Ensayo de co-inoculación planta/hongo.....	30
6.3. Análisis de la actividad de GUS y GFP	31
6.4. Cuantificación de clorofila	32
6.5. Determinación de sacarosa y glucosa en tejido y exudados radiculares por GC-MS	32
6.5.1. Extracción en tejidos	32
6. 5. 2. Obtención de los exudados radiculares	32
6. 5. 3. Derivación de azúcares	33
6. 5. 4. Análisis por GC-MS	33
6.6. Análisis de la expresión de los transportadores SWEET por RT-qPCR.....	34
6. 6. 1. Extracción de RNA.....	34
6. 6. 2. Corrimiento en gel de RNA y calibración	35
6. 6. 3. Reacción de transcripción reversa	35
6. 6. 4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	36
6. 6. 5. Evaluación de la especificidad de la reacción	38
6. 6. 6. Establecimiento de la eficiencia del método	38
6. 6. 7. Cuantificación de la expresión de los transportadores AtSWEET mediante RT-qPCR.....	39
6. 6. 8. Reacción en cadena de la polimerasa punto final.....	40
6. 7. Análisis de datos	40
7. RESULTADOS	41
7. 1. Efecto de los volátiles de <i>T. atroviride</i> sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> en respuesta al suministro de sacarosa localizada en el follaje	41
7. 2. Efecto de la sacarosa y los volátiles de <i>T. atroviride</i> sobre la expresión de <i>AtSUC2:GFP</i>	50
7. 3. La expresión de <i>AtSUC2:GFP</i> es dependiente de la concentración de sacarosa aplicada al follaje	53
7. 4. La deficiencia de sacarosa y los volátiles de <i>T. atroviride</i> incrementan la expresión de <i>AtSUC2:GFP</i>	55
7. 5. La 6-PP modifica la expresión de <i>AtSUC2:GFP</i>	58

7. 6. Regulación de la expresión de los transportadores SWEET de <i>A. thaliana</i> por los volátiles de <i>T. atroviride</i>	59
7. 7. Cuantificación de sacarosa y glucosa en <i>A. thaliana</i> durante la interacción con los volátiles de <i>T. atroviride</i>	63
7. 8. Efecto de la sacarosa y los volátiles de <i>T. atroviride</i> sobre la expresión de los genes que codifican para la sacarosa fosfato sintasa.....	66
7. 9. Los volátiles de <i>T. atroviride</i> promueven la fotosíntesis a través del incremento en la concentración de clorofila en <i>Arabidopsis</i>	70
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	73
9. LITERATURA CITADA	81
10. APÉNDICE.....	94
10.1. Curvas de disociación para actina, <i>AtSWEET1</i> , <i>AtSWEET4</i> , <i>AtSWEET10</i> , <i>AtSWEET11</i> , <i>AtSWEET12</i> , <i>AtSWEET113</i> , <i>AtSWEET14</i> , <i>AtSWEET16</i> y <i>AtSWEET17</i>	95
10.2 Tabla de valores obtenidos de curvas patrón para RT- qPCR	96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
FIGURA 2. La rizósfera es un entorno dinámico de actividad metabólica entre las raíces de las plantas y microorganismos del suelo.....	8
FIGURA 3. Efecto de los volátiles de <i>Trichoderma</i> sobre la biomasa de plantas de <i>Arabidopsis</i> utilizando un ensayo de placa dividida.....	11
FIGURA 4. La sacarosa en la interacción planta-hongo	12
FIGURA 5. Fase luminosa de la fotosíntesis.....	14
FIGURA 6. Esquema del Ciclo de Calvin	15
FIGURA 7. Biosíntesis de sacarosa.....	17
FIGURA 8. La descarga, transporte y metabolismo de sacarosa en las células	18
FIGURA 9. Los azúcares regulan la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i>	20
FIGURA 10. Transporte de azúcares desde los órganos fuente a consumidores.	22
FIGURA 11. Caracterización del transportador de sacarosa AtSUC2.	24
FIGURA 12. Expresión de los transportadores SWEET en <i>A. thaliana</i>	26
FIGURA 13. Las bacterias y hongos patógenos incrementan la expresión de los genes <i>SWEET</i>	27
FIGURA 14. Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa y en interacción con <i>T. atroviride</i>	42
FIGURA 15. Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la aplicación foliar de glucosa y en interacción con <i>T. atroviride</i>	44
FIGURA 16. Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la aplicación foliar de fructosa y en interacción con <i>T. atroviride</i>	45

FIGURA 17. Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa, en medio sin sacarosa y en interacción con <i>T. atroviride</i>	47
FIGURA 18. Arquitectura de la raíz de <i>Arabidopsis</i> germinadas en medio sin sacarosa y en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa e interacción con <i>T. atroviride</i>	49
FIGURA 19. Expresión del transportador de sacarosa AtSUC2 en respuesta a la sacarosa foliar y volátiles de <i>T. atroviride</i>	51
FIGURA 20. Expresión de <i>AtSUC2:GFP</i> en diferentes regiones de plántulas de <i>Arabidopsis</i>	52
FIGURA 21. Regulación de la expresión de <i>AtSUC2:GFP</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i> por el suministro foliar de sacarosa.....	54
FIGURA 22. Expresión de <i>AtSUC2:GFP</i> en el follaje de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la sacarosa suministrada en follaje	55
FIGURA 23. Expresión de <i>AtSUC2:GFP</i> en condiciones de deficiencia de sacarosa y en exposición a los volátiles de <i>T. atroviride</i>	57
FIGURA 24. Efecto de la 6-PP en la expresión de <i>AtSUC2:GFP</i>	59
FIGURA 25. Expresión de los transportadores SWEET en follaje y raíz de <i>Arabidopsis</i> ..	60
FIGURA 26. Efecto de los volátiles de <i>T. atroviride</i> sobre los niveles de expresión de los transportadores SWEET de <i>Arabidopsis</i>	62
FIGURA 27. Determinación de sacarosa y glucosa en follaje y raíz de <i>Arabidopsis</i> en interacción con <i>T. atroviride</i>	64
FIGURA 28. Determinación de sacarosa y glucosa en los exudados radiculares de <i>Arabidopsis</i> en interacción con los volátiles de <i>T. atroviride</i>	66
FIGURA 29. Expresión de los genes <i>SPS1F</i> y <i>SPS2F</i> de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a la sacarosa y volátiles de <i>T. atroviride</i>	68
FIGURA 30. La sacarosa foliar y los volátiles de <i>T. atroviride</i> inducen la expresión de <i>SPS1F</i> y <i>SPS2F</i> en el follaje.....	69

FIGURA 31. La sacarosa foliar y los volátiles de <i>T. atroviride</i> inducen la expresión de <i>SPS3F</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	70
FIGURA 32. Arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes <i>chlorina-1</i> en respuesta a los volátiles de <i>T. atroviride</i>	71
FIGURA 33. Los volátiles de <i>T. atroviride</i> incrementan la concentración de clorofila.....	72
FIGURA 34. Modelo que explica la influencia de los volátiles de <i>T. atroviride</i> sobre la regulación del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Mezcla de reacción empleada en la reacción de transcripción reversa.....	36
TABLA 2.- Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión de los transportadores SWEET en <i>A. thaliana</i>	36
TABLA 3.- Preparación de la mezcla de reacción para la técnica qRT-PCR.....	39

RESUMEN

La raíz es un tejido consumidor de azúcares, los cuales son necesarios para el desarrollo de la misma. Su principal función es la captación de agua y nutrientes minerales, así como albergar gran parte del microbioma vegetal, compuesto por bacterias, hongos y protozoarios. El hongo simbiote *Trichoderma* emite compuestos orgánicos volátiles (COVs) que pueden alterar la arquitectura radicular de *Arabidopsis* y en algunos cultivos como maíz, incrementa la capacidad de ramificación y la acumulación de biomasa. Esto implica una relocalización de los fotosintatos hacia los sitios en demanda, aunque se desconocen los mecanismos por el cual dicha interacción modifica aspectos como fotosíntesis, transporte de azúcares a la raíz, transportadores involucrados o tipo de azúcares liberados hacia la rizósfera. Con base en lo anterior, en este trabajo se investigaron los efectos de los COVs de *T. atroviride* sobre los programas de crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*. Los resultados indicaron que los COVs de *Trichoderma* incrementan la producción de biomasa y la formación de raíces laterales en medio con suministro limitado de sacarosa, lo que correlaciona con un mayor contenido de clorofila, sacarosa y glucosa tanto en el follaje como en la raíz y en la exudación de azúcares. El transporte a larga distancia de asimilados de las hojas fotosintéticas a la raíz aparentemente se produce a través de *SUC2* y fue posible identificar el 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) como uno de los compuestos volátiles responsables de la regulación de *SUC2*. Además, los volátiles de *Trichoderma* modifican los niveles de expresión de *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET14*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*. Adicionalmente, los COVs de *Trichoderma* inducen la expresión de tres isoformas de la sacarosa-fosfato sintasa, enzima que cataliza la transferencia de un grupo hexosa desde la uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa) a la D-fructosa 6-fosfato para formar UDP y D-sacarosa-6-fosfato, molécula que puede ser sintetizada *de novo* a partir de almidón o transportada a tejidos distantes para su metabolismo. Los resultados indican que la interacción de *Arabidopsis* con los volátiles de *T. atroviride* causan cambios notables en el metabolismo del carbono que se reflejan en un mejor desarrollo vegetal y en la exudación de azúcares por la raíz, con un posible impacto ecológico sobre las poblaciones microbianas de la rizófera.

Palabras clave: Volátiles, *Trichoderma*, transportadores, biosíntesis, sacarosa, *AtSUC2*.

ABSTRACT

Roots are major sink tissues and consume sugars during their development. The functions of roots are absorption of water and inorganic nutrients and anchoring to the soil, but also provides organic compounds to the plant microbiome, composed mainly of bacteria, fungi and protozoa. Free-living microbes like filamentous fungi of the genus *Trichoderma* can produce plant growth-promoting compounds, which have the capacity to increase biomass production and alter root architecture. In addition many *Trichoderma* strains are able to colonize and grow in association with plant roots. This implies a strongly demand in transport of photosynthates to sinks, although it is unknown whether interactions with these fungi increase photosynthesis, the transport of sugars among tissues, the transporters involved, and the possible exudation of these substances into the rhizosphere. Based on this information, the effects of volatiles of *T. atroviride* on *Arabidopsis* growth were tested. The results indicate that *Trichoderma* VOCs increase biomass production and the formation of lateral roots in medium with limited supply of sucrose, which correlates with a higher content of chlorophyll, the amount of sucrose and glucose available in both tissues and root exudation of sugars. The long-distance transport of assimilates from the photosynthetic leaves to the root apparently occurs through *SUC2* and it was possible to identify the 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP) as one of the volatile compounds responsible for the regulation of *SUC2*. Moreover, *Trichoderma* volatiles modify the expression levels of *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET14*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*. In addition, *Trichoderma* VOCs induce the expression of three isoforms of sucrose-phosphate synthase, an enzyme that catalyzes the transfer of a hexose group from uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) to D-fructose 6-phosphate to form UDP and D-sucrose-6-phosphate, a molecule that can be synthesized de novo from starch or transported to distant tissues for its metabolism.

All the results indicate that the interaction of *Arabidopsis* with the volatiles of *Trichoderma* causes changes in *Arabidopsis* carbon metabolism and this enhancement in plant development and root exudate sugars may have a possible ecological impact on the microbial populations of the rhizosphere.

Key words: Volatile, *Trichoderma*, transporters, biosynthesis, sucrose, *AtSUC2*.

1. INTRODUCCIÓN

La existencia de la vida en el planeta se debe en gran medida a la presencia de las plantas por su papel como productores primarios de los ecosistemas, ya que proveen oxígeno al ambiente y diversas fuentes de alimento para los organismos heterótrofos, de ahí su importancia para el hombre. Las plantas son organismos sésiles que poseen una gran plasticidad fenotípica al modificar sus programas de crecimiento y desarrollo ante los estímulos ambientales cambiantes (Valverde-Valdés *et al.*, 2005). Las plantas se componen de dos partes bien definidas, la aérea conformada por el tallo, el cual proporciona soporte a las hojas, flores y frutos, y el follaje, sitio donde se lleva a cabo la fotosíntesis. Por otro lado, la raíz es el órgano que permite el anclaje y la captación de agua y nutrientes. Al crecer la raíz por debajo del suelo se mantiene en constante interacción con los microorganismos de la rizósfera, espacio del suelo influenciado por los exudados radiculares y en donde ocurre un intercambio de diferentes clases de compuestos producidos por las plantas y sus huéspedes microbianos (Reinhardt y Kuhlemeier, 2002; Wang y Li, 2008).

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son habitantes comunes de la rizósfera, ampliamente estudiados por su capacidad antagónica y de control biológico contra patógenos vegetales, al producir antibióticos, parasitar a otros hongos y competir eficientemente por nutrientes (Harman *et al.*, 2004). Recientemente, los estudios sobre la interacción de las plantas con *Trichoderma* se han enfocado al entendimiento de los mecanismos que regulan la estimulación del crecimiento vegetal, encontrándose que el hongo produce compuestos orgánicos volátiles (COVs), auxinas y otros precursores indólicos bioactivos. Además, *Trichoderma* produce diversos metabolitos secundarios que permiten la solubilización de nutrientes del suelo, lo cual confiere una mejor adaptación al estrés abiótico y una activación de la inmunidad vegetal (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

Los COVs son moléculas de baja masa molecular que a temperatura ambiente se evaporan fácilmente. Esta característica proporciona la capacidad de difundirse a través de las membranas celulares y actuar como señales químicas en la comunicación entre especies. Los hongos producen un gran número de COVs que incluyen mezclas de alcoholes, cetonas, ésteres, alquenos, monoterpenos y sesquiterpenos (Schenkel *et al.*, 2015). *Trichoderma* sintetiza una amplia gama de COVs y su efecto en la promoción del crecimiento en las plantas

ha comenzado a dilucidarse. La mayoría de los estudios realizados sobre la interacción de plantas con los volátiles de *Trichoderma* muestran un aumento de la biomasa vegetal y un mayor desarrollo de la arquitectura radicular, atribuible en parte, a la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), uno de los COVs mayoritarios (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Hung *et al.*, 2013; Garnica-Vergara *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

No es de sorprender que uno de los procesos que se modifican con mayor versatilidad ante la percepción de las moléculas fúngicas sea la capacidad de ramificación de la raíz, que le permite a la planta incrementar su superficie de absorción y de interacción con un simbionte. Diferentes estudios han demostrado que el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales dependen de un adecuado suministro y disponibilidad de fuentes de carbono, principalmente de azúcares como la sacarosa y la glucosa (Crookshanks *et al.*, 1998; Salisbury *et al.*, 2007; Kircher y Schopfer, 2012; Duan *et al.*, 2014).

A diferencia del conocimiento acumulado en relación a la identidad y efectos de los metabolitos microbianos sobre el desarrollo vegetal, la información existente sobre la influencia de *Trichoderma* en el metabolismo, la fotosíntesis o el transporte de azúcares y su exudación es escasa. De acuerdo a lo publicado por Vargas y col. (2009; 2011) *T. virens*, tiene la capacidad de captar y metabolizar la sacarosa secretada por las raíces de plantas de maíz mediante la expresión de un transportador de sacarosa (TvSUT) y de una invertasa intracelular (TvINV). Esta actividad sucrolítica del hongo promueve la colonización de la raíz e incrementa la tasa fotosintética en la planta. La dependencia de la bioestimulación mediada por fuentes de carbono o su influencia sobre la arquitectura radicular relacionada con *T. atroviride* o sus metabolitos es un aspecto de investigación que ha sido muy poco explorado.

En el presente trabajo se analizó el efecto de los COVs de *T. atroviride* sobre el metabolismo de carbono en *Arabidopsis*, estableciéndose una correlación directa entre la disponibilidad de azúcares sintetizados por la planta y su crecimiento. De interés fue el hecho que los volátiles de *Trichoderma* incrementan la ramificación de la raíz y la producción de biomasa radical y foliar, lo que coincide con una mayor concentración de sacarosa y glucosa en los tejidos vegetales. Un estudio detallado sobre la expresión de transportadores de azúcares sugiere que el metabolismo de azúcares a través de la sacarosa fosfato sintasa y el transportador AtSUC2 podrían tener un papel directo en la bioestimulación inducida por

Trichoderma. Finalmente, nuestro trabajo muestra las primeras evidencias que los volátiles de un hongo simbiote estimulan la exudación de sacarosa por la raíz.

2. ANTECEDENTES

2. 1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una angiosperma perteneciente a la familia de las *Brassicaceas*. Es el modelo biológico más empleado para el estudio de los procesos celulares fundamentales, así como para dilucidar las funciones de los genes y proteínas que componen a una especie vegetal. A pesar de no ser una especie de importancia agronómica, posee numerosas ventajas para su estudio. Tiene un tamaño pequeño de alrededor de 30 cm, un ciclo de vida corto de entre 6 a 8 semanas, una alta fecundidad y se puede cultivar en espacios reducidos. Su genoma se encuentra secuenciado y está distribuido en cinco cromosomas y contiene alrededor de 25,000 genes. El genoma de *Arabidopsis* es relativamente pequeño, comparado con el de otras especies como el maíz o el trigo, que presentan duplicación de genes por eventos de poliploidía. Todas estas características han permitido la identificación de un gran número de genes que participan en diferentes programas de desarrollo, por lo que existe un extenso número de mutantes afectadas en genes específicos que permiten el análisis de la participación de dichos genes en los procesos fisiológicos de la planta (Orlando *et al.*, 2009).

En la raíz de *Arabidopsis* se encuentra un pequeño número de células fuente que generan todos los tejidos a través del proceso de mitosis que ocurre en el meristemo, seguida por eventos de expansión y diferenciación celular. El crecimiento de la raíz es indeterminado, por lo que los anteriores eventos se mantienen presentes y continuos al mismo tiempo pero en diferente localización, generando así tres zonas bien diferenciadas en la raíz, la zona de división, elongación y diferenciación. El meristemo funciona gracias a la actividad de un número reducido de células con alta capacidad proliferativa, las células fuente o células iniciales. Estas se localizan en el ápice de la raíz y se encuentran en contacto con cuatro

células que son mitóticamente inactivas, denominadas centro quiescente (CQ) (Dolan *et al.*, 1993). A partir de estas células iniciales se originan columnas o filas de células organizadas a lo largo del eje longitudinal de la raíz, dominadas por linajes celulares específicos (Schiefelbein *et al.*, 1997). El arreglo de los tejidos en la raíz primaria y en las raíces laterales se conforma a través de capas radiales y concéntricas que dan lugar a la epidermis, la corteza, la endodermis, el periciclo, el xilema y el floema (Fig. 1) (Dolan *et al.*, 1993; Celenza *et al.*, 1995). A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular dará paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de elongación. Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en su forma y función finales, dando lugar a la aparición de pelos radiculares que son estructuras que emergen a partir de los tricoblastos y participan en la absorción de agua y nutrientes. En la zona de diferenciación, ocurre el desarrollo de las raíces laterales a partir de un tejido interno de la raíz primaria denominado periciclo, cuya proliferación es determinante de la arquitectura radicular y para la exploración en el suelo.

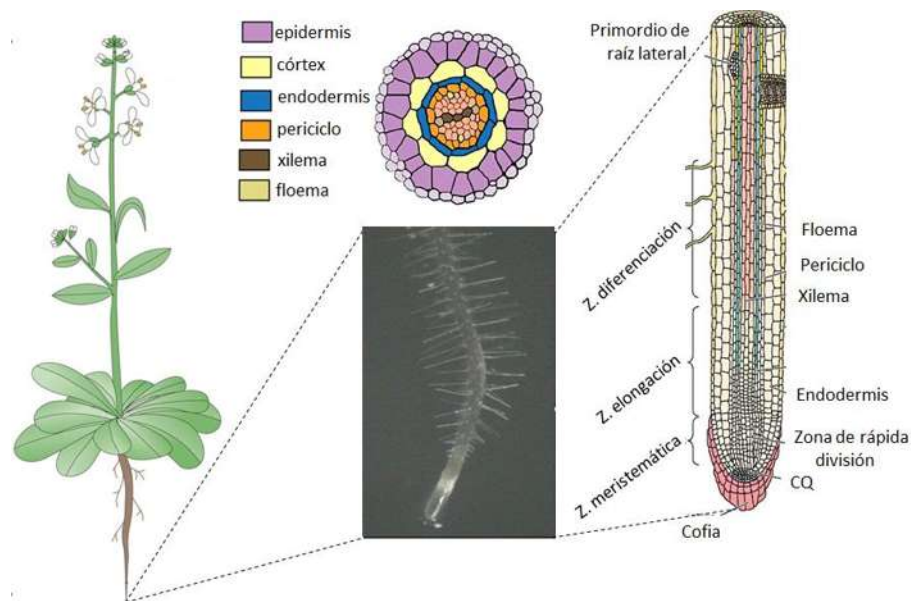


Figura 1. Estructura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. En el esquema se observan los cortes transversal y longitudinal de la raíz primaria donde se indican los diferentes tejidos que la conforman. Modificado de Taiz y Zeiger (2002).

2. 2. La rizósfera y los exudados radiculares

La rizósfera es la zona del suelo que está estrechamente influenciada por las raíces de las plantas (Wenke *et al.*, 2010). Los diversos compuestos liberados por las raíces se denominan exudados de raíz y pertenecen a tres clases principales: i) bajo peso molecular, ii) alto peso molecular y iii) compuestos orgánicos volátiles (COVs). Los compuestos de bajo peso molecular representan la porción principal de exudados y consisten en azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenólicos, vitaminas y diversos metabolitos secundarios. Los compuestos de alto peso molecular consisten en mucílago y proteínas, mientras que el dióxido de carbono y ciertos metabolitos secundarios derivados de alcoholes y aldehídos constituyen los COVs (Badri *et al.*, 2008; Badri y Vivanco, 2009).

La síntesis y la exudación de estos compuestos dependen en gran medida de la especie y factores ambientales como la temperatura, luz y tipo de suelo. Las características físicas, bioquímicas y ecológicas de la rizósfera se definen por el equilibrio entre los diferentes compuestos liberados, el momento de liberación y las sustancias únicas que se producen constitutivamente o de forma inducible. Se estima que entre el 20 y el 40% de todo el carbono fotosintéticamente fijado se transfiere a la rizósfera (Morgan *et al.*, 2005).

Los microorganismos presentes en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, actinomicetos y algas. Su presencia y la liberación de productos propios a la rizósfera también afectan a las raíces. La comunicación química entre las raíces y los microorganismos genera un efecto positivo o negativo para la planta, que determina el tipo de interacción entre ambas partes y redundante en eventos de simbiosis o patogénesis (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016). Por lo tanto, la rizósfera es un sistema dinámico en el cual las interacciones y la comunicación entre la raíz y los microorganismos juegan un papel importante en continuar manteniendo crecimiento y productividad de la planta (Broeckling *et al.*, 2008).

Los miembros del género fúngico *Trichoderma* se encuentran con frecuencia en la rizósfera, estos hongos tienen la capacidad de establecer interacciones benéficas con las plantas influyendo directamente sobre la morfogénesis de las mismas (Druzhinina *et al.*, 2011). La colonización de las raíces por parte de *Trichoderma* promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas al aumentar la disponibilidad de nutrientes, la resistencia a patógenos y la tolerancia a estrés ambiental (Fig. 2) (Harman, 2000; Reino *et al.*, 2008; Van Wees *et*

al., 2008). Sin embargo, el intercambio de moléculas entre las plantas y *Trichoderma* es muy complejo y no está bien caracterizado. Trabajos recientes han demostrado que en las primeras etapas de la interacción, los metabolitos de tipo auxina y los compuestos proteínicos liberados por *Trichoderma* son percibidos por las raíces, alterando múltiples mecanismos hormonales que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Contreras- Cornejo *et al.*, 2009).

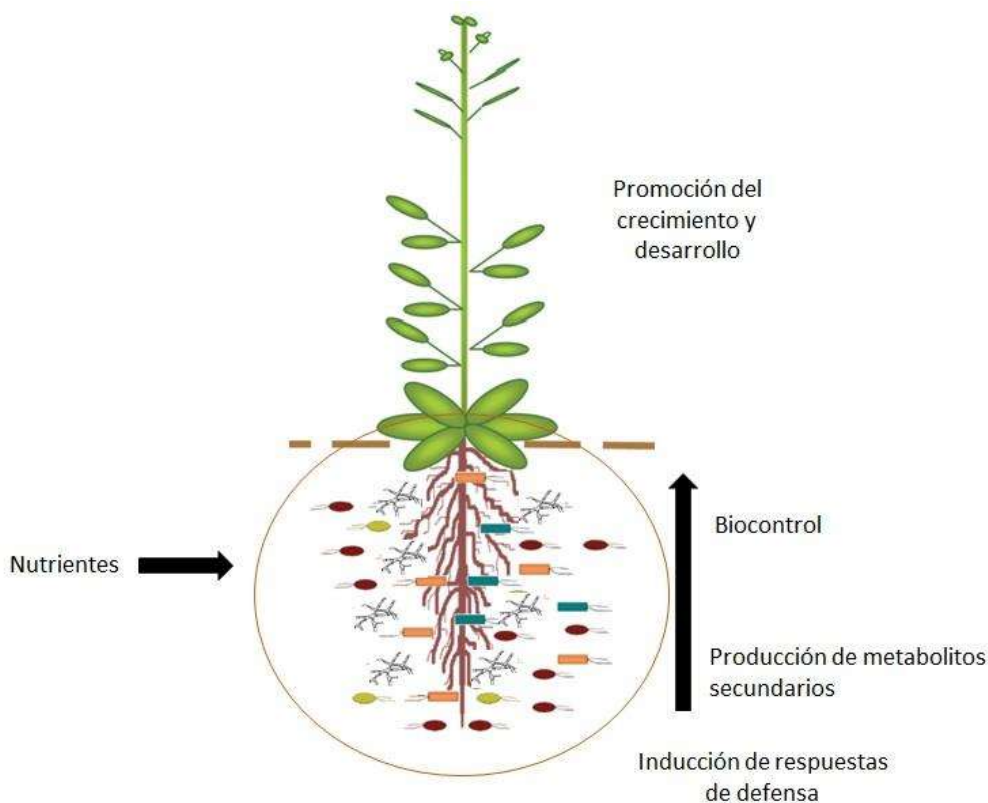


Figura 2. La rizósfera es un entorno dinámico de actividad metabólica entre las raíces de las plantas y microorganismos del suelo. Los compuestos producidos por los microorganismos pueden estimular el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, algunos inducen la inmunidad vegetal, otros pueden mimetizar la acción de los reguladores del crecimiento, favoreciendo la ramificación de la raíz y su capacidad de exploración del suelo. Modificado de Ortiz-Castro *et al.* (2009).

Además, existe una regulación de la arquitectura radicular, como respuesta temprana a la percepción de la acidificación fúngica de la rizósfera, ya que a un pH inferior a 5.5 en el suelo, se reprime el crecimiento de las raíces por inhibición de la división y elongación de las células de la raíz (Shavrukov y Hirai, 2016; Pelagio-Flores *et al.*, 2017).

2. 3. El género *Trichoderma*

Trichoderma (teleomorfo de *Hypocrea*, *Ascomycota*, *Dikarya*) es un género de hongos filamentosos que se compone de más de 200 especies (Atanasov *et al.*, 2013). Estos organismos se consideran cosmopolitas, ya que prevalecen en diferentes ecosistemas como saprófitos facultativos que degradan la materia orgánica en descomposición, y actúan como micoparásitos o simbioses cuando se asocian con las raíces de las plantas (Yedidia *et al.*, 2003; Harman *et al.*, 2004, Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

Las hifas crecen en el apoplasto, entre la corteza y la epidermis de la raíz, e inducen cambios en su desarrollo promoviendo la formación de raíces laterales a través de un mecanismo dependiente de la producción de auxinas (Verma *et al.*, 2007; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Diversos estudios han esclarecido el efecto de los metabolitos secundarios de *Trichoderma spp.* sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las especies de *Trichoderma* emiten COVs, moléculas de bajo peso molecular que pueden evaporarse fácilmente a temperatura y presión ambiental. Dicha característica les permite una difusión a través de las membranas celulares, actuando como moléculas de señalización entre los organismos. Los COVs pertenecen a diferentes clases químicas, incluyendo mono- y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas, ésteres, tioalcoholes, tioésteres y ciclohexenos, pudiendo ser intermediarios o productos finales de diversas vías metabólicas (Schenkel *et al.*, 2015). Los COVs de diferentes especies de *Trichoderma* se han considerado potencialmente útiles en el control biológico como estrategia para combatir patógenos vegetales y también como promotores del crecimiento vegetal (Zhi-Lin *et al.*, 2012; Garnica-Vergara *et al.*, 2015; Kanchiswamy *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015, 2016; Salazar-Badillo *et al.*, 2015).

2. 3. 1. Los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma*

La producción de la mayoría de los COVs varía en relación al tipo de especie fúngica, etapa de desarrollo en que se encuentra y el ambiente. La mayoría de estos compuestos están involucrados en procesos de comunicación con otros microorganismos e incluso con las plantas (Vinale *et al.*, 2009; Stopaccher *et al.*, 2010). Se han identificado alrededor de 479

COVs entre los que destacan la gliotoxina, viridina, gliovirina, glisoprenina, 6-pentil- α -pirona, konigininas, antraquinonas, tricodermamidas, peptaiboles, policétidos, terpenoides, polipéptidos, tricotecenos, tricodermaidas, azafilonas, harzialactonas y compuestos derivados de alfa-aminoácidos (Reino *et al.*, 2008). En el caso de las pironas simples, uno de los primeros compuestos volátiles aislados de *Trichoderma*, fue la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), caracterizada inicialmente como un antifúngico que inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y especies del género *Fusarium*. La producción de 6-PP ocurre en diversas especies de *Trichoderma*, incluyendo *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. citrinoviride* y *T. hamatum* (Collins y Halim, 1972; Claydon *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1988; Reithner *et al.*, 2005; Stoppacher *et al.*, 2010; Wickel *et al.*, 2013; Jelén *et al.*, 2014; Kottb *et al.*, 2015).

Estudios recientes han demostrado el efecto de los COVs de *Trichoderma* sobre la promoción del crecimiento vegetal. Las plantas de tomate y tallos etiolados de chícharo que fueron tratados con harzianolida y 6-PP, incrementaron el desarrollo del sistema radicular, el peso fresco y el área foliar (Vinale *et al.*, 2008). Por otra parte, Garnica y col. (2015), reportaron que la biosíntesis de 6-PP se estimula en presencia de la planta y altera la arquitectura de la raíz inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria e induciendo la formación de raíces laterales por medio de algunos receptores, transportadores y factores de transcripción de respuesta a auxinas.

Castro-Sánchez (2013) estudió el efecto de los COVs de *T. atroviride* y la mutante $\Delta tmk1$ sobre el desarrollo *A. thaliana*, encontrando que ambos hongos indujeron un mayor desarrollo de primordios de raíces laterales respecto a las plantas no inoculadas. Tal efecto fue atribuido a la emisión de 6-PP, cuya producción fue estimulada por la mutación en *TMK1* en comparación con la cepa silvestre. Lee y col. (2016), reportaron el efecto promotor de los COVs de nueve aislados de *Trichoderma* sobre la biomasa y el contenido de clorofila en plantas de *Arabidopsis*, debido en gran medida a la presencia ubicua de la 6-PP como componente mayoritario. Estos resultados fueron confirmados por Nieto-Jacobo y col. (2017) en los que la interacción entre *Trichoderma spp.* y *A. thaliana* incrementó la biomasa de brotes y raíces, así como el contenido de clorofila (Fig. 3A-C).

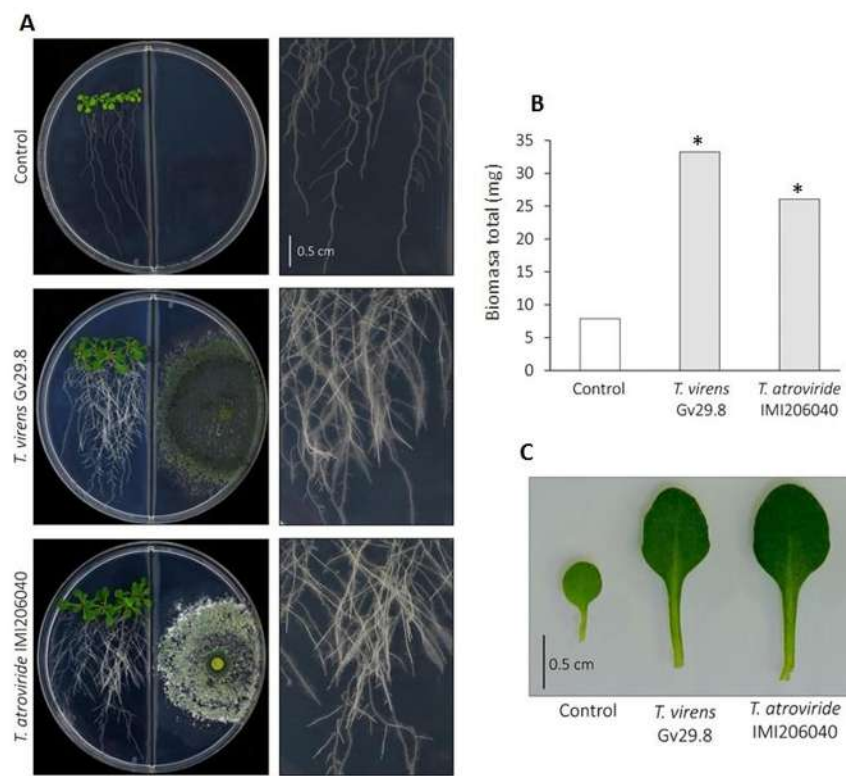


Figura 3. Efecto de los volátiles de *Trichoderma* sobre la biomasa de plantas de *Arabidopsis* utilizando un ensayo de placa dividida. A) Fotografías representativas de plántulas co-inoculadas con *Trichoderma* spp. B) Biomasa total de la raíz. C) Vista magnificada de hojas expuestas a COVs de *Trichoderma* spp. Modificado de Nieto-Jacobo *et al.* (2017).

2. 3. 2. *Trichoderma* y el metabolismo del carbono en las plantas

Los exudados radiculares generan un ambiente rico en carbohidratos, los cuales influyen en la comunicación molecular entre microorganismos del suelo (Bais *et al.*, 2006). Uno de los carbohidratos secretados es la sacarosa, la cual se ha detectado en grandes concentraciones cerca de los ápices de las raíces (Krafczyk *et al.*, 1984; Jaeger *et al.*, 1999; Mahmood *et al.*, 2002; Baudoin *et al.*, 2003). Durante la asociación con ciertos hongos, la hidrólisis de la sacarosa es estimulada en las células de la planta a través de la expresión de invertasas extracelulares para generar los monosacáridos como glucosa y fructosa que pueden ser absorbidos por el microorganismo en el sitio de infección o colonización (Bielmelt y Sonnewald, 2006; Doidy *et al.*, 2012; Vargas y Kenerley, 2012). Vargas y col.

(2009), encontraron que *T. virens* no solo genera un efecto directo sobre la tasa fotosintética en hojas de maíz, sino que también produce una invertasa extracelular para metabolizar la sacarosa presente en los exudados, así como promover la expresión del elicitor proteico *sm1* (*small protein 1*) que incrementa la resistencia sistémica en la planta. Con estos resultados, se estableció que la actividad sucrolítica por *T. virens* influye en el metabolismo del carbono (Fig. 4A-B). Posteriormente, el mismo grupo identificó en el genoma de *T. virens*, un transportador de sacarosa al que denominaron TvSUT, el cual se induce en las primeras etapas de la colonización de la raíz y se relaciona con la captación de carbono por las hifas (Vargas *et al.*, 2011).

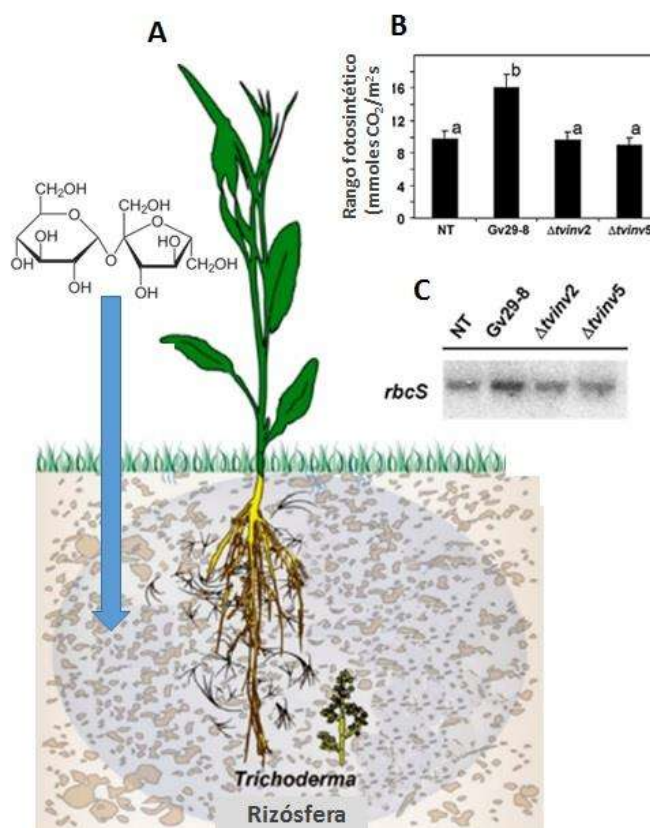


Figura 4. La sacarosa en la interacción planta-hongo. A) Especies del género *Trichoderma* colonizan las raíces y generan un nicho que permite obtener los azúcares que estas liberan en la rizósfera. B) Las mutantes de *T. virens*, *TvInv2* y *TvInv5*, afectadas en la expresión de una invertasa no activan la tasa fotosintética ni la expresión de la subunidad pequeña de la RuBisCo (C). Modificado de López-Bucio *et al.* (2015); Vargas *et al.* (2009).

Es factible especular que una alta colonización de la raíz por *Trichoderma*, promueve un incremento en la demanda de fotoasimilados en la raíz, lo que a su vez alteraría la partición de carbono y la estimulación de la fotosíntesis. Respecto a este tema poco se conoce sobre los mecanismos de transporte y distribución de fuentes de carbono en las plantas durante las interacciones bióticas.

2.4. Metabolismo de carbono en las plantas

2. 4. 1. Fotosíntesis

La fotosíntesis es un proceso físico-químico por el cual las plantas utilizan la energía de la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos. Dichos procesos se basan en reacciones de óxido-reducción, que se pueden clasificar en dos etapas, la fase luminosa y oscura. En la primera, se lleva a cabo la captación y transformación de la energía luminosa en energía química (ATP) y en poder reductor (NADH). Estas reacciones se producen dentro de la membrana interna de los tilacoides formados por pliegues de la membrana interna en los cloroplastos. Dentro de ésta membrana se encuentran pigmentos como la clorofila y los carotenoides capaces de absorber la energía luminosa y que actúan como complejos antena para la captación de luz y transferencia de energía al centro de reacción donde están asociadas. La principal clorofila presente en plantas es la “a”, sin embargo existen pigmentos accesorios como la clorofila b, las xantófilas y los carotenoides (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

Los pigmentos se organizan en dos tipos de unidades funcionales llamadas fotosistemas I y II (PSI y PSII), los cuales constan de 200 moléculas de clorofila, 50 carotenoides y diversas proteínas transmembranales. Los pigmentos presentes en cada fotosistema pueden absorber luz pero solo una pareja de moléculas de clorofila en cada fotosistema realiza la conversión de energía luminosa en energía química (foto-oxidación). En estos centros de reacción (P680 y P700), la energía entrante causa la pérdida de electrones, los cuales son cedidos a partir del átomo de Mg. Este proceso se conoce como foto-excitación y se produce primero en el complejo PSII y posteriormente en el PSI (Barcelo-Coll *et al.*, 1983). Cada molécula de clorofila excitada del PSII (P680) proporciona continuamente

electrones a una molécula aceptora, iniciando la cadena de transferencia de electrones hacia el complejo PSI (P700). Para reponer los electrones que pierde P680 se produce la hidrólisis de dos moléculas de agua (fotólisis). Los iones H^+ resultantes quedan en el interior del tilacoide y sirven para generar el gradiente electroquímico imprescindible para la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP), mientras que el O_2 es expulsado como producto de desecho (Fig. 5) (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

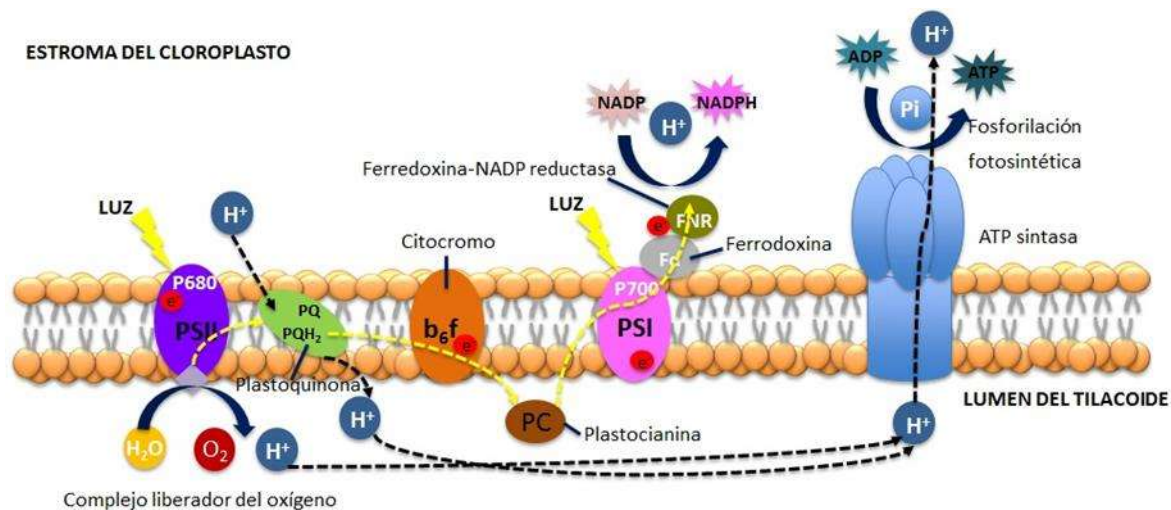


Figura 5. Fase luminosa de la fotosíntesis. La fase luminosa inicia con la excitación de su pigmento diana (P680), tras esta excitación existe un paso continuo de electrones hasta el fotosistema I (PSI) para la generación de NADPH y ATP. Modificado de Azcón-Bieto y Talón (1993).

Por otra parte, la energía luminosa que llega a la clorofila P700 del PSI hace que la molécula alcance un estado de excitación en el que libera electrones, que sumados a los provenientes del PSII cedidos por la plastocianina, pasan a través de una serie de compuestos intermedios poco conocidos (A_0 , A_1 y ferro-sulfo-proteínas sin grupo hemo: F_X , F_B/F_A), hacia la ferredoxina (Fd), quien a su vez los transfiere a la ferredoxina-NADP⁺ oxidoreductasa (FNR), que cataliza la reducción del NADP⁺ en NADPH. La diferencia de potencial electroquímico en ambos lados de la membrana, producto de la concentración de H^+ originada por la fotólisis del agua y la actividad del citocromo b_6F promueven la salida de protones a través de la ATP sintetasa, produciendo ATP a través de la fosforilación del ADP (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

Posteriormente, en las reacciones de la fase oscura o Ciclo de Calvin, que se lleva a cabo en el estroma de los tilacoides, se produce la transformación del CO_2 a carbohidratos a través de la energía química y el poder reductor obtenidos en la fase luminosa. El ciclo de Calvin se divide en tres fases: i) la fase de carboxilación, donde la Ribulosa-1,5-diP (Ru1, 5diP o RuBP) reacciona con el CO_2 y H_2O para formar 3-fosfoglicerato (3-PG); ii) la fase de reducción, donde el 3-PG se convierte en gliceraldehído-3-fosfato (GAP), el cual puede utilizarse en la síntesis de azúcares o entrar de nueva cuenta al ciclo, y iii) la fase de regeneración, que como su nombre lo indica, la Ru1, 5-diP se regenera a partir de GAP (Fig. 6).

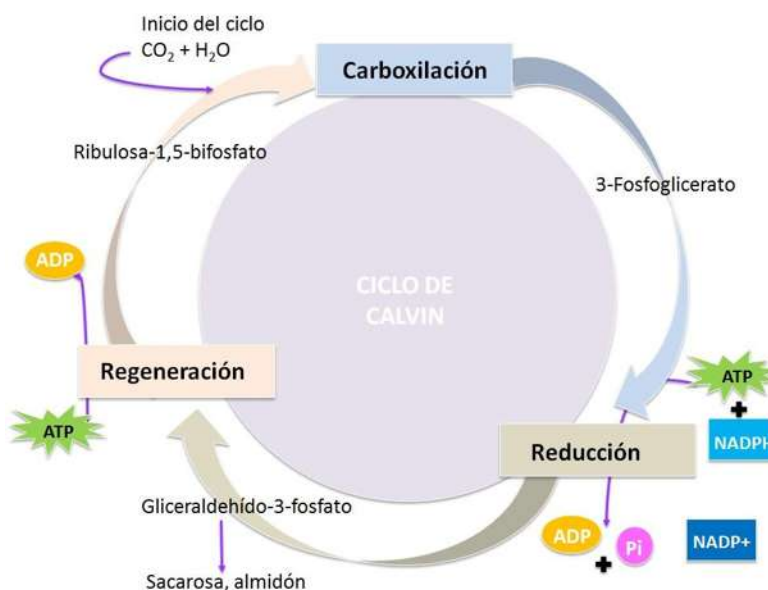


Figura 6. Esquema del Ciclo de Calvin. Las reacciones del ciclo de Calvin se pueden organizar en tres etapas principales: fijación o carboxilación, reducción y regeneración. En este ciclo se utiliza el ATP y el NADPH generados durante la fase luminosa para la fijación del CO_2 y la síntesis de triosas. Modificado de Barcelo-Coll *et al.* (1983).

La fase de regeneración requiere de la fosforilación de la Ru5P para formar Ru1, 5diP. Esta reacción se efectúa simultáneamente (por la acción de la enzima fosforibulosa cinasa), sobre seis moléculas de Ru5P con el consumo de seis ATPs. El proceso antes mencionado permite la fijación de seis moléculas de CO_2 , para posteriormente generar una molécula de glucosa. Subsecuentemente, se lleva a cabo una reacción de carboxilación de la ribulosa-1,5-

bisfosfato (fijación del CO_2) catalizada por la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa oxidasa (RuBisCo) para formar un intermediario inestable de seis carbonos (2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bisfosfato), el cual, por medio de la misma enzima, se hidroliza en dos moléculas de 3-PG. Enseguida, las doce moléculas obtenidas de 3-PG, son fosforiladas por la enzima fosfoglicerato cinasa para formar doce moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato (BPG). Después el poder reductor de doce moléculas de NADPH^+H^+ obtenido en la fase luminosa, se emplea para la formación de doce moléculas de GAP por medio de la bifosfoglicerato deshidrogenasa. El resultado de ésta reacción es la utilización de dos moléculas para la formación de glucosa y las diez restantes para regenerar las seis de Ru5P que se usaron al principio para fijar el CO_2 y volver a iniciar el ciclo (Azcón-Bieto y Talón, 1993).

El GAP que se forma después de la reducción y que no se emplea en la regeneración de la Ru5P, se exporta al citosol, mediante un sistema translocador de fosfato que realiza un antiporte con Pi . Una vez en el citosol el GAP a través de la inter-conversión catalizada por la triosa fosfato isomerasa (TPI) da lugar a la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato, la cual es desfosforilada por la fructosa bifosfatasa para la obtención de fructosa-6-P, la cual puede reaccionar con el trifosfato de uridina (UTP) para formar la UDP-glucosa (Rolland *et al.*, 2006). Todo este proceso culmina con la unión de una molécula de fructosa-6-P con la UDP-glucosa por acción de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) para dar origen a la sacarosa-P, cuya des-fosforilación la realiza la sacarosa fosfato fosfatasa (SPP) para la obtención final de la sacarosa. Sin embargo, el GAP que no se exporta al citoplasma puede convertirse en ADP-glucosa para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto durante el día, para su posterior degradación en la noche a glucosa o maltosa. Esta glucosa liberada en el citoplasma es fosforilada por la hexocinasa para generar glucosa-6-P, la cual puede ser convertida a fructosa-6-P por la glucosa-6-P isomerasa y entrar así a la vía de biosíntesis de sacarosa y posteriormente ser exportada a los órganos de demanda.

Existen dos formas de carga hacia el floema, vía apoplasto a través de proteínas transmembranales que llevan a cabo el transporte o vía simplasto que dirige el transporte por medio de los plasmodesmos y el gradiente de concentración (Fig. 7) (Ruan, 2014).

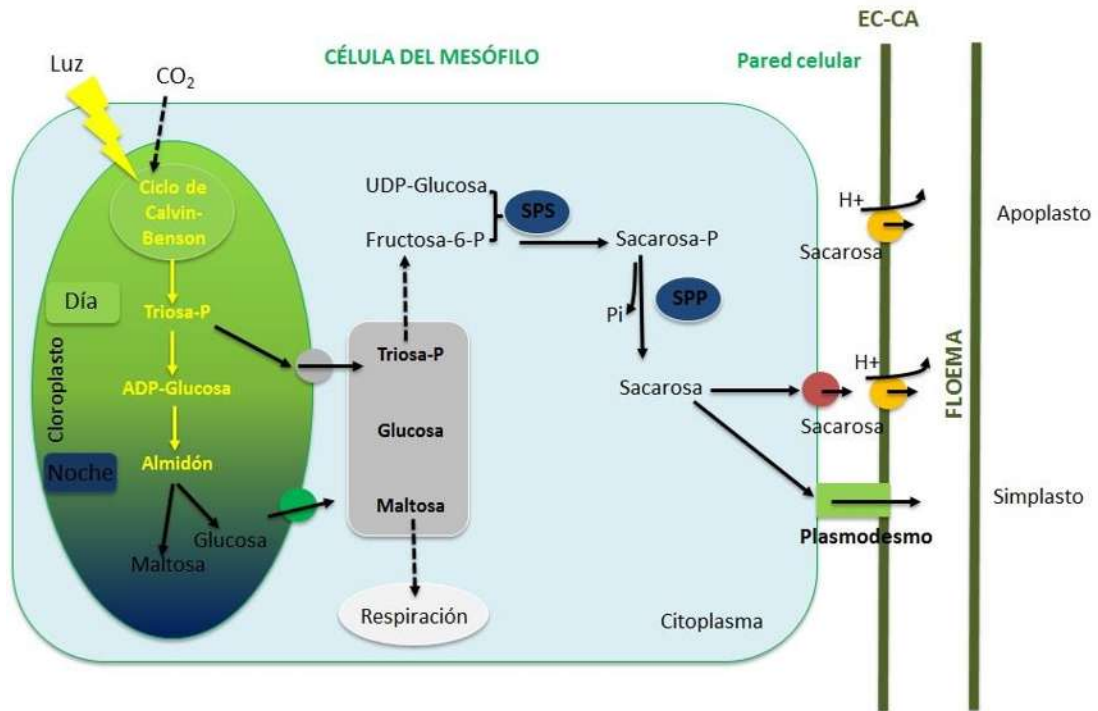


Figura 7. Biosíntesis de sacarosa. El GAP que se obtiene a partir de la fotosíntesis es exportado hacia el citoplasma para la formación de fructosa-6-fosfato y después por la actividad de la sacarosa fosfato sintasa (SPS) se lleva a cabo la síntesis de sacarosa. Este metabolito puede distribuirse a través del floema para su transporte a diferentes órganos consumidores, o incluso para su exudación por la raíz. Modificado de Ruan (2014).

2. 4. 2. Señalización y metabolismo en tejidos consumidores

Una vez cargada la sacarosa dentro del floema, ésta puede ser descargada a través de las vías simplasto a apoplasto. La sacarosa en las células de los órganos consumidores, puede ser hidrolizada por una invertasa citoplásmica (C-INV) o por la sacarosa sintasa (SAS). Sin embargo, también existe otro mecanismo por el cual la sacarosa transportada al apoplasto por una proteína uniporte, puede ser hidrolizada por una invertasa de la pared celular (PC-INV), cuyos productos finales son transportados dentro de la célula por acción de transportadores de tipo simporte. Estos dos mecanismos generan niveles de glucosa y fructosa en el citosol que pueden emplearse para la glicólisis y la síntesis de polímeros como almidón y celulosa. Los niveles de abundancia y flujos de los azúcares, pueden ser percibidos por medio de

diversos sensores como la hexocinasa (HXK), la cual desencadena una vía de señalización para regular la expresión génica de acuerdo al estatus energético de la célula (Fig. 8). Sin embargo, la sacarosa también puede ser importada a la vacuola, donde una invertasa vacuolar (V-INV) hidroliza la molécula para generar glucosa y fructosa como un mecanismo de almacenamiento de reserva o para su consumo durante la expansión celular (Ruan, 2014).

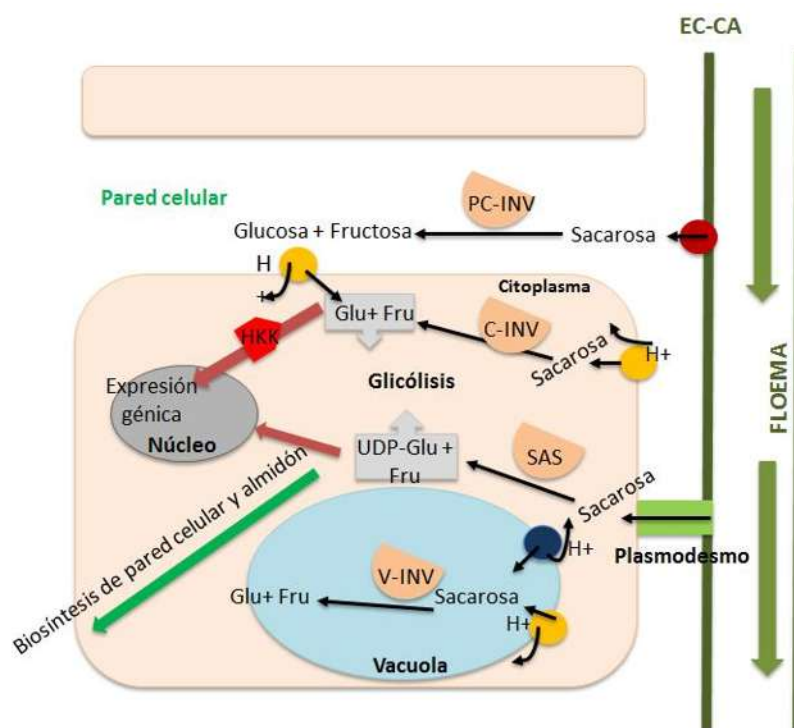


Figura 8. La descarga, transporte y metabolismo de sacarosa en las células. La sacarosa es descargada del floema vía apoplasto o simplasto. Dentro del citosol puede ser hidrolizada por la invertasa de pared celular (PC-INV) o por una invertasa citoplasmática (C-INV) en el apoplasto y dentro de la vacuola por una invertasa vacuolar (V-INV). Los productos generados se destinan como fuente de energía, bloques de construcción o moléculas de señalización. Modificado de Ruan (2014).

El transporte de la sacarosa y la hidrólisis de la molécula, desempeñan papeles reguladores claves en la señalización del estatus energético de las células. Existe una amplia regulación de retroalimentación entre las invertasas y las sacarosas sintasas que impactan el transporte de azúcares y productos intermedios dentro y fuera de los plastidios y vacuolas. Curiosamente, la glucosa-6-P y su conversión a glucosa por medio de la glucosa-6-fosfatasa

también se ve regulada por la presencia de estas enzimas. Incluso, la tasa fotosintética, la degradación de almidón y la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular también generan señales que se relacionan con condiciones de estrés como oscuridad, la senescencia y el ataque de patógenos. Por lo tanto, las plantas a través de la señalización de azúcares pueden ajustar o modificar sus programas de desarrollo (Rolland *et al.*, 2006).

2. 4. 3. El papel de los azúcares en el desarrollo vegetal

Los azúcares actúan como reguladores en procesos de desarrollo y crecimiento, independientemente de su importancia como fuente de carbono o de su interacción con vías de señalización hormonal. Los carbohidratos modulan procesos vitales para la planta desde la formación de la semilla hasta la senescencia. Estudios previos han demostrado su participación sobre el desarrollo del embrión o en el control de la formación de los cotiledones y hojas a través de la concentración de hexosas y sacarosa o gran cantidad de mutantes de respuesta a azúcar en *Arabidopsis*, como *gin1*, *gin2* y *glz2*, exhiben un crecimiento y desarrollo anormal derivado precisamente por el bloqueo de la señalización de azúcares (Rolland *et al.*, 2006). Además, durante el desarrollo vegetativo, las fuentes de carbono y las señales de estos azúcares controlan el desarrollo reproductivo y la inducción de la floración, ya que dichos procesos están asociados a la movilización del almidón y el transporte de azúcares desde las hojas hacia el meristemo apical de los brotes, lo que sugiere que los azúcares presentes en el floema son un factor importante para la etapa reproductiva (Corbesier *et al.*, 2002). La arquitectura de la raíz también puede verse afectada por la disponibilidad de azúcares en la planta. La limitación de fuente de carbono o el crecimiento en oscuridad afectan el crecimiento y ramificación de la raíz, por lo contrario, el suministro de sacarosa o glucosa al medio de crecimiento promueve el desarrollo de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Koch, 2004; Gupta y Kaur, 2005). Por otra parte, las deficiencias de nutrientes como fósforo y nitrógeno alteran la arquitectura del sistema radicular por la acumulación de azúcares y almidón en hojas que genera una alteración en la partición de carbono hacia la raíz (Hermans *et al.*, 2006). Así que podemos concluir que la fotosíntesis y la acumulación de azúcares en los tejidos aéreos son dinámicos y determinantes en la organogénesis radical. Existen estudios que sugieren que la formación de raíces laterales

puede promoverse indirectamente, estimulando el crecimiento del cotiledón y de las hojas. Freixes y col. (2002), realizaron un ensayo donde cultivaron plantas de *Arabidopsis* a diferentes tasas de flujos de fotones y de concentraciones de sacarosa en el medio. Ellos observaron que la concentración de sacarosa tiene una relación positiva en la ramificación del sistema radical y que su velocidad de alargamiento es dependiente de la concentración de hexosas (Fig. 9A). De igual forma, plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad y a las cuáles se les suministró sacarosa indujeron la formación de raíces adventicias (Takahashi *et al.*, 2003). MacGregor y col. (2008), reportaron un modelo detallado para la regulación de la formación de raíces laterales en plántulas de *A. thaliana* en respuesta a azúcares. Los autores demostraron que el suministro de sacarosa a los tejidos aéreos promueve la formación y desarrollo de raíces laterales (Fig. 9B-C).

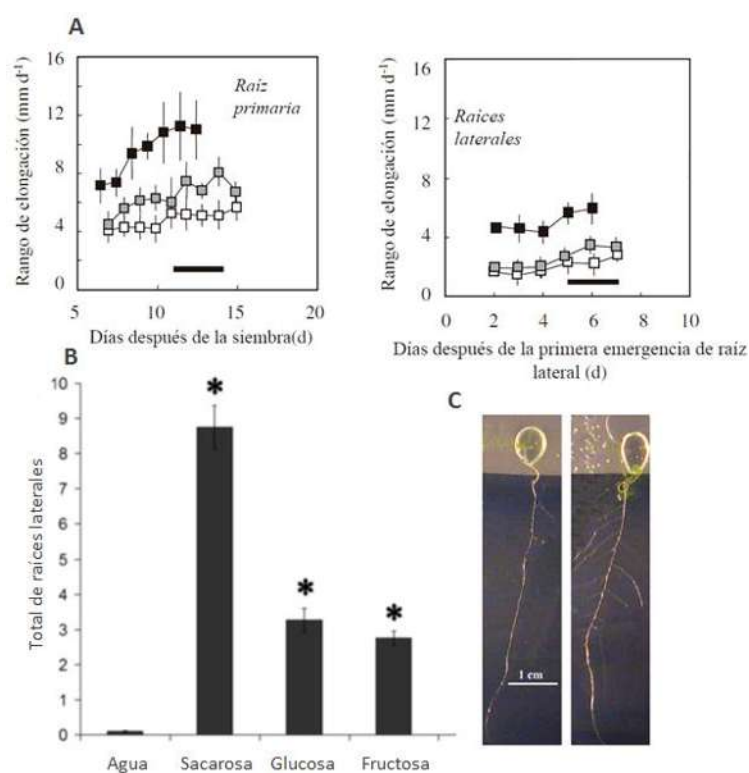


Figura 9. Los azúcares regulan la arquitectura radicular de *A. thaliana*. A) Longitud de la raíz primaria y raíces laterales. Los cuadros negros representan 2% de sacarosa en el medio, los cuadros grises 2% de glucosa y los cuadros blancos el control. B) El total de raíces laterales cuando se suministra foliarmente diversas fuentes de carbono a una concentración de 0.1%. C) Imágenes representativas del suministro localizado de sacarosa. Modificado de Freixes *et al.* (2002) y MacGregor *et al.* (2008).

2. 5. El transporte de azúcares

El transporte de azúcares desde los tejidos fuente a los consumidores se produce a través de los haces vasculares del floema. La sacarosa sintetizada en el citoplasma de las células del mesófilo se mueve a través de los tubos de los elementos cribosos para ser descargada hacia los tejidos de demanda como brotes apicales, raíces y tejidos de almacenamiento, proporcionándoles así la fuente de carbono requerida para su desarrollo y crecimiento (Chang *et al.*, 2004; Sauer, 2007; Ruan, 2014). Se denomina carga del floema al proceso por el cual los asimilados sintetizados en las hojas son concentrados en el floema. Por su parte, su liberación controlada en los tejidos consumidores se conoce como descarga del floema y tanto la carga, como la descarga del floema se puede llevar a cabo por movimiento transmembranal (carga apoplástica) o por flujo a través de plasmodesmos (carga simplástica) (Rolland *et al.*, 2006).

En la ruta simplástica, los plasmodesmos y el gradiente de concentración determinan la magnitud y la dirección del flujo. Mientras que en la vía apoplástica participan proteínas transmembranales que funcionan como transportadores de azúcares (Oparka y Santa-Cruz, 2000; Chacón y Martínez, 2007; Lemoine *et al.*, 2013). Además, como la sacarosa puede ser hidrolizada por las invertasas de pared celular, también existen transportadores de hexosas ubicados en la membrana plasmática (Fig. 10).

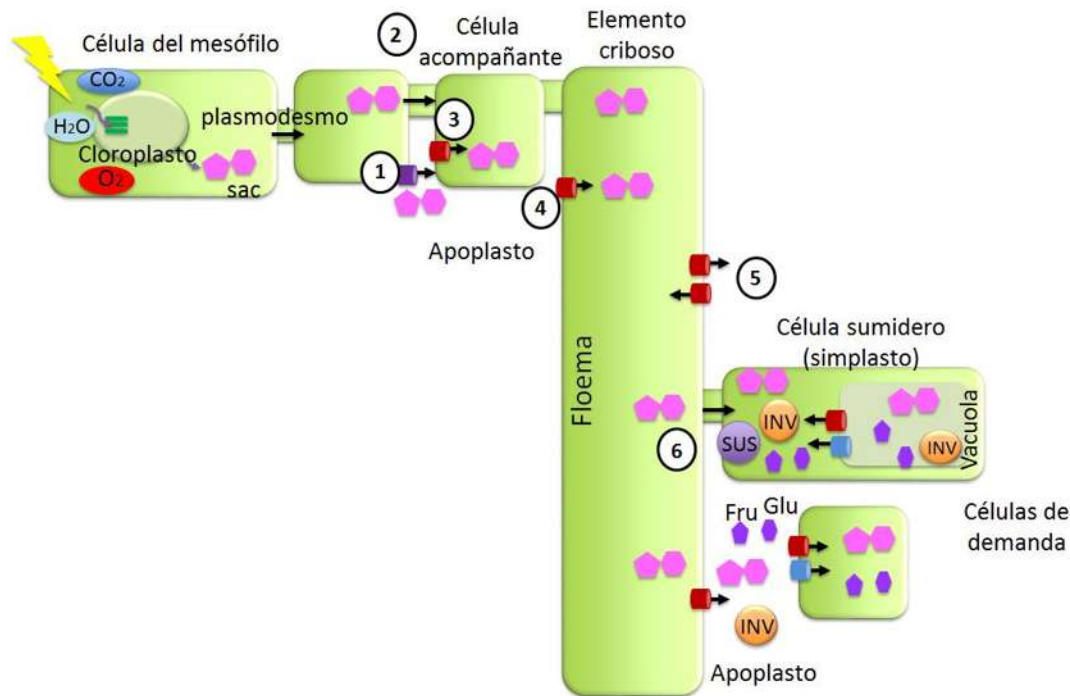


Figura 10. Transporte de azúcares desde los órganos fuente a consumidores. (1) Se representa la exportación de sacarosa de las células del mesófilo hacia una célula del parénquima por medio de una proteína SWEET. (2 y 3) La sacarosa pasa a la célula acompañante vía plasmodesmo o bien, vía simplástica a través de un transportador SUT. (4) La sacarosa se carga al elemento criboso a través de SUT. (5 y 6) La liberación del floema puede ser vía simplástica o vía apoplástica. La glucosa y fructosa pueden ser internalizadas por transportadores de hexosas de tipo MSTs. Modificado de Doidy *et al.* (2012).

Dichos transportadores permiten la entrada de glucosa y fructosa, las cuales influyen en los procesos metabólicos y de almacenamiento, como la biosíntesis de almidón, proteínas, y celulosa, entre otros. Alternativamente, los azúcares se pueden movilizar a pozas no propias de la planta, por ejemplo, la colonización de células vegetales por organismos heterotróficos mutualistas o patógenos representa un aumento en la fuerza de demanda de los azúcares por dichos organismos. Sin embargo, los mecanismos de transporte y los transportadores implicados en la partición de carbono entre ambos organismos son escasamente conocidos (Wright *et al.*, 1998; Boldt *et al.*, 2011).

Existen numerosas familias de transportadores de azúcares en las plantas, las cuales se dividen de acuerdo a sus capacidades de flujo de salida y localización sub-celular. A continuación se describen las características principales de los transportadores de azúcares:

2. 5. 1. Transportadores de sacarosa tipo SUT y de monosacáridos MST

Las secuencias del genoma de *A. thaliana* y *Oryza sativa*, han permitido determinar que las proteínas que transportan hexosas y sacarosa pertenecen a grandes familias multigénicas. Los transportadores de sacarosa (SUT) y de monosacáridos (MST) son miembros de una superfamilia y comparten una estructura común de doce dominios transmembranales conectados por regiones hidrofílicas, los cuales funcionan en el simporte de H^+ /azúcar (Lemoine *et al.*, 2013). Las proteínas SUT en *Arabidopsis* están codificadas por nueve genes (Doidy *et al.*, 2012; Reinders *et al.*, 2012).

La carga de azúcares al floema se produce desde el apoplasto a través de los transportadores localizados en la membrana plasmática de la célula acompañante. En *Arabidopsis*, se han caracterizado funcionalmente siete genes SUT, *SUC1*, *SUC2*, *SUC3* (sinónimo *SUT2*), *SUC4* (sinónimo *SUT4*), *SUC5*, *SUC8* y *SUC9*. *SUC2* codifica para un transportador de tipo simporte de sacarosa- H^+ que se expresa específicamente en la células acompañantes y se le atribuye principalmente la función de carga de sacarosa en el floema. La mutante por inserción de T-DNA en la secuencia de *SUC2* mostró un transporte alterado de azúcar, acumulación de antocianinas y un retraso en el crecimiento de la raíz, el cual se normalizó con el suministro de sacarosa (Wippel y Sauer 2012). La expresión de genes reporteros que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y la beta glucoronidasa (GUS) bajo el control del promotor *AtSUC2* muestra que su expresión se encuentra a lo largo de toda la vasculatura de la planta, en el follaje y la raíz (Fig. 11A-B).

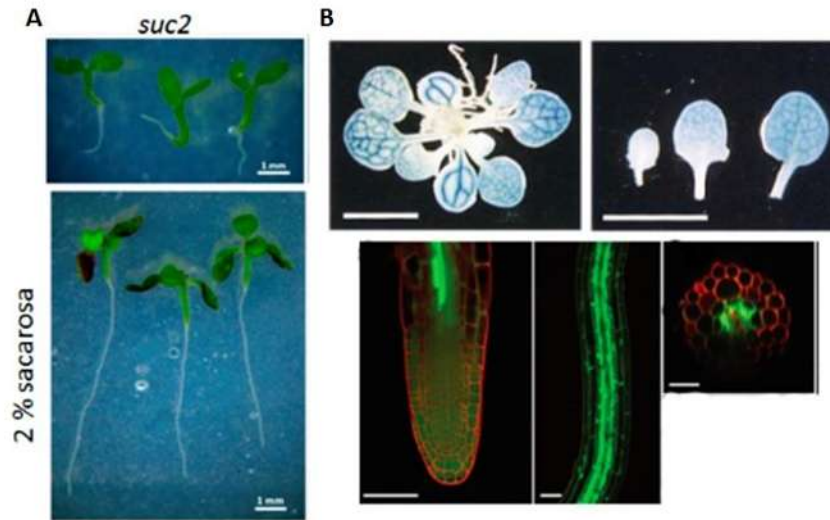


Figura 11. Caracterización del transportador de sacarosa AtSUC2. (A) Se muestra el fenotipo de la mutante *suc2* de *A. thaliana* y el restablecimiento del fenotipo con la aplicación de sacarosa al medio. (B) Expresión de las fusiones transcripcionales *pAtSUC2:GUS* y *pAtSUC2:GFP* en el follaje y la raíz. Nótese una mayor expresión en la vasculatura. Modificado de Kircher *et al.* (2012); Benitez-Alfonso *et al.* (2013); Stadler *et al.* (2005).

La mayoría de los transportadores de monosacáridos se expresan preferencialmente en las membranas plasmáticas de las células de los tejidos consumidores y se ha propuesto que son los responsables del importe de glucosa y fructosa resultantes de la hidrólisis de sacarosa. En *A. thaliana* se han identificado 53 transportadores de hexosas (MST) (Doidy *et al.*, 2012; Lemoine *et al.*, 2013), los cuáles, según la especificidad por el sustrato, se clasifican en siete subfamilias o clados (ej. el transportador de poliol/monosacárido PMT y el de inositol INT. Sin embargo, también se pueden clasificar de acuerdo a su localización subcelular, como el transportador de glucosa vacuolar VGT, el de membrana del tonoplasto TMT, el transportador de glucosa plástidico pGlcT y los STPs (proteínas de transporte de azúcares) que en general se localizan en la membrana plasmática de las células y actúan en el simporte de H^+ /hexosa. Todos los transportadores antes mencionados parecen estar implicados en el almacenamiento vacuolar de azúcares y su removilización para el mantenimiento de metabolismo celular, osmoregulación y la adaptación a condiciones ambientales cambiantes (Neuhaus, 2007).

2. 5. 2. Transportadores SWEET

Los transportadores SWEET actúan bi-direccionalmente en el transporte de azúcares a través de la membrana plasmática o tonoplasto de forma independiente al pH y contribuyen en una amplia gama de procesos fisiológicos que implican la carga y descarga de sacarosa del floema (Chen *et al.*, 2010, 2012; Chardon *et al.*, 2013; Klemens *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014). A diferencia de los transportadores SUTs, los SWEETs presentan siete dominios transmembranales y son codificados por una familia multigénica de diecisiete miembros en *Arabidopsis*. Durante la carga del floema, los transportadores SWEET permiten la salida de sacarosa de las células del mesófilo para ser translocada hacia los elementos cribosos y células acompañantes (EC-CA). Varios de estos genes han sido caracterizados con base en su función y localización. En el caso de *AtSWEET11* y *AtSWEET12*, por medio de la fusión de sus promotores al gen reportero GUS se reportó su expresión en las nervaduras de las hojas. *AtSWEET11* se localizó en la membrana plasmática de las células del floema, (Chen *et al.*, 2012; Eom *et al.*, 2015). Por otra parte, *AtSWEET13* y *AtSWEET14* son necesarios para el desarrollo de las anteras y las semillas, además de relacionarse con respuestas fisiológicas reguladas por ácido giberélico (Kanno *et al.*, 2016). La expresión de ambos también ocurre en la vasculatura de las plantas. Se ha propuesto que los transportadores SWEET poseen un papel importante en la removilización de la galactosa, fructosa y glucosa en diversos tejidos de la planta con funciones que van desde el desarrollo del embrión hasta la senescencia. *AtSWEET11*, *AtSWEET12* y *AtSWEET15* participan en el eflujo de sacarosa de los tejidos maternos de la semilla y son importantes durante el llenado de las semillas (Chen *et al.*, 2015a, b). Otros estudios han relacionado a *AtSWEET9* en la secreción de sacarosa para la producción de néctar (Lin *et al.*, 2014), mientras que *AtSWEET8* es un transportador de glucosa que se expresa específicamente en el tapete de los granos de polen para su maduración (Guan *et al.*, 2008). Por otra parte, *AtSWEET17* y *AtSWEET16* actúan como transportadores de fructosa en las membranas del tonoplasto, determinando su contenido en las vacuolas de células de hoja y raíz (Chardon *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014; Hedrich *et al.*, 2015), *AtSWEET4* juega un papel importante en el transporte de azúcares en tejidos axiales durante el crecimiento y desarrollo de la planta, y su expresión se reportó en la vasculatura de las raíces y nervaduras de hojas y flores (Liu *et al.*, 2016). Finalmente, *AtSWEET2* actúa

en el mecanismo de defensa contra patógenos, en la restricción de azúcares de las células epidérmicas de la raíz durante la infección por *Pythium irregulare* (Chen *et al.*, 2015b). Por lo tanto, la expresión de cada uno de estos transportadores es tejido específico y poseen funciones diversas de acuerdo a su localización y etapa de desarrollo de la planta (Fig. 12A-C).

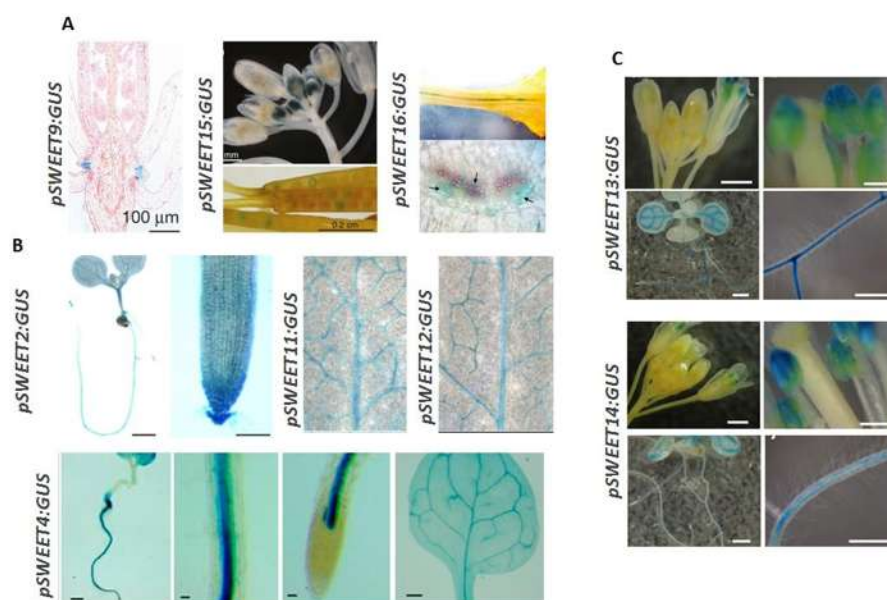


Figura 12. Expresión de los transportadores SWEET en *A. thaliana*. A) Actividad del gen reportero GUS inducida por los promotores de los genes *AtSWEET9*, *AtSWEET15* y *AtSWEET16*. B) Expresión de las fusiones *pAtSWEET2:GUS*, *pAtSWEET11:GUS*, *pAtSWEET12:GUS* y *pAtSWEET4:GUS*. C) Patrones de expresión para *AtSWEET13* y *AtSWEET14*. Modificado de Lin *et al.* (2014); Klemens *et al.* (2013); Chen *et al.* (2012); 2015a,b); Kanno *et al.* (2016); Liu *et al.* 2016).

Existen diversos reportes sobre el secuestro de los transportadores SWEET por agentes patógenos, como mecanismos para el suministro de azúcares para su crecimiento y resulta plausible que algunas de estas proteínas podrían participar en la secreción de azúcares en la rizósfera e influenciar así las interacciones planta-microorganismo (Chen *et al.*, 2012; Chong *et al.*, 2014). Manck-Götzenberger y Requena (2016) demostraron en *Solanum tuberosum* durante la colonización de *Rhizophagus irregularis*, la modificación en la transcripción de 22 de los 35 miembros de genes de la familia de transportadores SWEET. Además observaron la re-localización de su expresión en las células colonizadas, lo cual

sugiere una regulación de las proteínas SWEETs durante la interfase biotrófica con el hongo. Los elicitors de tipo TAL (*Transcriptional Activator-Like proteins*) producidas por *Xanthomonas oryzae* afectan la expresión de cinco de los veintiuno SWEETs presentes en *Oryza sativa*. En *Arabidopsis*, Chen y col. (2010), reportaron una expresión diferencial de los transcritos de los SWEET durante la interacción con patógenos bacterianos y fúngicos. *Pseudomonas syringae* pv. tomate cepa DC3000 indujo la expresión de AtSWEET4, AtSWEET5, AtSWEET7, AtSWEET8, AtSWEET10, AtSWEET12 y AtSWEET15, mientras que los hongos patógenos *Golovinomyces cichoracearum* y *B. cinerea* alteraron la expresión de AtSWEET12 y de AtSWEET4, o de AtSWEET15 y AtSWEET17, respectivamente (Fig. 13A). De igual forma, *Pythium irregulare* incrementó la transcripción del gen AtSWEET2 de manera dependiente al tiempo de infección (Fig. 13B) (Chen *et al.*, 2015b). Esta regulación diferencial sugiere que los patógenos poseen un mecanismo propio, adaptado específicamente para re-localizar los carbohidratos de su hospedero y aprovecharlos para su proliferación (Slewinski, 2011; Talbot, 2012).

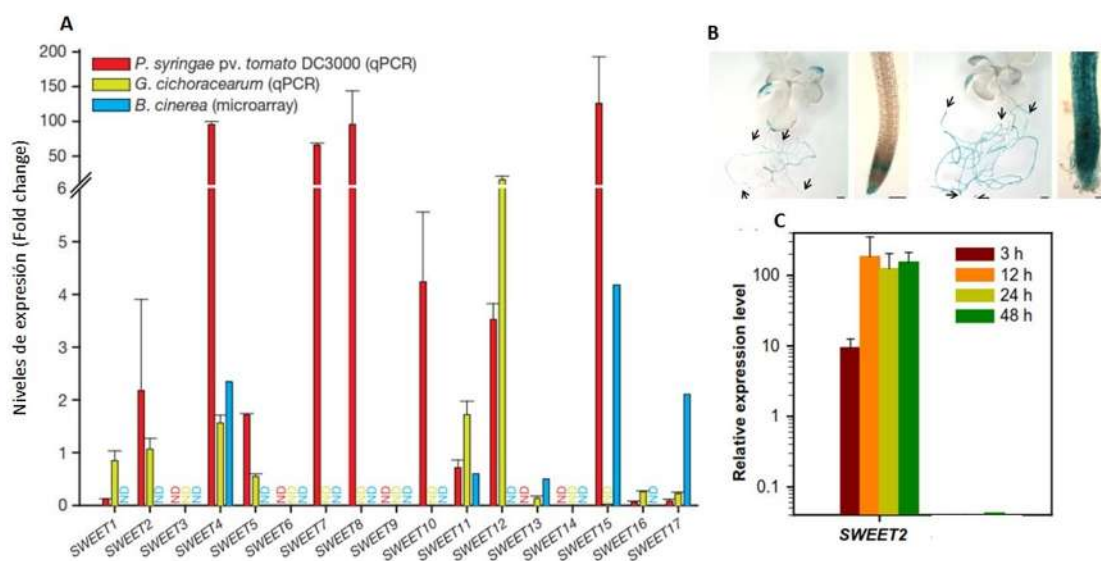


Figura 13. Las bacterias y hongos patógenos incrementan la expresión de los genes SWEET. A) Niveles de mRNAs de AtSWEETs por *P. syringae* pv. tomate DC3000, *G. cichoracearum* y *B. cinerea*. B y C) Expresión de la fusión SWEET2:GUS y los niveles relativos de expresión después de la infección con *Pythium*. Modificado de Chen *et al.* (2010; 2015a, b).

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos del género *Trichoderma* producen compuestos orgánicos volátiles (COVs) que promueven el crecimiento y desarrollo vegetal. *T. atroviride* induce una mayor ramificación y acumulación de biomasa en la raíz, aspectos que se han relacionado con la acidificación del medio y la producción de auxinas, sin embargo, el crecimiento de la raíz y la reconfiguración de su arquitectura están determinados en gran medida por la disponibilidad de los azúcares, que son transportados desde los tejidos fotosintéticos. Hasta el momento, se desconoce si durante la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*, se incrementa la fotosíntesis y los niveles de azúcares en los tejidos vegetales y exudados radiculares, así como también se desconoce la identidad de los transportadores que podrían participar en la translocación de azúcares hacia la raíz. Determinar cómo un hongo simbiote modula el metabolismo del carbono en la planta hospedera y el papel de la biosíntesis, transporte y señalización de azúcares en la bioestimulación por moléculas de origen fúngico es de gran relevancia científica.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos orgánicos volátiles de *Trichoderma atroviride* promueven la fotosíntesis, la acumulación, transporte y exudación de azúcares en *Arabidopsis*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la participación de los compuestos orgánicos volátiles de *T. atroviride* en la biosíntesis, acumulación, transporte y exudación de azúcares en *A. thaliana*.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el efecto de los compuestos orgánicos volátiles de *T. atroviride* sobre el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* bajo el suministro de diferentes fuentes de carbono.
- Analizar la expresión de los transportadores de azúcares AtSUC2 y AtSWEET en la raíz y follaje de *Arabidopsis* en respuesta a los volátiles de *T. atroviride*.
- Determinar el contenido de azúcares en follaje, raíz y exudados radiculares en *Arabidopsis* durante la interacción con *T. atroviride*.
- Evaluar el efecto de los volátiles de *T. atroviride* sobre la expresión de tres isoformas de la sacarosa-6-fosfato sintasa y el papel del gen *chlorina-1* en la bioestimulación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y de las líneas transgénicas *AtSUC2:GFP* (Imlau *et al.*, 1999), *AtSPS1F:uidA:GFP*, *AtSPS2F:uidA:GFP* y *AtSPS3F:uidA:GFP* (Solís *et al.*, 2017), así como la mutante *chlorina-1* donada amablemente por el Dr. Scott Poethig de la Universidad de Pennsylvania. Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 5 min y cloro al 20% (v/v) por 7 min. Transcurrido este tiempo, se realizaron cinco enjuagues de la semilla con agua destilada estéril y se incubaron por 48 h a 4°C. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri con medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962). El medio contiene sales MS 0.9 g/L adquiridas en la casa Sigma (4.3 g/L se usan para obtener una concentración 1X de medio) y 6 g/L de sacarosa, pH 7 y fitagar 1% (Phytotechnology). Una vez sembradas las semillas, las cajas Petri se colocaron en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 h luz, 8 h oscuridad, intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a temperatura de 22°C. Para el sistema de experimentación con fuentes de carbono localizadas foliarmente, se empleó una tira de parafilm de 5.3 X 1 cm, previamente esterilizada. Sobre cada tira se colocaron gotas de 100 μL c/u de medio MS 0.2x suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa, de igual forma ajustado a pH 7 y fitagar al 1%.

6.2. Ensayo de co-inoculación planta/hongo

Para los ensayos de co-cultivo *in vitro* en cajas de Petri divididas, se utilizaron plántulas de *A. thaliana* de 4 días después de germinación (4 ddg) en medio MS 0.2x. El inóculo del hongo consistió en 1×10^6 esporas de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (material biológico proporcionado por el Dr. Alfredo Herrera Estrella, LANGEBIO-CINVESTAV, Irapuato). En uno de los lados de la caja se germinaron y crecieron 6 plantas de *Arabidopsis* y en el otro lado se incluyó medio MS 0.2x como control o sobre el mismo

tipo de medio se inoculó *T. atroviride*. Las cajas se dispusieron en un diseño completamente al azar en la cámara de crecimiento. A los 10 días después de germinación (10 ddg) y de la interacción se evaluó la raíz primaria de las plántulas y se obtuvo el número de raíces laterales presentes en la raíz primaria desde el ápice hasta la zona de transición entre la raíz y el tallo mediante un estereoscopio Leica MZ6 a un aumento 20X. La densidad de raíces laterales se obtuvo dividiendo los valores de la longitud sobre el número de raíces laterales.

6.3. Análisis de la actividad de GUS y GFP

Las plantas transgénicas *AtSPS1F:uidA:GFP*, *AtSPS2F:uidA:GFP* y *AtSPS3F:uidA:GFP* fueron incubadas en cajas de micro-título con una solución de X-Gluc al 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM durante una hora a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se clarificaron con una solución HCL 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 60 min a 62 °C. Después se removió la solución y se agregó NaOH al 7% (v/v) en etanol al 60% (v/v) por 25 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la solución y el tejido se hidrató con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) 20 min cada uno. Finalmente, se sustituyó el etanol al 10% por glicerol al 50% (v/v) y se colocaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio de contraste Leica DM 5500 B.

Para la microscopía confocal, las plántulas transgénicas de *AtSUC2:GFP*, *AtSPS1F:uidA:GFP*, *AtSPS2F:uidA:GFP* y *AtSPS3F:uidA:GFP*, se transfirieron desde el medio de crecimiento a una solución de yoduro de propidio al 0.1% (10 mg mL⁻¹) para posteriormente montarse en un portaobjetos y analizarse con un microscopio confocal (Olympus FV1000). Algunas micrografías se fusionaron para producir una imagen final y se seleccionaron imágenes representativas de cada tratamiento para la construcción de figuras. La cuantificación de la fluorescencia GFP en las puntas de la raíz primaria se hizo mediante la determinación de píxeles verdes presentes en el área de expresión de la GFP, utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), en 8 micrografías por línea y tratamiento. A continuación, se obtuvo un valor en unidades arbitrarias (U.A.= píxeles verdes/ μm^2) para cada micrografía y las medias se obtuvieron a partir del conjuntos de datos completos. Las

medias de las U.A. de la condición control se estandarizaron a un valor de 1, para que los valores de los tratamientos se ajustaran con relación a éstos, por lo tanto se refiere en las figuras como fluorescencia relativa al valor obtenido.

6.4. Cuantificación de clorofila

Plantas de *A. thaliana* de diez días después de la germinación de cada tratamiento fueron transferidas a cajas de microtítulo conteniendo 1 mL de etanol 96%, para incubarse durante 1 h. Posteriormente, al sobrenadante se le midió la absorbancia a 646 y 663 nm. El contenido total de clorofila fue calculado con la siguiente fórmula: $[(7.15 \times A_{664.2}) + (18.71 \times A_{648.6})] / [1000 \times (\text{peso fresco})]$ y reportado como mg de clorofila por peso fresco, como describe Lichtenthaler (1987) y Zhang *et al.* (2008).

6.5. Determinación de sacarosa y glucosa en tejido y exudados radiculares por GC-MS

6.5.1. Extracción en tejidos

Las plantas de *A. thaliana* co-cultivadas con *T. atroviride* se dividieron en sistema aéreo y radicular, posteriormente, se pesó la biomasa y se procedió a pulverizar el tejido con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Dicho polvo se transfirió a un microtubo con 500 µL de etanol al 80%, se incubaron a 65°C con agitación de 1200 rpm por 8 h. Posteriormente los tubos se centrifugaron y se recolectó el sobrenadante. También se volvió agregar a la pastilla 200 µL de etanol al 80%, seguido de una agitación de 1200 rpm por 2 h y se centrifugo otra vez. Los sobrenadantes se juntaron y se pasaron a viales de reacción adicionando 200 µL de diclorometano.

6. 5. 2. Obtención de los exudados radiculares

Trescientas cincuenta plántulas crecidas en condiciones axénicas o co-cultivadas con *T. atroviride* fueron trasferidas a cajas de microtítulo conteniendo 1 mL de agua desionizada

estéril e incubadas durante 48 h en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) a 24 °C y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Para evitar la entrada de luz hacia las raíces las cajas se recubrieron de aluminio en su totalidad. Una vez transcurrido este tiempo, se colectaron los exudados radiculares disueltos en agua y se sometieron a un proceso de liofilización para la eliminación de H₂O. El producto final se resuspendió en 500 µL de acetato de etilo, se agitó en un vórtex y se transfirió a viales de reacción.

6. 5. 3. Derivación de azúcares

Los azúcares se derivaron para formar aldonitrilos peracetilados siguiendo el siguiente protocolo. Las muestras se llevaron a sequedad total con gas nitrógeno en viales de reacción. Posteriormente, se agregó 1.5 mL de cloruro de hidroxilamina en piridina (53 mg/ 3 mL), seguido de una sonicación durante 30 minutos para después llevar a cabo la reacción a 85 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo, se agregó 500 µL de piridina y 1 mL de anhídrido acético y se mantuvo nuevamente a 85 °C por 25 minutos. Una vez que la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se realizó una separación de fases de 2 lavados con 1 mL de CHCl₃ y 1 mL de agua desionizada para eliminar la piridina. Finalmente, la muestra se pasó a través de una columna con Na₂SO₄ anhídrido para eliminar la humedad y se transfirió a viales ámbar para llevarse a sequedad total con gas nitrógeno, posteriormente se resuspendió en 25µL CHCl₃ para su inyección.

6. 5. 4. Análisis por GC-MS

Todas las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850 Series II) acoplado a un detector de masas (Agilent 5973) y una columna HP5-MS de 30 m x 0.2 µm x 0.25 mm, 5 % fenil metil silicona (HP-5 MS). Las condiciones de corrida fueron con helio como gas acarreador 1mL/min⁻¹ y temperaturas de 300°C para el detector y 270°C para el inyector. La columna se calentó durante 3 min a 80°C y el aparato fue programado para incrementar la temperatura 6°C/min⁻¹ para alcanzar al final 270°C durante 30 min. En el caso de los tejidos, se inyectó 1 µL del volumen de la muestra y de los exudados se

inyectaron 2 μ L. La identificación de glucosa y sacarosa se realizó por comparación con el tiempo de retención de los estándares derivados y mediante un monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés) en el espectrómetro de masas, en el que los iones seleccionados fueron 103, 145, 314 y 169, 211, 331 m/z para glucosa y sacarosa, respectivamente. Una cantidad de 100 mg de los estándares D-(+)-Glucosa $\geq 99.5\%$ (Sigma Aldrich) y sacarosa pureza de polarimetría de 99.53% (Zulka®) fue disuelta previamente en 100 mL de metanol al 80%, de ahí se tomó una alícuota de 100 μ L que se evaporó con gas nitrógeno en los viales y se procedió a su derivación. A partir de los estándares derivados, se elaboraron las curvas de calibración para la cuantificación.

6.6. Análisis de la expresión de los transportadores SWEET por RT-qPCR

6. 6. 1. Extracción de RNA

Se colocó el tejido en un mortero estéril, previamente enfriado, para ser pulverizando con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino. Después se colocó 500 mg del polvo en un microtubo y se agregó 1 mL de Trizol, se mezcló en vórtex hasta la re-suspensión de la mezcla y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Al concluir este tiempo, se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó en vórtex nuevamente y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4°C en una centrífuga Universal 320 R Heitich Zentrifugen. El sobrenadante se transfirió a otro microtubo y se agregaron 0.5 mL de isopropanol frío, se mezcló en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C y se decantó para lavar la pastilla con 1 mL de 70% etanol frío dos veces. La muestra se centrifugó a 12000 g por 5 min a 4°C, se decantó y secó a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla fue disuelta en 40 μ L de agua libre de RNAsas.

6. 6. 2. Corrimiento en gel de RNA y calibración

La cuantificación de RNA se realizó mediante el equipo Nanodrop (Thermo Scientific, modelo 2000). Se calculó el volumen requerido para tener 1 µg de RNA y este se mezcló con 2 µL de amortiguador de carga Blue/Orange 6X y se completó el volumen con H₂O-DEPC c.b.p. 10 µL. Para visualizar la integridad del RNA, la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris Acetato EDTA) 1x y bromuro de etidio 0.5 µg/mL, para lo cual se usó una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT. La electroforesis se realizó usando amortiguador TAE 1X, aplicando 90 mV (fuente Hoeffer EPS2A200) por 30 min. El RNA se visualizó en un transiluminador de UV y las imágenes se capturaron con el equipo KODAK Image Station (modelo 400R-PRO). Para la calibración, el RNA control y de los tratamientos con los COVs de *T. atroviride*, se separaron en un gel de agarosa bajo las condiciones antes descritas. Después del corrimiento la visualización del gel en un transiluminador, permitió la medición por densitometría de la banda del 28S RNA ribosomal, cuya intensidad de la banda se ajustó variando el volumen hasta la obtención de una intensidad similar.

6. 6. 3. Reacción de transcripción reversa

En un tubo de micro-centrifuga se agregó el volumen de RNA que resultó de la calibración, 1 µL de OligodT (20 µM) y se completó con H₂O DEPC para un volumen de 10 µL. Este tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 90 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar este tiempo, se colocó en hielo por 5 min y se agregó 10 µL de la mezcla de reacción que contiene los reactivos de la Tabla 1. La reacción se llevó inicialmente a 25 °C por 5 min seguido de 42 °C por una h para realizar el alineamiento y para inactivar a la enzima se llevó a 70 °C por 15 min. Esto se realizó con un Termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Tabla 1.- Mezcla de reacción empleada en la reacción de transcriptasa reversa

Reactivo	Volumen (μL)
Amortiguador ImProm-II 5X (Promega)	4.0
MgCL2 25mM	2.4
DNTP's 10mM	1.0
RT (Transcriptasa reversa)	1.0
H2O-DEPC	1.6

6. 6. 4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se realizó una estandarización de la técnica de qRT-PCR por medio de la evaluación de la especificidad de la reacción y eficiencia del método. Las secuencias de los *SWEETs* fueron obtenidas de las bases de datos del GeneBank y de Ensemble y los oligonucleótidos utilizados se diseñaron empleando el programa Primer3PLUS y Primer Designing Tool utilizando la actina como gen endógeno. En la Tabla 2 se presenta las secuencias de los oligonucleótidos empleados.

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión de los transportadores SWEET en *A. thaliana*.

SWEET	Dirección	Secuencia del oligonucleótido	PME (pb)
<i>AtSWEET1</i>	Sentido	CTTCTCCACTCTCCATCATGAGATT	232
	Antisentido	CATCTGCAGATTCTCTCCTTTGT	
<i>AtSWEET2</i>	Sentido	AACAGAGAGTTTAAGACAGAGAGAAG	145
	Antisentido	ATCCTCCTAAACGTTGGCATTGGT	
<i>AtSWEET3</i>	Sentido	CCAACTTTTCCCTAATCTTTGTTCTTC	133
	Antisentido	AACACCCTTGAAAATGTTACTATTGGA	

AtSWEET4	Sentido	CCATCATGAGTAAGGTGATCAAGA	128
	Antisentido	CAAAATGAAAAGGTGGAACCTTAATAAGTG	
AtSWEET5	Sentido	TGACCCTTATATTTTGATTCCAAATGGT	151
	Antisentido	GCCAAGTTCGATTCCAGCATTC	
AtSWEET6	Sentido	GACTCGGTTACGTTGGTGAAGT	96
	Antisentido	CAAACGCCGCTAACTCTTTTGTTTAA	
AtSWEET7	Sentido	GACCCATTCATGGCTATACCAAAT	240
	Antisentido	ATCCCATAATCCGAAGTTTAATAACACT	
AtSWEET8	Sentido	TTGCTCTCTTCTTCATCAATCTCTCT	150
	Antisentido	AGATCCTCCAGAAAGTCTTCGCT	
AtSWEET9	Sentido	GCAAGAGAAAGAGAGAAAAGTGAAGA	124
	Antisentido	CCCATAAAACGTTGGCACTGGT	
AtSWEET10	Sentido	TTTCTCTGTTTCAGCGCGATG	194
	Antisentido	GCCGAAACCCAAAACATCCA	
AtSWEET11	Sentido	TCCTCCTCTCCATCAACACC	131
	Antisentido	TGTCGACGACGTAGAACTGC	
AtSWEET12	Sentido	TCTCGTCACCATCAACAGCT	195
	Antisentido	CCTCCAATGATCTTCGCACG	
AtSWEET13	Sentido	TGTCTGCGAGCTCTTAACCA	181
	Antisentido	CGTGACGGCGCTAATTGTAA	
AtSWEET14	Sentido	AAGATGGAGCAGGCTTCCTT	185
	Antisentido	TTTGGTTAGGAGCTCGCAGA	
AtSWEET15	Sentido	CAATGACATATGCATAGCGATTCCAA	153
	Antisentido	GGACTCATCACGACAATACTCTTAAG	
AtSWEET16	Sentido	GAGATGCAAACCTCGCGTTCTAGT	114
	Antisentido	GCACACTTCTCGTCGTCACA	
AtSWEET17	Sentido	AGTGACAACAAAGAGCGTGAAATAC	

	Antisentido	ACTTAAACCGTTGCTTAAACCAACC	211
Actina	Sentido	CACTTTCCAGCAGATGTGGATC	80
	Antisentido	AATGCCTGGACCTGCTTCAT	

PME: Peso molecular esperado en pares de bases (pb)

6. 6. 5. Evaluación de la especificidad de la reacción

Se llevó a cabo el análisis de los oligonucleótidos empleados para cada gen a amplificar. Esto con el fin de verificar que no formaran dímeros ni productos inespecíficos. Para cada transportador SWEET se encontró un solo pico en la curva de disociación, así como en el gen endógeno de actina como gen constitutivo.

6. 6. 6. Establecimiento de la eficiencia del método

El ensayo de PCR se validó mediante una curva estándar a partir de las muestras de cDNA diluidas en serie, la cual se determinó por triplicado y se verificó que en cada ciclo subsecuente a la muestra más concentrada apareciera la curva típica de amplificación. La eficiencia de amplificación se realizó construyendo una curva de Ct (número de ciclos en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) vs Log Concentración (cDNA diluido en serie), donde la pendiente debe ser cercana a -3.32, lo cual corresponde a una eficiencia de amplificación del 100 %. La fórmula para calcular el % de eficiencia de amplificación (% E) es:

$$\% E = \left(\left[10^{-1/m} \right] - 1 \right) \times 100$$

Dónde:

m= Pendiente de la curva Ct vs Log Concentración. Considerándose como aceptable una eficiencia mayor al 90%

6. 6. 7. Cuantificación de la expresión de los transportadores AtSWEET mediante RT-qPCR

Para cuantificar la expresión se utilizaron los oligonucleótidos, cuya secuencia se indica en la Tabla 2, empleando como gen endógeno actina. La cuantificación de los niveles de la expresión de los transcritos de cada muestra de RNA se realizó por triplicado en un termociclador AppliedBiosystems 7500 Real-Time PCR System. La reacción de qRT-PCR se realizó en un volumen final de 20 µL con los componentes que se muestran en la Tabla.

Tabla 3.- Preparación de la mezcla de reacción para la técnica qRT-PCR para los oligonucleótidos empleados.

Reactivo	Volumen (µL)
SYBR Green PCR Master Mix	10.0
Oligonucleótido sentido (20 µM)	0.15
Oligonucleótido antisentido (20 µM)	0.15
cDNA	2.0
H ₂ O libre de DNAsas (c.b.p. 25 µL)	7.7

Se empleó el método de Pfaffl (2001) para realizar la cuantificación relativa de una muestra en comparación con un gen de referencia, el cual emplea la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E \text{ muestra})^{\Delta CP \text{ (control- muestra)}}}{(E \text{ referencia})^{\Delta CP \text{ referencia (control- referencia)}}}$$

Dónde:

E muestra= Eficiencia de muestra.

E referencia= Eficiencia de gen de referencia.

ΔCP= Ct gen control- Ct gen muestra.

ΔCP referencia= Ct gen control - Ct gen calibrador.

6. 6. 8. Reacción en cadena de la polimerasa punto final

Para la PCR se mezclaron 12.5 µL de PCR Buffer Master Mix 2X, 0.25 µL de cada oligonucleótido (20 µM; Tabla 2), 1 µL de cDNA como templado y H₂O libre de DNAsas (c.b.p. 25 µL). Las condiciones de amplificación incluyeron la pre-desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación en el que cada ciclo comprendía la desnaturalización a 94°C por 40 seg, el alineamiento a 57°C por 60 seg y la extensión a 72°C por 40 seg. La amplificación concluyó con la extensión final a 72°C por 7 min. Al final de la PCR, a los 25 µL de la reacción se le agregó 5.0 µL de amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X y bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Asimismo se corrió en el mismo gel la mezcla de 2 µL del marcador de peso molecular de 100 pb con 4 µL amortiguador de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de UV, posteriormente las imágenes se capturaron con el equipo ChemiDoc, modelo MP System.

6. 7. Análisis de datos

Los resultados de los experimentos de los análisis bioquímicos y diferentes bioensayos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SPSS 10. Se emplearon análisis univariados y multivariados con la prueba post hoc de Tukey y T-Student. Las diferentes letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($P < 0.05$).

7. RESULTADOS

7. 1. Efecto de los volátiles de *T. atroviride* sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana* en respuesta al suministro de sacarosa localizada en el follaje

La disponibilidad de sacarosa que es transportada desde el tejido fotosintético hacia la raíz, determina su crecimiento y la arquitectura. Por su parte, evidencia en la literatura refiere que ciertos microorganismos benéficos del suelo como el caso *Trichoderma*, estimulan el crecimiento radicular, pero se desconoce que tanto influye el hongo en el metabolismo de los azúcares en las plantas. En este trabajo se analizó el efecto que tienen específicamente los volátiles de *T. atroviride* sobre la distribución de azúcares en plántulas de *Arabidopsis in vitro* en un sistema de caja de Petri dividida. Este sistema ya ha sido reportado previamente en la interacción *Trichoderma-Arabidopsis* en el cuál que se tiene reportado un aumento en la ramificación de las raíces y la producción de biomasa (Castro-Sánchez, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). Para comparar la influencia del co-cultivo con el hongo y una alta disponibilidad de azúcares en la planta, se utilizó una caja Petri dividida, en este sistema se posibilita la interacción de ambos organismos a través de los compuestos volátiles que producen. Por un lado se crecieron plántulas de 4 días de edad en un medio suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa (0, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6%) aplicadas localmente en el follaje y por el otro lado se inoculó y creció 1×10^6 esporas de *Trichoderma* (Fig. 14A).

El suministro de la sacarosa en la planta incrementó la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales, la densidad de raíces laterales y la biomasa radicular en plantas crecidas en condiciones axénicas desde la menor concentración evaluada (0.6%), aumentando la capacidad de ramificación y la biomasa en las concentraciones de 4.8 y 9.6% de sacarosa (Fig. 14B-E). En las plantas que fueron expuestas a los volátiles de *T. atroviride*, se aprecia un aumento en el crecimiento de la raíz y en el número de raíces laterales aún en medio sin sacarosa y 0.6%, así como un efecto similar entre las concentraciones intermedias (1.2 y 2.4%) de sacarosa, sin embargo, en las concentraciones altas de 4.8 y 9.6% de sacarosa se observa que los valores alcanzados para cada variable son mayores por parte del suministro de sacarosa en comparación con las plantas expuestas a los volátiles (Fig. 14B-E).

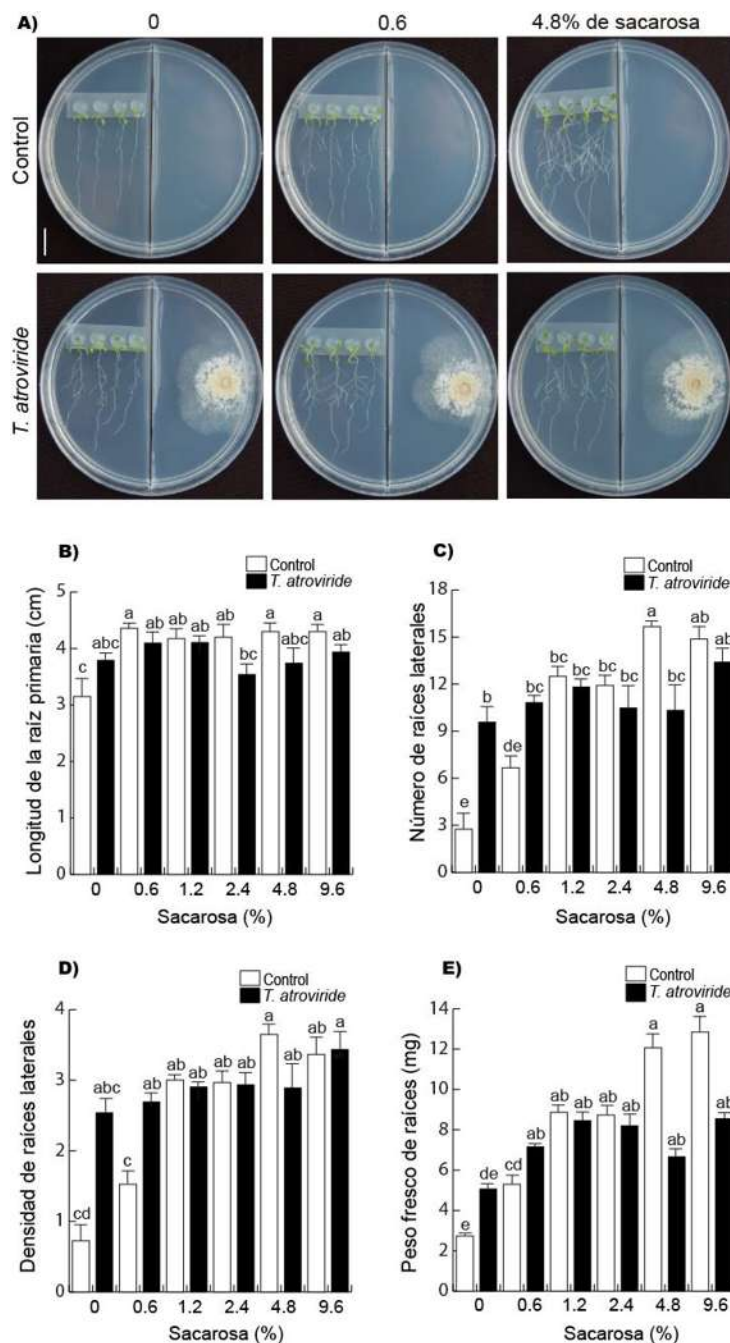


Figura 14. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa y en interacción con *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de la sacarosa foliar y la inoculación con *Trichoderma* sobre la arquitectura de la raíz en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de las raíces laterales y E) biomasa de raíces. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

La sacarosa, es la principal forma en la que se transportan los azúcares en las plantas. Su metabolismo en tejidos de demanda ocurre mediante la acción de invertasas que generan glucosa y fructosa. La aplicación foliar de cada uno de éstos monosacáridos promovió la elongación de la raíz primaria y la formación de raíces laterales (Fig.15A-E y 16A-E).

El efecto bioestimulante sobre la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la biomasa de la raíz se mantuvo en presencia de los volátiles de *Trichoderma*, y en el caso específico de la fructosa, el número de raíces laterales fue mayor en la presencia de los volátiles que los valores obtenidos con la fructosa por sí sola a partir de la concentración de 0.6% hasta 9.6% de fructosa (Fig.15A-E). Por otro lado, la glucosa también presentó valores mayores en el número y densidad de raíces laterales, así como biomasa, por parte de los volátiles a excepción de la concentración de 4.8% de glucosa (Fig.16A-E). Estos resultados con fructosa y glucosa, sugieren que el desarrollo de las raíces laterales depende en gran medida del transporte de asimilados desde el follaje hacia el raíz y que los volátiles de *Trichoderma* son suficientes para inducir una alta capacidad de ramificación radical.

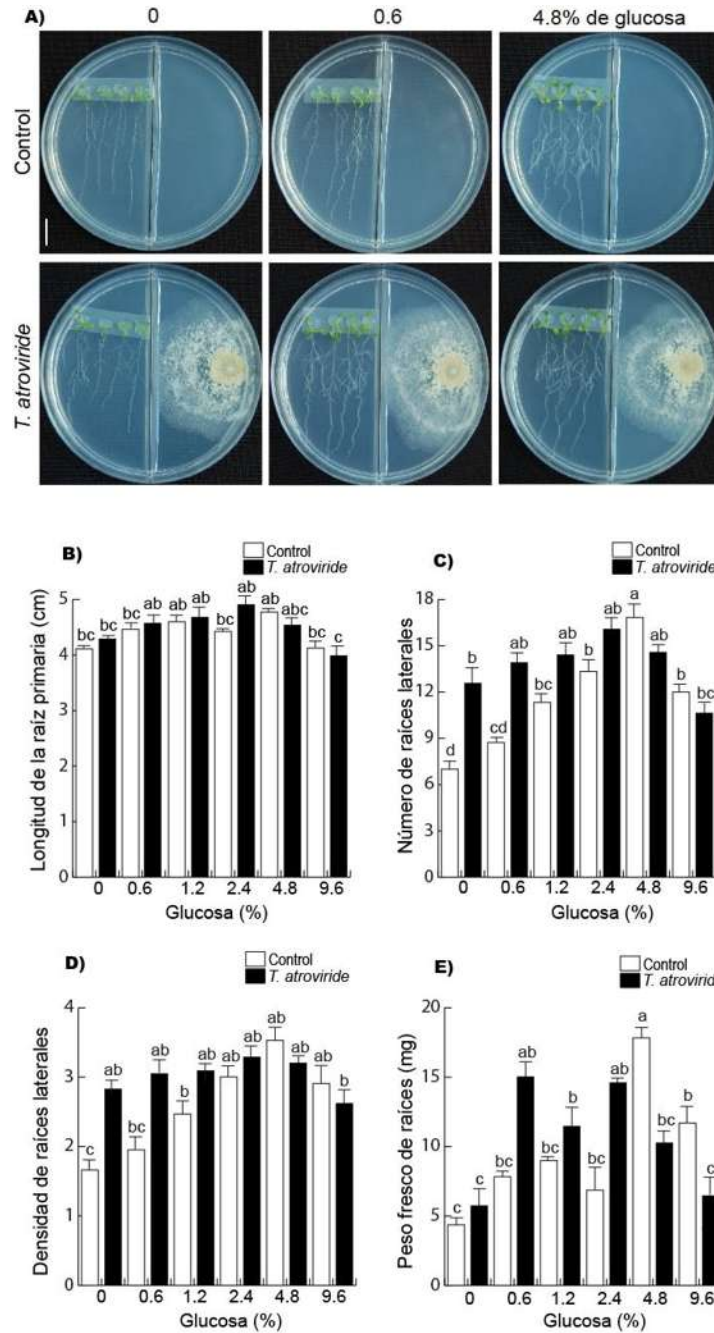


Figura 15. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la aplicación foliar de glucosa y en interacción con *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de la sacarosa foliar y la inoculación con *Trichoderma* sobre la arquitectura de la raíz en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones crecientes de glucosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de las raíces laterales y E) biomasa de raíces. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

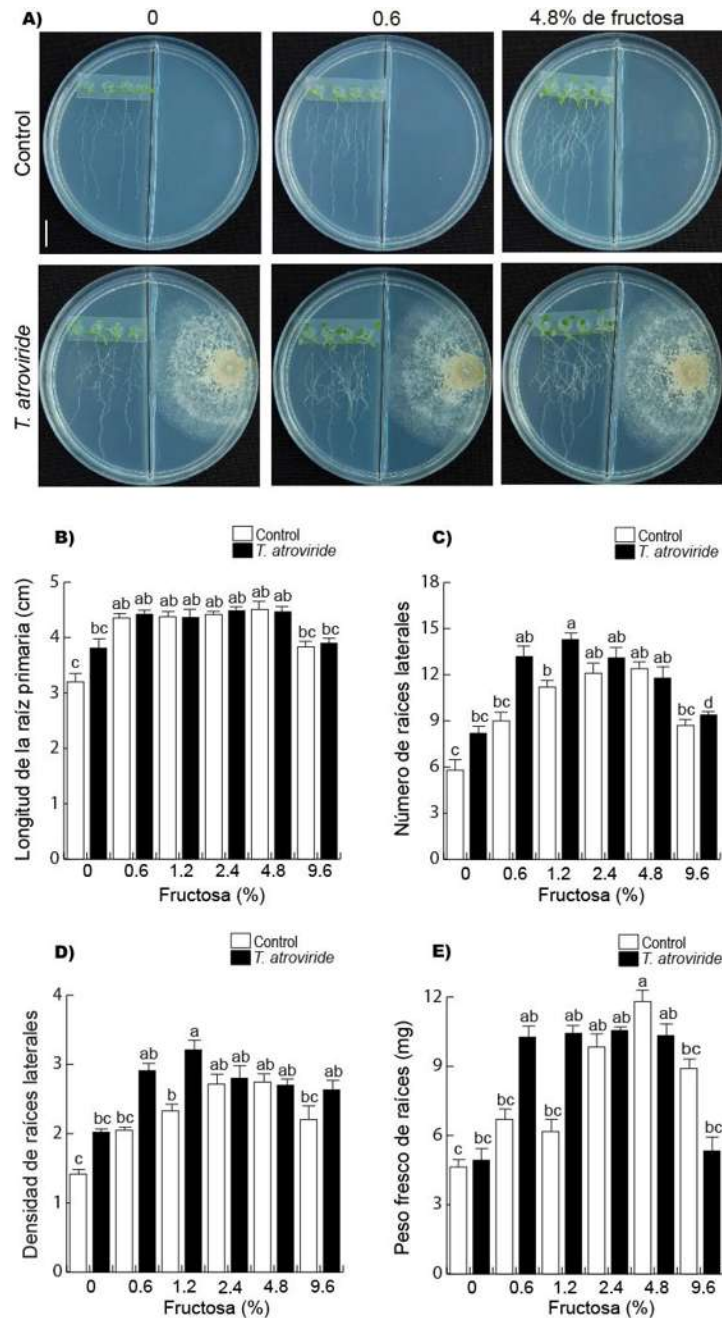


Figura 16. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la aplicación foliar de fructosa y en interacción con *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de la sacarosa foliar y la inoculación con *Trichoderma* sobre la arquitectura de la raíz en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones crecientes de fructosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de las raíces laterales y E) biomasa de raíces. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

En un experimento subsecuente, plántulas de *Arabidopsis* de 4 días de edad germinadas y crecidas en un medio MS 0.2x suplementado con 0.6% de sacarosa fueron transferidas al mismo medio de crecimiento sin sacarosa y la fuente de carbono fue aplicada al follaje. A diferencia del ensayo anterior que contenía una concentración basal de sacarosa (0.6%), la longitud de la raíz primaria aumentó a partir de la concentración de 1.2%, pero más notoriamente en 2.4 y 4.8% de sacarosa. En los tratamientos en que las plantas estuvieron expuestas a los volátiles, las diferencias de crecimiento, en el caso de la longitud de la raíz primaria, fueron insignificantes en la concentración de 0%, pero fueron mayores los valores obtenidos en el número de raíces laterales. Sin embargo, los valores para el número de raíces laterales, para las concentraciones de 4.8 y 9.6% de sacarosa, más los volátiles, son similares. Esto nos indica que la formación de raíces laterales es un proceso de gran demanda energética, y por lo tanto se potencia con el suministro de sacarosa y los volátiles (Fig.17A-B).

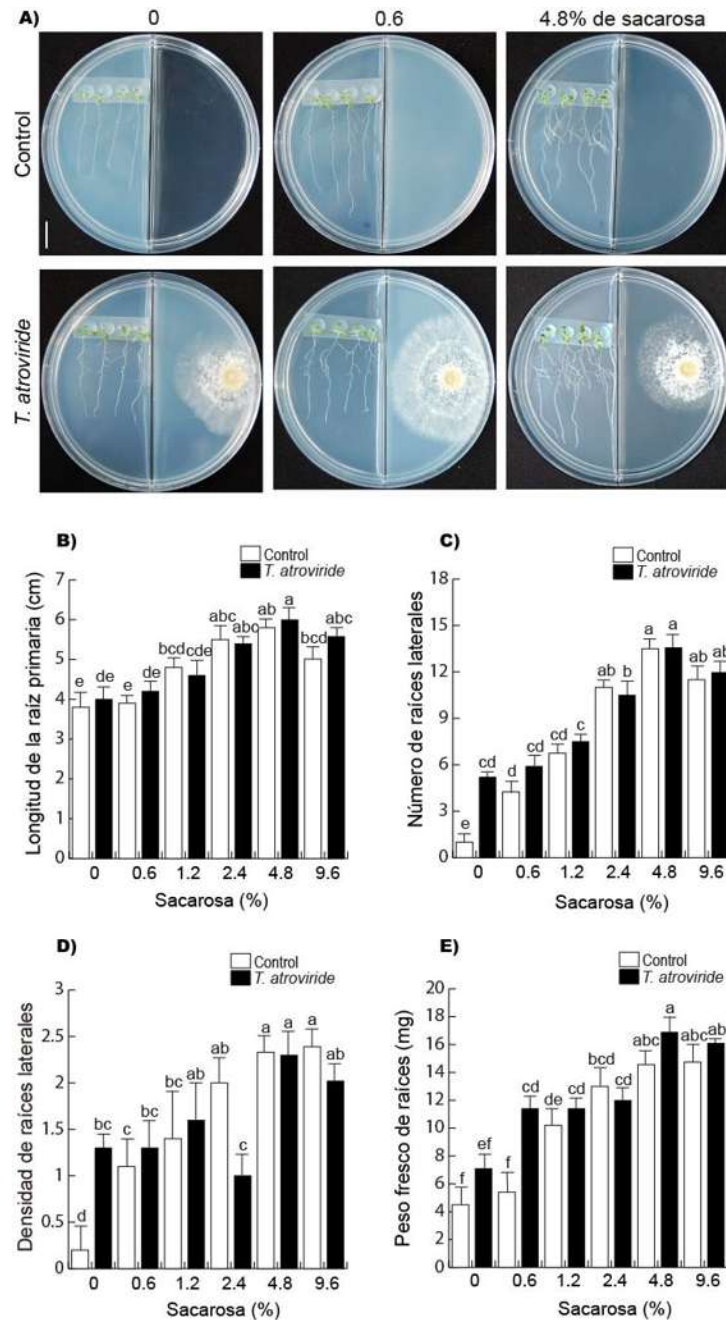


Figura 17. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa, en medio sin sacarosa y en interacción con *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de la sacarosa foliar y la inoculación con *Trichoderma* sobre la arquitectura de la raíz en medio MS 0.2 suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de las raíces laterales y E) biomasa de raíces. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

En un tercer ensayo, se restringió el suministro de la sacarosa en los medios empleados desde la germinación de las semillas y a los cuatro días las plantas se transfirieron a medios en los que la concentración de sacarosa se aplicó localmente al follaje. El resultado fue una poca promoción del crecimiento foliar y una disminución de la arquitectura de la raíz aun a pesar de las concentraciones altas de sacarosa aplicadas foliarmente (Fig.18A-B). Este fenotipo pudo ser causado por el estrés sometido a las plantas durante la transición del desarrollo posterior a la germinación de las plántulas. Las reservas de glucosa endógena de la semilla es invertida en gran parte, en la elongación del hipocotilo, manteniendo en latencia el crecimiento de las raíces, para dar prioridad al desarrollo de los cotiledones, los cuales se convertirán en hojas fotosintéticamente activas que suministren energía para la reactivación del crecimiento de la raíz. Es decir, las plantas requieren de la sacarosa del medio para poder sustentar su crecimiento en las primeras etapas de desarrollo cuando aún no sustentan su nutrición autótrofa.

Estas diferencias en las respuestas de la arquitectura radicular observadas en los ensayos de sacarosa y su interacción con los volátiles de *Trichoderma* (Fig.14; 17; 18A-B), sugieren un mecanismo por el cual, los volátiles podrían promover el proceso de fotosíntesis, la acumulación de azúcares y su transporte a los tejidos consumidores.

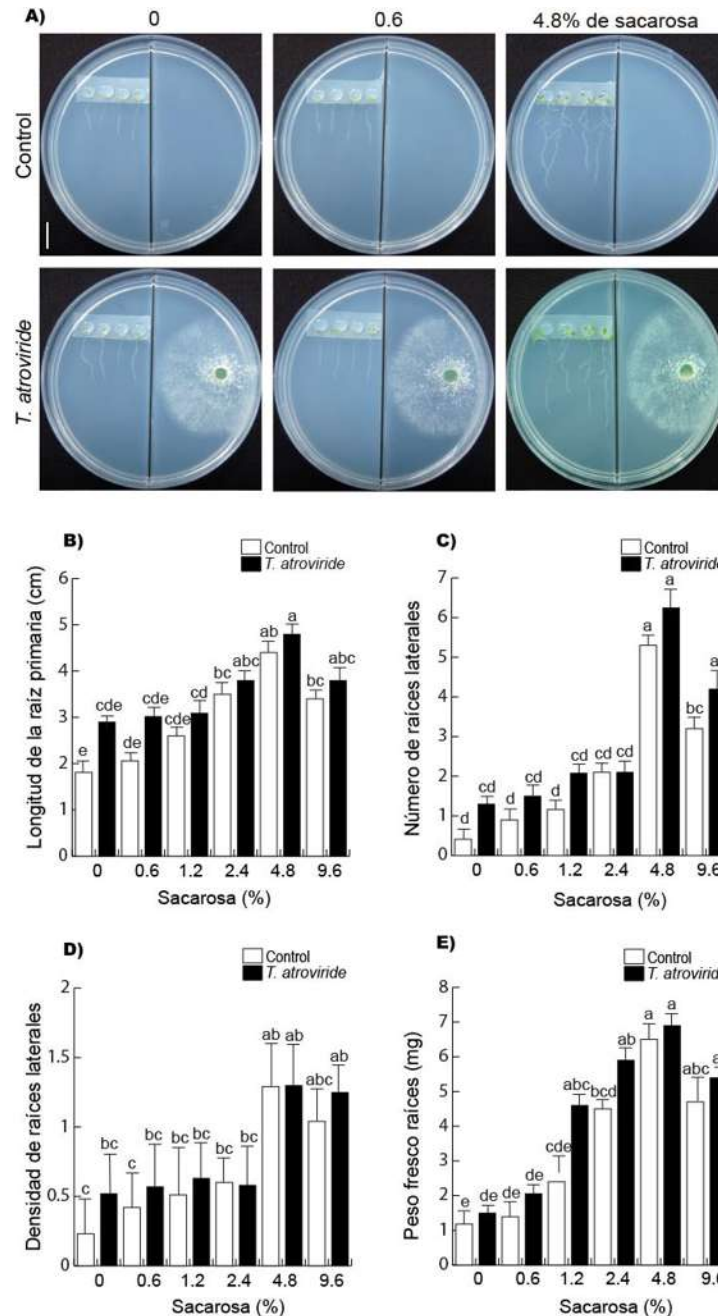


Figura 18. Arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* germinadas en medio sin sacarosa y en respuesta a la aplicación foliar de sacarosa e interacción con *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de la sacarosa foliar y la inoculación con *Trichoderma* sobre la arquitectura de la raíz en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones crecientes de sacarosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de las raíces laterales y E) biomasa de raíces. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

7. 2. Efecto de la sacarosa y los volátiles de *T. atroviride* sobre la expresión de *AtSUC2:GFP*

Para dilucidar un posible efecto de los volátiles de *T. atroviride* sobre el transporte de sacarosa, se caracterizó la expresión del principal transportador de carga de fotosintatos al floema en *Arabidopsis*, *AtSUC2* a través de la línea reportera *AtSUC2:GFP* generada por Imlau y col. (1999). Quienes observaron que la proteína GFP de 27 kDa puede atravesar los plasmodesmos de las células acompañantes y los elementos cribosos para migrar hacia el floema, donde junto con la corriente de asimilados, se distribuyen hacia los diferentes órganos consumidores, incluyendo la raíz. En este sitio, la GFP puede descargarse simplásticamente desde el floema hacia las células del meristemo. Las semillas de la línea transgénica *AtSUC2:GFP* fueron geminadas y crecidas en medio MS 0.2x con una concentración basal de 0.6% de sacarosa y a los 4 días se transfirieron a medios en los que se aplicó 4.8% de sacarosa foliarmente, debido a que esta concentración de sacarosa mostró siempre el mayor efecto de inducción de crecimiento en los ensayos previos y donde se obtuvo el efecto antagónico con los volátiles de *T. atroviride* en cuanto a la emergencia de raíces laterales. Los resultados sugieren que la aplicación de sacarosa inhibe la expresión del transportador en la raíz y que este efecto también se observa cuando se expone la planta a los volátiles del hongo (Fig. 19A-B).

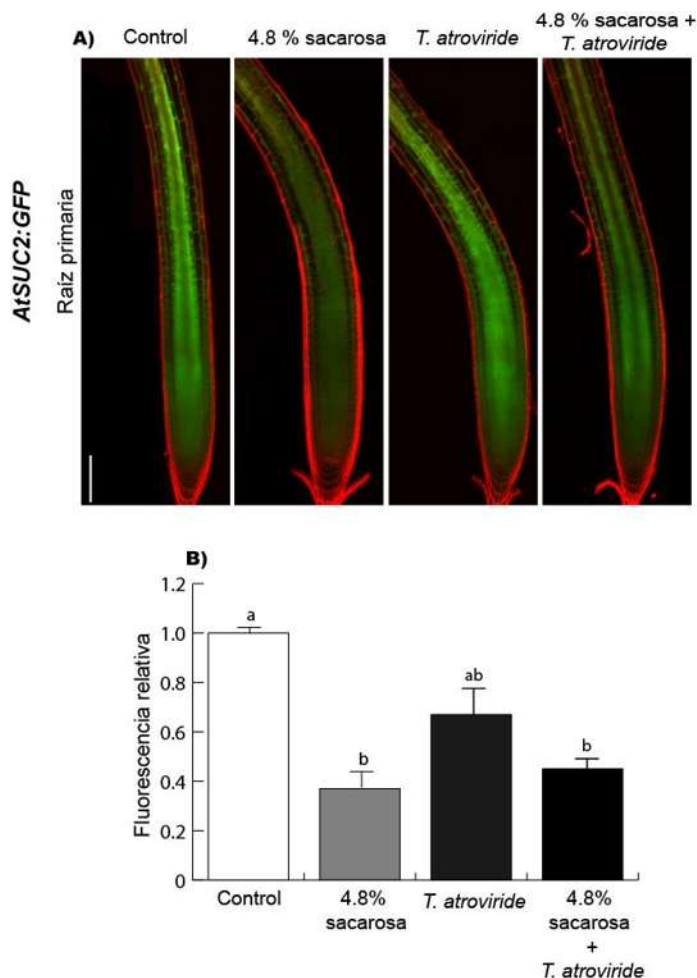


Figura 19. Expresión del transportador de sacarosa AtSUC2 en respuesta a la sacarosa foliar y volátiles de *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del ápice de la raíz primaria de *A. thaliana* que expresan *AtSUC2:GFP*. B) La gráfica muestra la media $\pm$ error estándar ($n=8$) de la fluorescencia relativa. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p<0.05$). Barras de escala = 100 μ m.

Para conocer con más detalle la regulación de la expresión de *AtSUC2* en presencia de sacarosa y los volátiles de *Trichoderma*, se llevó a cabo un análisis de la expresión de *AtSUC2:GFP* en diferentes partes de la planta. Con esta estrategia se evidenció un patrón diferencial de expresión tejido específica, cuya inducción o represión está en función del tratamiento aplicado. En el caso de los cotiledones, se observó una disminución en la expresión de *SUC2* en presencia de la sacarosa, los volátiles y la interacción entre ambos. Por otra parte, en las hojas, la fluorescencia se localizó principalmente en las nervaduras, obteniéndose un ligero aumento en respuesta a sacarosa y una ligera disminución de la

expresión por los volátiles y los tratamientos combinados. En el hipocotilo y la zona de transición con la raíz, también se observó una disminución de la expresión de *AtSUC2* por la sacarosa, los volátiles y la combinación de ambos con respecto a la condición control, que mostró una expresión localizada en el cilindro vascular. Mientras que en la zona de diferenciación de la raíz primaria, la fluorescencia se mantiene en presencia de *Trichoderma*, en el tratamiento con sacarosa y en ambos tratamientos combinados (Fig. 20).

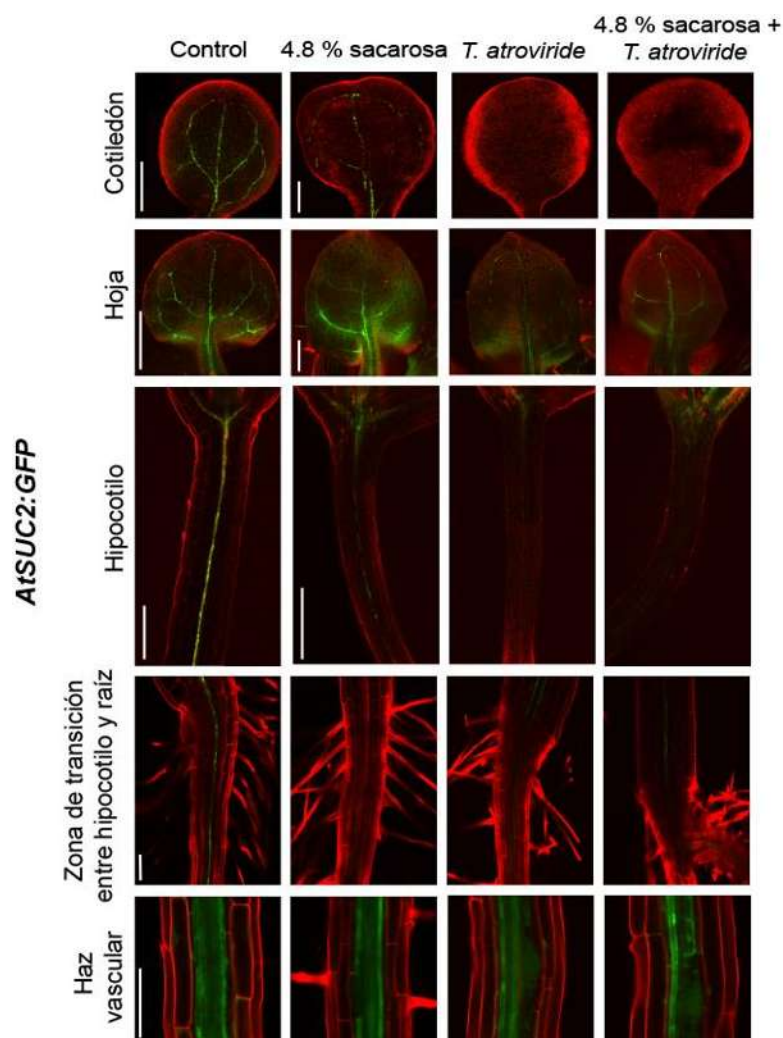


Figura 20. Expresión de *AtSUC2:GFP* en diferentes regiones de plántulas de *Arabidopsis*. Fotografías representativas de hojas cotiledonales, hojas verdaderas, hipocotilo y cilindro vascular de la raíz de la línea transgénica *AtSUC2:GFP* de *A. thaliana* en respuesta a la sacarosa foliar y volátiles de *T. atroviride*. Barras de escala = 0.1mm para hojas y tallo; 100 μ m para zona de transición y haz vascular.

Esta expresión diferencial entre los tejidos, indica que la sacarosa suministrada al poner en contacto el follaje con una gota de agar suplementada con el azúcar, inhibe la expresión del transportador *AtSUC2*. El efecto represor sobre la expresión de *AtSUC2* en la punta de la raíz primaria, las hojas cotiledonales y verdaderas, así como en el hipocotilo y zona de transición con la raíz, fue más discreto en presencia de los volátiles, lo que sugiere una posible interacción entre ambos factores, es decir, se plantea la posibilidad de que los volátiles pudieran estar incrementando la acumulación de fotosintatos en el follaje, los cuales reprimen la expresión de *AtSUC2*.

7. 3. La expresión de *AtSUC2:GFP* es dependiente de la concentración de sacarosa aplicada al follaje

Para determinar si la respuesta de *AtSUC2* a los volátiles podría estar relacionada con un incremento en los niveles de azúcares, se realizó un experimento en el que se suministraron concentraciones de sacarosa desde 0 hasta 9.6%. Se encontró una disminución de la fluorescencia en el ápice de la raíz primaria de manera dependiente al incremento de la concentración de sacarosa. De manera similar, la expresión en el haz vascular en la zona de diferenciación se reduce a concentraciones mayores de 4.8 y 9.6%, en tanto que la formación de primordios de raíces laterales se incrementa con la sacarosa (Fig. 21A-B).

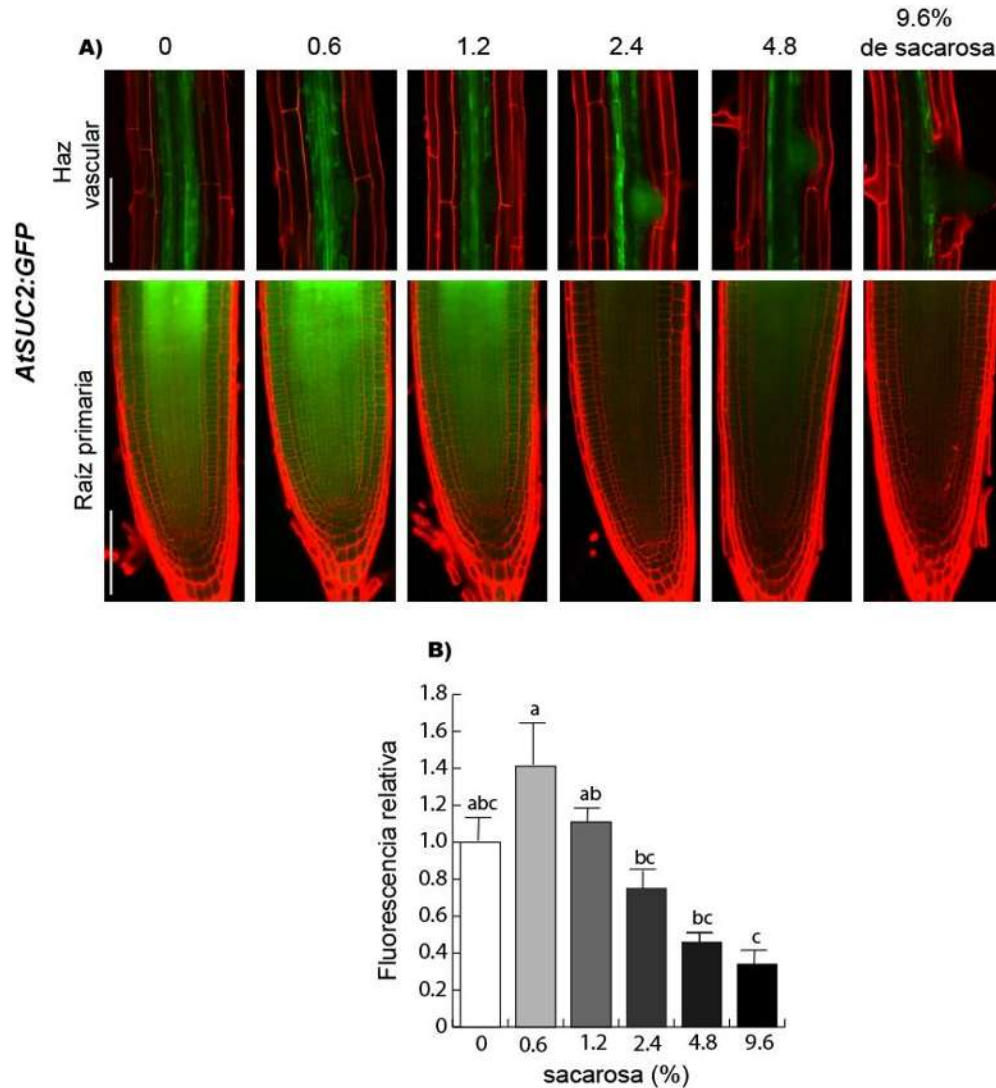


Figura 21. Regulación de la expresión de *AtSUC2:GFP* en la raíz de *Arabidopsis* por el suministro foliar de sacarosa. A) Fotografías representativas de dos regiones de la raíz primaria de *A. thaliana* que expresan *AtSUC2:GFP*. B) La gráfica muestra la media $\pm$ error estándar ($n=8$) de la intensidad de fluorescencia relativa en la zona meristemática. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p<0.05$). Barras de escala = 100 μ m.

En el follaje, la aplicación de sacarosa promovió el desarrollo de los primordios de las hojas verdaderas, en tanto que la expresión de *AtSUC2:GFP* comienza con una intensa expresión en el primordio de la hoja, incluyendo las células del mesófilo y las nervaduras, pero que conforme se va desarrollando la hoja por el suministro de sacarosa, la expresión del marcador se limitó a las nervaduras (Fig. 22). En el hipocotilo, también se observó una

disminución de la expresión de *AtSUC2* dependiente de la concentración de sacarosa. Esto indica que el suministro de sacarosa no solo determina su propio transporte hacia la raíz vía *AtSUC2*, sino que también sugiere una retroalimentación negativa en la que una alta concentración de azúcar inhibe la expresión del transportador en diversos órganos de la planta, como hojas e hipocotilo.

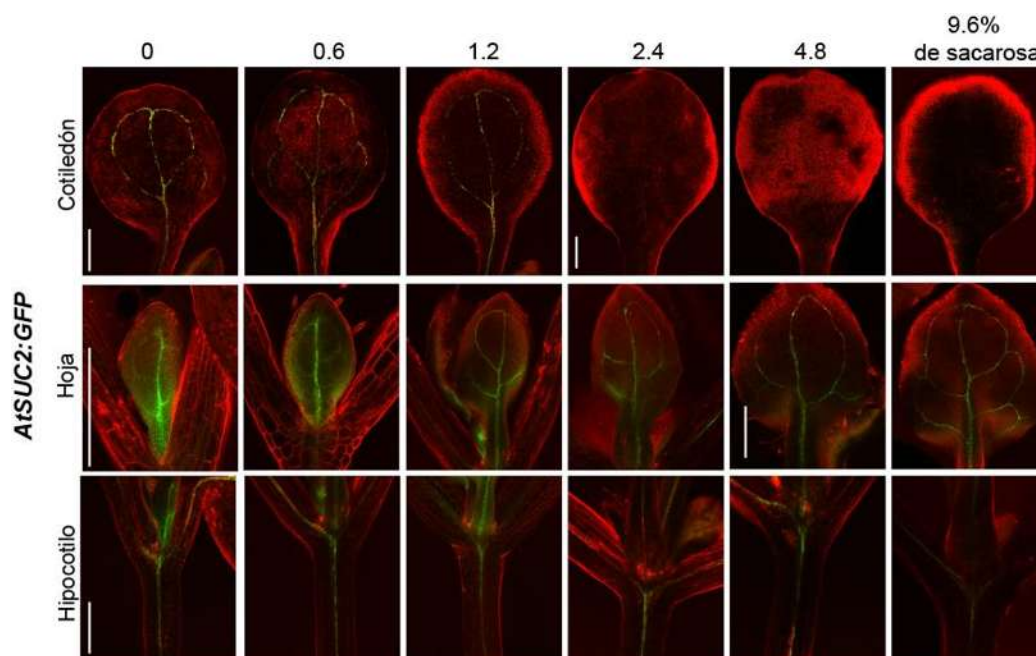


Figura 22. Expresión de *AtSUC2:GFP* en el follaje de *Arabidopsis* en respuesta a la sacarosa suministrada en follaje. Fotografías representativas de los cotiledones, hojas verdaderas, e hipocotilo de la línea transgénica *AtSUC2:GFP* de *A. thaliana* en respuesta a concentraciones al suministro de sacarosa. Barras de escala = 0.1mm.

7. 4. La deficiencia de sacarosa y los volátiles de *T. atroviride* incrementan la expresión de *AtSUC2:GFP*

A continuación se llevó a cabo un experimento para comparar el efecto de los volátiles de *Trichoderma* sobre la expresión de *AtSUC2* en plántulas crecidas en medios con deficiencia de sacarosa (MS 0.2x con y sin 0.6% de sacarosa). Plántulas de 4 días de edad, se inocularon con *T. atroviride* durante 4 días adicionales. La limitación de sacarosa causó una disminución considerable en el crecimiento de la raíz y en la formación de raíces

laterales, aunque aún se observó el efecto promotor del crecimiento de los volátiles de *Trichoderma*, particularmente cuando se suministró una concentración baja de sacarosa (0.6%) (Fig. 23A). El análisis subsecuente realizado por microscopia confocal de la expresión de *AtSUC2*, mostró que en el ápice de la raíz primaria se presentó una marcada afectación de las zonas de división y elongación celular donde se muestra el acortamiento y engrosamiento de las células de la epidermis y corteza. En estas condiciones, la fluorescencia de la GFP se induce notablemente bajo carencia de sacarosa y en respuesta a los volátiles de *Trichoderma* en todas las células de la punta de la raíz, incluyendo posiblemente el meristemo y el centro quiescente, ya que la fluorescencia se muestra por sobre estas (Fig. 23B-C). Estos resultados indican que la limitación en el suministro de azúcar induce la expresión del transportador en las zonas de división celular y crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*.

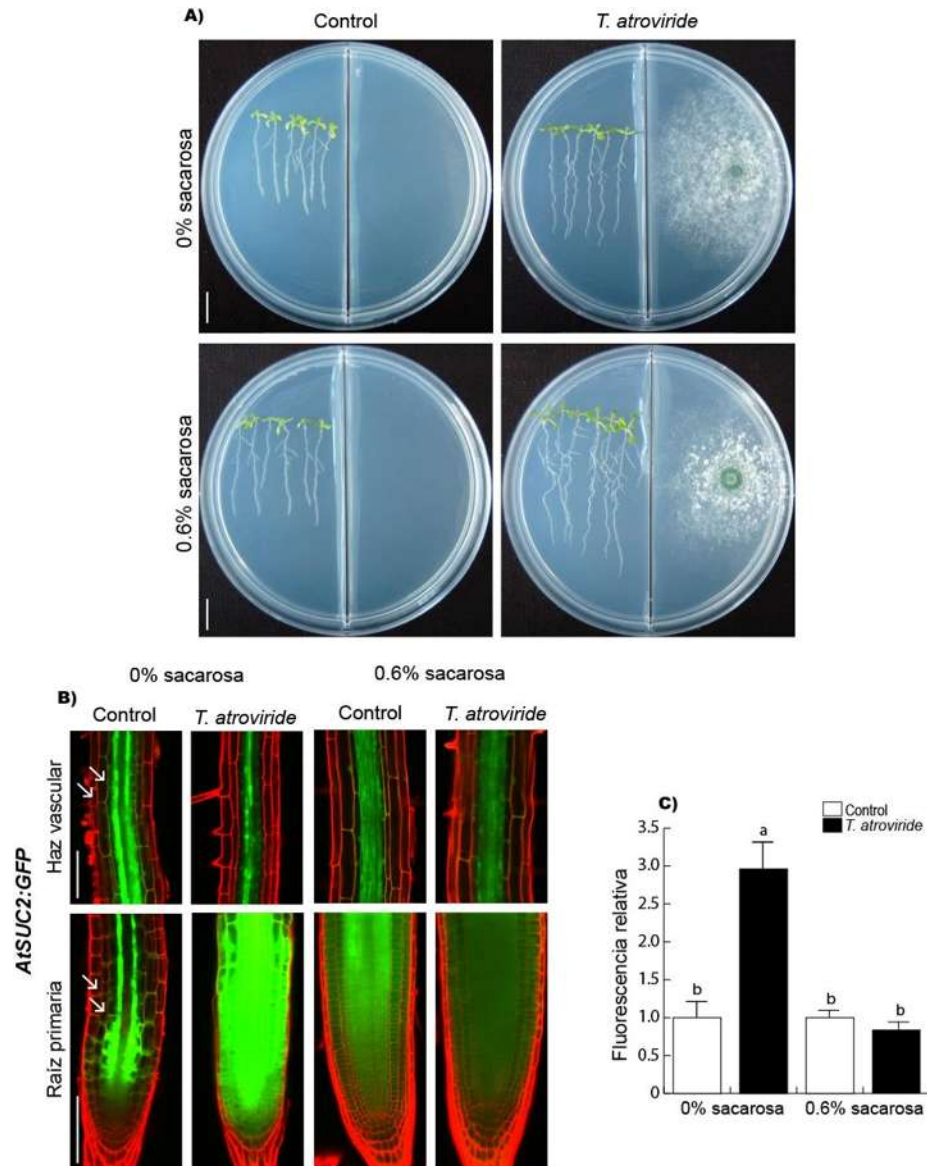


Figura 23. Expresión de *AtSUC2:GFP* en condiciones de deficiencia de sacarosa y en exposición a los volátiles de *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del crecimiento de las plantas en el sistema de caja dividida. B) Expresión de *AtSUC2:GFP* en el ápice de la raíz primaria de *A. thaliana*. C) La gráfica muestra la media $\pm$ error estándar ($n=8$) de la intensidad de fluorescencia relativa. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p<0.05$). Barras de escala = 1 cm placa y 100 μ m en ápice de raíz primaria.

Los resultados anteriores sugieren que durante una deficiencia de carbono, la planta emplea un mecanismo que concentra el flujo de asimilados para el mantenimiento del

meristemo apical de raíz, el cual es potenciado por los volátiles de *Trichoderma* que promueven la localización del transportador AtSUC2 en el meristemo y la zona de elongación.

7. 5. La 6-PP modifica la expresión de AtSUC2:GFP

La 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) es uno de los compuestos volátiles mayoritariamente emitidos por *T. atroviride* (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Para evaluar la posible participación de esta molécula en el transporte de azúcares, se llevó a cabo un ensayo, en el cual fueron germinadas y crecidas plantas de *Arabidopsis* que expresan AtSUC2:GFP en medio MS 0.2x suplementado con concentraciones crecientes de 6-PP en un intervalo desde 0 a 150 μ M. A partir de los 10 días de crecimiento, las plantas presentaron un aumento de la ramificación de la raíz y en la producción de biomasa, desde la concentración de 50 y 100 μ M de 6-PP (Fig. 24A). Sin embargo, a partir de la concentración de 150 μ M, se observó una disminución de estos valores de acuerdo a lo reportado por Garnica-Vergara y col. (2015). El análisis de la expresión del marcador del transportador AtSUC2 mostró una disminución de la presencia de la GFP en el meristemo apical y en el haz vascular de la zona de diferenciación de la raíz primaria de manera dependiente a la concentración de 6-PP (Fig. 24B-C).

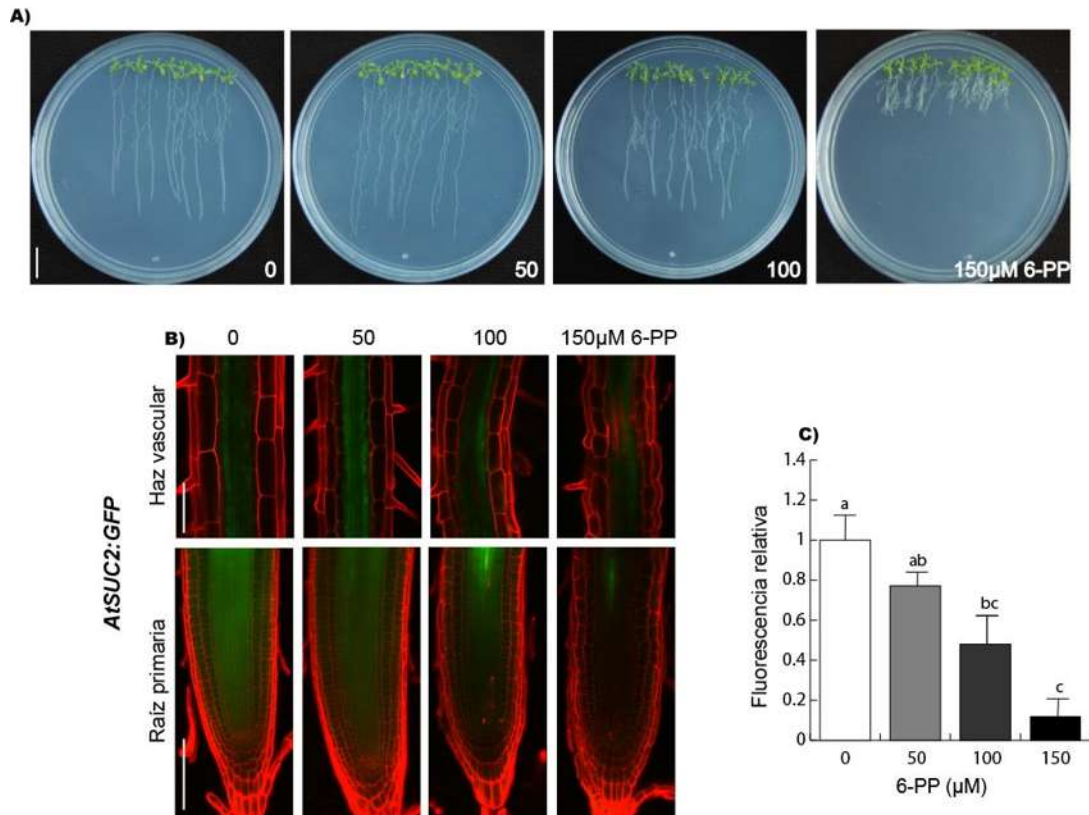


Figura 24. Efecto de la 6-PP en la expresión de *AtSUC2:GFP*. A) Fotografías representativas del crecimiento de las plántulas en medios con 6-PP. B) Fotografías representativas del ápice de la raíz primaria y zona de diferenciación de plantas de *A. thaliana* que expresan *AtSUC2:GFP*. C) La gráfica muestra la media $\pm$ error estándar ($n=8$) de la intensidad de fluorescencia relativa. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p<0.05$). Barras de escala = 1 cm y 100 μ m.

7. 6. Regulación de la expresión de los transportadores SWEET de *A. thaliana* por los volátiles de *T. atroviride*

Para determinar la especificidad del efecto de los volátiles observado sobre la expresión de *AtSUC2*, se realizó un análisis de la expresión de los genes que codifican para los transportadores SWEET en *Arabidopsis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. En estos ensayos, se germinaron y crecieron plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 en cajas de Petri con medio MS 0.2x suplementado con 0.6% de sacarosa. Cada experimento incluyó 64 plantas de 10 días de edad provenientes de 8 réplicas independientes, a partir de las cuales que se extrajo el RNA, se determinó su integridad y

pureza mediante electroforesis y se cuantificó su concentración para utilizarse como molde en las reacciones de RT-PCR. Los resultados mostraron una expresión diferencial entre los genes de los diversos transportadores SWEET como el *AtSWEET6*, *AtSWEET8* y *AtSWEET9* cuya expresión fue nula en tanto follaje como raíz (Fig. 25A-C), lo que es consistente con los antecedentes en los donde dichos genes se detectaron específicamente en el gameto masculino, el tubo del polen y en el nectario de la flor, respectivamente (Guan *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2014)..

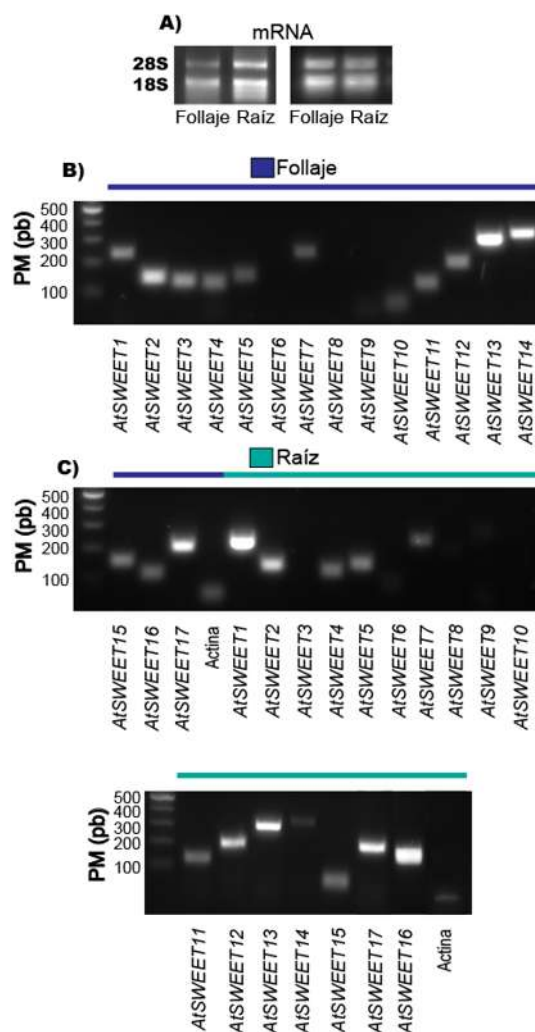


Figura 25. Expresión de los transportadores SWEET en follaje y raíz de *Arabidopsis*. A) Gel de agarosa al 1% que muestra la calibración de los RNA ribosomales por densitometría de la banda del 28S. B) Imagen representativa de los geles de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de *AtSWEET1-17* en follaje y C) raíz. PM: peso molecular de acuerdo al marcador de masa molecular indicado en pares de bases.

Por otra parte, *AtSWEET1*, *AtSWEET12* y *AtSWEET16* se expresaron preferentemente en la raíz, en tanto *AtSWEET13* y *AtSWEET14* presentaron una mayor expresión en el follaje. *AtSWEET3* y *AtSWEET10* solo se expresaron en el follaje y no en la raíz, mientras que *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET5*, *AtSWEET7*, *AtSWEET11*, *AtSWEET15* y *AtSWEET17* presentaron una expresión similar en ambos tejidos (Fig. 25A-C).

Con base en los resultados de los perfiles antes mencionados, se procedió a analizar la expresión de *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET10*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14*, y *AtSWEET17* en plantas silvestres de *Arabidopsis* inoculadas con *T. atroviride*, con el objetivo de comparar su expresión con plantas no inoculadas. Con esta finalidad, se llevó a cabo la extracción del RNA mensajero y la obtención de cDNA para la cuantificación de los cambios en la expresión de los genes con respecto a la actina como control interno mediante una PCR en tiempo real. Esta técnica permite la detección de los productos fluorescentes amplificados en cada ciclo de la reacción para la cuantificación del gen, a diferencia de la PCR punto final cuyo producto se compara en el ciclo final. Para que los datos fueran confiables, se obtuvo el RNA de dos réplicas biológicas independientes y la amplificación se realizó por triplicado. El efecto de los volátiles de *Trichoderma* sobre la expresión de cada uno de los genes *SWEET* seleccionados se determinó restando la amplificación obtenida del transportador *SWEET* de interés en el tejido control, al valor de la amplificación obtenida en el tejido con la presencia de los volátiles. Además, se tomó en cuenta la eficiencia de amplificación de cada *SWEET*, según lo descrito por Pfaffl (2001) cuyos valores se presentan en la Tabla suplementaria 1. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la expresión de los transportadores *AtSWEET10*, *AtSWEET11* y *AtSWEET12* en respuesta a los volátiles de *Trichoderma*, en relación al control. Sin embargo, *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET13*, *AtSWEET14*, y *AtSWEET17* si presentaron cambios en su expresión, obteniendo valores de 1.23 ± 0.0021 , 1.23 ± 0.0467 , 1.22 ± 0.0005 , 1.19 ± 0.0116 y 1.22 ± 0.0009 , respectivamente (Fig. 26A).

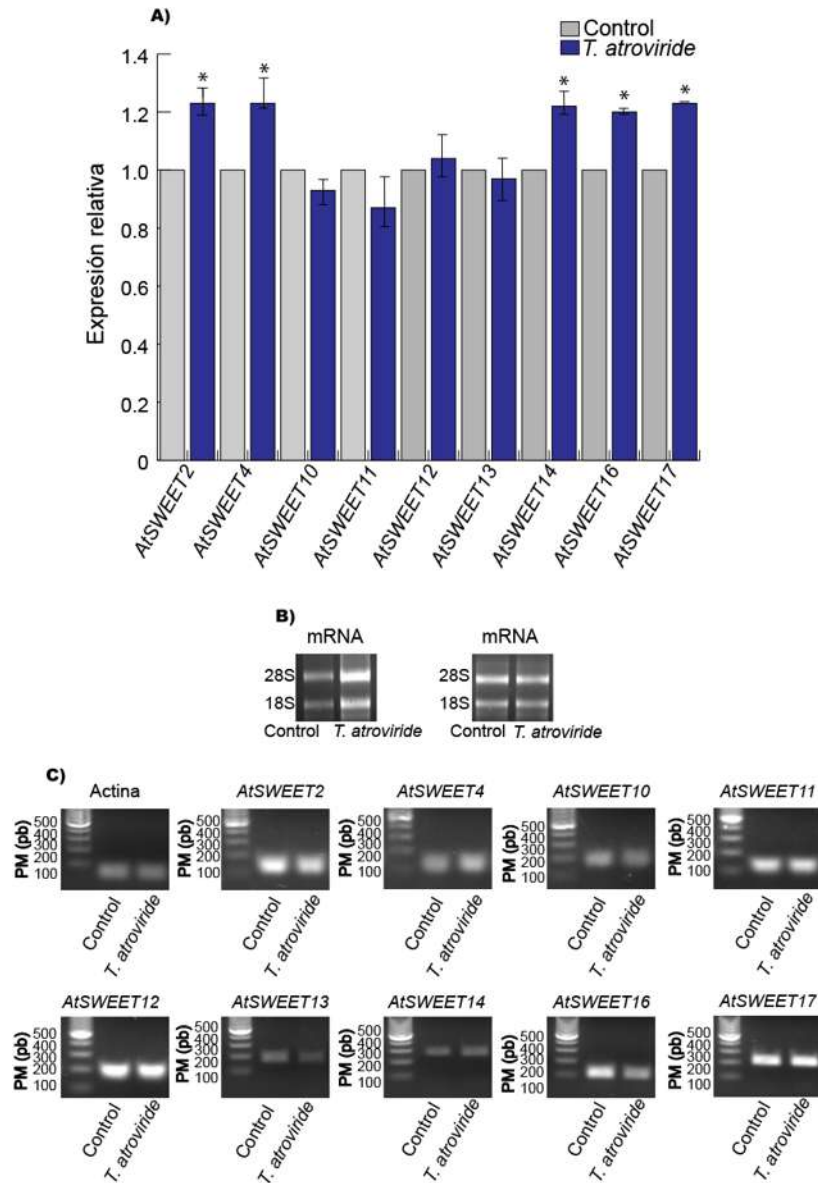


Figura 26. Efecto de los volátiles de *T. atroviride* sobre los niveles de expresión de los transportadores SWEET de *Arabidopsis*. A) Expresión relativa de AtSWEET2, AtSWEET4, AtSWEET10, AtSWEET11, AtSWEET12, AtSWEET13, AtSWEET14, AtSWEET16 y AtSWEET17, estandarizado al valor de actina. Se muestra el promedio y la desviación estándar. B) Gel de agarosa al 1% para la calibración del RNA ribosomal por densitometría de la banda del 28S. C) Imágenes representativas de los geles de agarosa al 2% revelando la presencia de los productos amplificados de los AtSWEETs. PM: peso molecular (pares de bases). Los asteriscos indican diferencia estadística por prueba de T-Student ($p < 0.05$).

La amplificación de cada uno de los cDNAs de los transportadores SWEET por medio de una PCR punto final permitió comprobar el resultado anterior (Fig. 26B-C). En conjunto, estos datos indicaron que los volátiles de *Trichoderma* influyen de manera diferencial y específica sobre la expresión de estos transportadores.

7. 7. Cuantificación de sacarosa y glucosa en *A. thaliana* durante la interacción con los volátiles de *T. atroviride*

El crecimiento y desarrollo de las plantas dependen de la energía proporcionada por los carbohidratos producidos en los tejidos fuente, así como su movilización hacia los tejidos consumidores. La observación de que los volátiles de *T. atroviride* aumentan la ramificación y la producción de biomasa de las raíces, en los ensayos previos de la interacción con la sacarosa foliar, permite plantear la hipótesis que los niveles de sacarosa y glucosa podrían estar incrementados. Por esta razón, se llevó a cabo la cuantificación de sacarosa y glucosa tanto en follaje como en la raíz de plántulas de *Arabidopsis* expuestas a los volátiles de *Trichoderma*. De acuerdo a los resultados obtenidos de los cromatogramas, el tiempo de retención para glucosa y sacarosa corresponden a 12.6 y 27.7 min, respectivamente. En el caso del follaje, en la condición control se observaron concentraciones cercanas a los dos millones para sacarosa y glucosa. En comparación con las plantas en interacción con los volátiles de *Trichoderma*, las abundancias de sacarosa y glucosa fueron el doble respecto al control. Las cuantificaciones de las abundancias con base en la curva estándar, mostraron valores de 1 μmol por gramo de peso fresco de glucosa en condición control y cerca de 3 μmoles por gramo de peso fresco con la presencia de los volátiles, un efecto similar a la sacarosa, que incrementó de 1.5 a 2.5 μmoles por gramo de peso fresco (Fig. 27A-B).

Para el caso de la raíz, se registró un incremento en la abundancia de la glucosa, cuyo valor en plantas bajo el efecto de los volátiles fue aproximadamente 7 veces mayor que la condición control. Aún a pesar de no existir un incremento en la concentración de la sacarosa, la cuantificación de la misma fue del doble en la interacción con los volátiles con respecto al control (2 a 4 μmoles por gramo de peso fresco) (Fig. 27C-D).

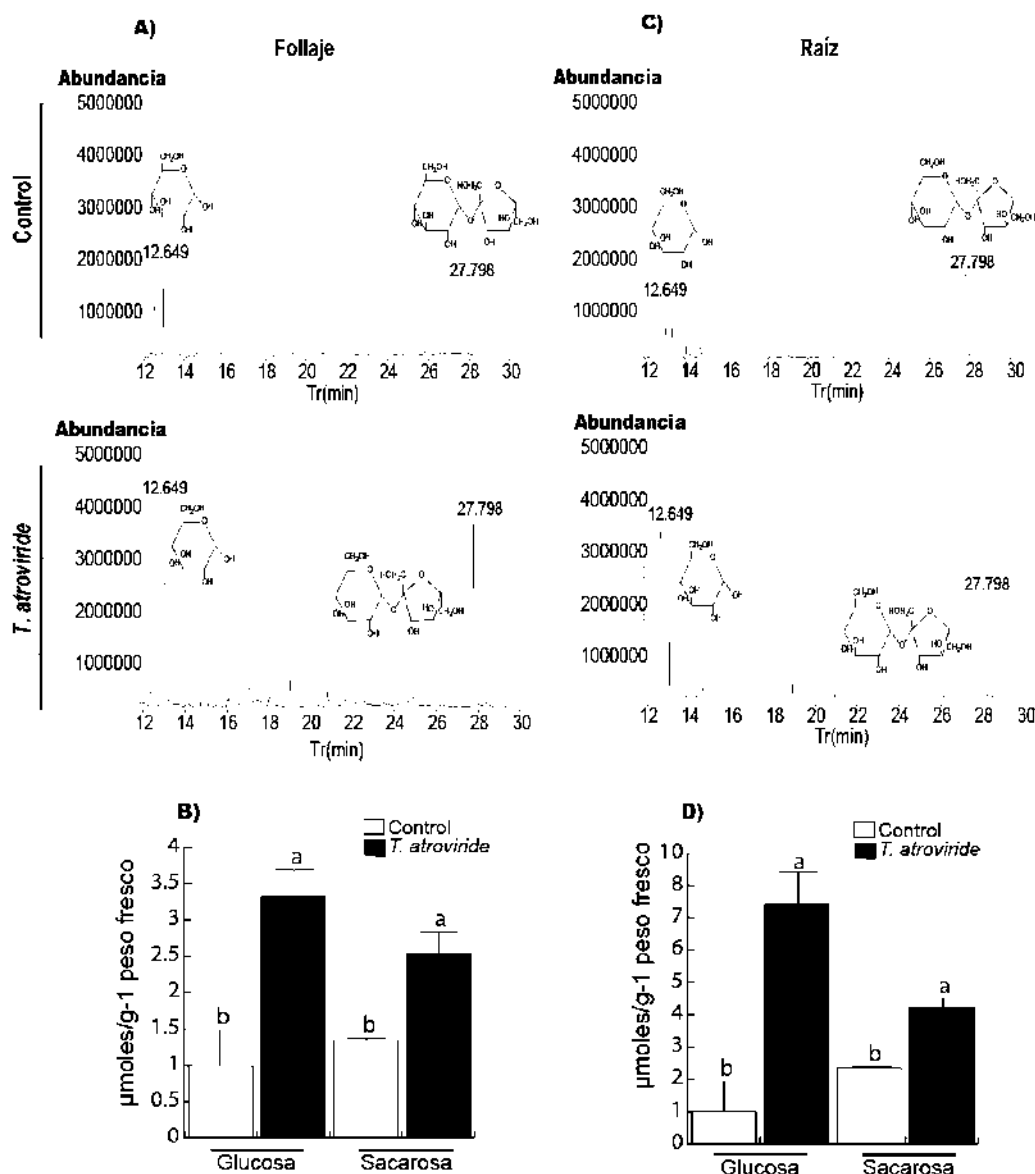


Figura 27. Determinación de sacarosa y glucosa en follaje y raíz de *Arabidopsis* en interacción con *T. atroviride*. A-B) Cromatogramas representativos y gráfica de valores de las cuantificaciones de sacarosa y glucosa en follaje y C-D) raíz. Los datos representan la media $\pm$ error estándar ($n=3$). Las letras indican diferencia estadística por prueba de T-Student ($p<0.05$). El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

Los valores obtenidos del contenido endógeno de sacarosa y glucosa en condición control fueron cercanos a los reportados en plántulas de 13 días de edad por Kunz y col. (2014). La concentración en μ moles por gramo de peso fresco de glucosa fue de 3 y 3.5 para

follaje y raíz respectivamente, y para el caso de sacarosa se obtuvo entre 3.5 y 6.4 μ moles por gramo de peso fresco también para follaje y raíz.

Estos resultados muestran que los volátiles de *Trichoderma* estimulan la concentración de sacarosa y glucosa en el follaje, azúcares que en gran parte son translocados hacia la raíz, donde además de servir para la proliferación celular, podrían incrementar el suministro de azúcares que se exudan a la rizósfera.

Para examinar esta posibilidad, plántulas silvestres de *Arabidopsis* de 4 día de edad, fueron expuestas a los volátiles de *T. atroviride* durante 4 días, posteriormente fueron transferidas a una placa de microtítulo y se incubaron durante 48 horas para la recolección de los exudados radiculares en 1 mL de agua desionizada estéril. Al llevar a cabo la cuantificación de los mismos por GC-MS, se obtuvieron abundancias cercanas a los 30000 para glucosa y de 15000 para sacarosa en plantas control. En tanto que en las plantas estimuladas con los volátiles se alcanzaron abundancias de más de 100000 para glucosa y cerca de 50000 para sacarosa. La cuantificación calculada fue de 7 μ moles de glucosa en condición control a más de 25 μ moles por ml de exudado en respuesta a los volátiles. Para el caso de la sacarosa, a pesar de mostrar un incremento en la abundancia, los valores obtenidos oscilaron entre 1 a 3 μ moles por ml de exudado para control y volátiles, respectivamente (Fig. 28A-B).

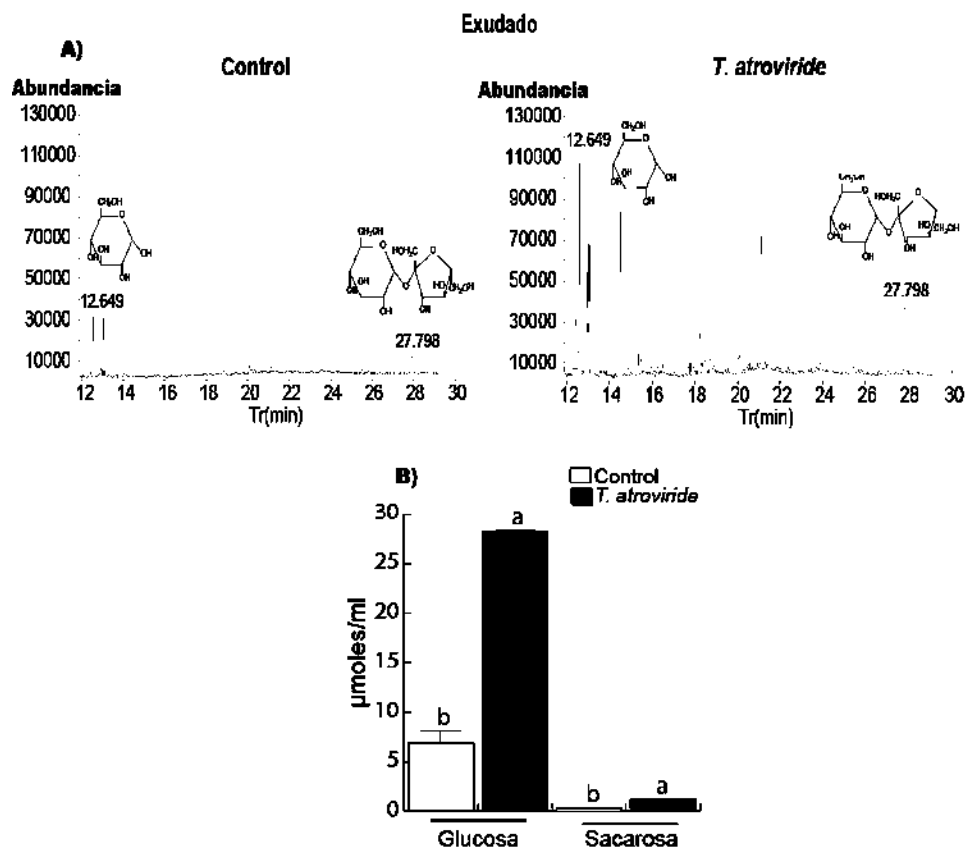


Figura 28. Determinación de sacarosa y glucosa en los exudados radiculares de *Arabidopsis* en interacción con los volátiles de *T. atroviride*. A-B) Cromatogramas representativos y gráfica de valores de las cuantificaciones de sacarosa y glucosa en 1 mL de exudado radicular. Los datos representan la media $\pm$ error estándar ($n=4$). Las letras indican diferencia estadística por prueba de T-Student ($p<0.05$). El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

7. 8. Efecto de la sacarosa y los volátiles de *T. atroviride* sobre la expresión de los genes que codifican para la sacarosa fosfato sintasa

El incremento en los niveles de sacarosa y glucosa en los exudados radiculares en respuesta a los volátiles de *T. atroviride*, sugieren un mayor transporte de los fotosintatos hacia la raíz para su aprovechamiento. Una enzima clave en la biosíntesis de sacarosa como en su conversión a almidón es la sacarosa-fosfato sintasa (SPS), cuyos genes se expresan diferencialmente en las plantas. Solís y col. (2017), generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* para el estudio de los promotores de cuatro genes que codifican isoformas de la

SPS fusionadas a los marcos de lectura abiertos de las proteínas GUS::GFP. De los cuatro genes, no se consideró analizar la expresión de *SPS4F* ya que la actividad de su promotor está relacionado con el desarrollo de órganos reproductivos. Se inició el estudio con *AtSPS1F* y *AtSPS2F* ya que ambas isoformas presentan el mismo patrón de expresión en la planta, tanto en hojas, como en estela y columnela de la raíz. Semillas de *Arabidopsis AtSPS1F:uidA:GFP* y *AtSPS2F:uidA:GFP* fueron sembradas y germinadas en el sistema ya descrito para la interacción con volátiles de *T. atroviride* y se comparó este tratamiento con el suministro de sacarosa foliar a una concentración de 4.8%. *SPS1F* incrementó su expresión en respuesta a sacarosa y los volátiles de *Trichoderma*, tanto en el meristemo apical de la raíz y en el haz vascular (Fig. 29A-B). Estos tratamientos no afectaron la expresión de *SPS2F* en las células de la columnela presentes el ápice de la raíz primaria o en la zona de diferenciación de la misma (Fig. 29C-D). Los resultados anteriores indican que la expresión de *SPS1F* depende en gran medida de las concentraciones de sacarosa endógenas; mientras que los volátiles producidos por *Trichoderma* como se demostró anteriormente, también elevarían los niveles endógenos de sacarosa en la planta. Además, la presencia de la enzima en este caso sobre la columnela, podría indicar una alta tasa de biosíntesis de almidón, como una medida para la adecuada orientación de las raíces por gravitropismo (Vitha *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2009). Esta detección gravitrópica se basa en la masa de amiloplastos presentes en la columnela de la raíz, aunque este aspecto necesita demostrarse experimentalmente.

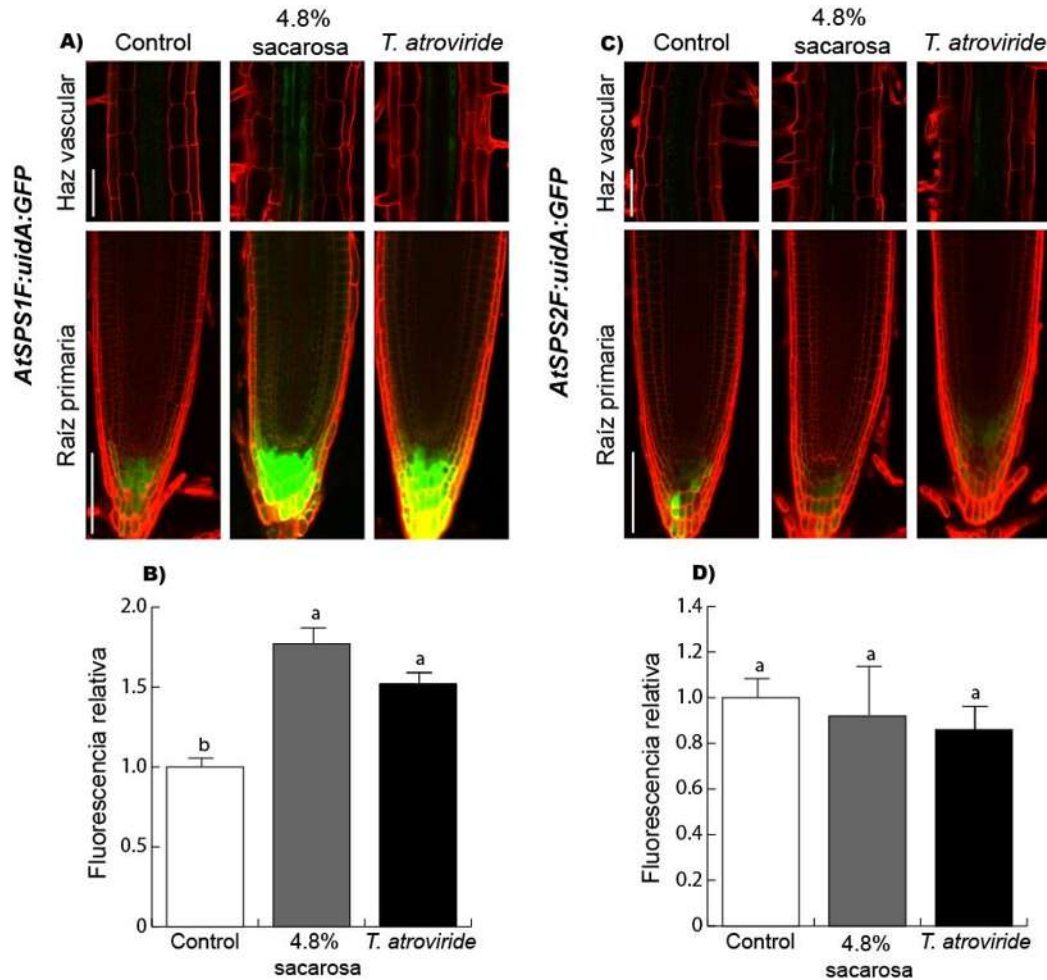


Figura 29. Expresión de los genes *SPS1F* y *SPS2F* de *Arabidopsis* en respuesta a la sacarosa y volátiles de *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del ápice de la raíz primaria y zona de diferenciación de plantas de *A. thaliana* que expresan *AtSPS1F:uidA:GFP* y C) *AtSPS2F:uidA:GFP*. B y D) Las gráficas muestran la media $\pm$ error estándar (n=8) de la intensidad de fluorescencia relativa para cada línea. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). Barras de escala = 100 μ m.

Cuando se compara la actividad del reportero GUS en plantas completas, para ambas líneas reporteras de *AtSPS1F* y *AtSPS2F* se observó una ligera expresión en hojas, meristemo apical, hipocotilo y ápice de la raíz primaria. Al evaluar el efecto de la sacarosa foliar y los volátiles de *Trichoderma*, se evidenció un incremento considerable de la actividad del reportero GUS en las hojas con respecto al control para *SPS1F* y *SPS2F* (Fig. 30A-B).

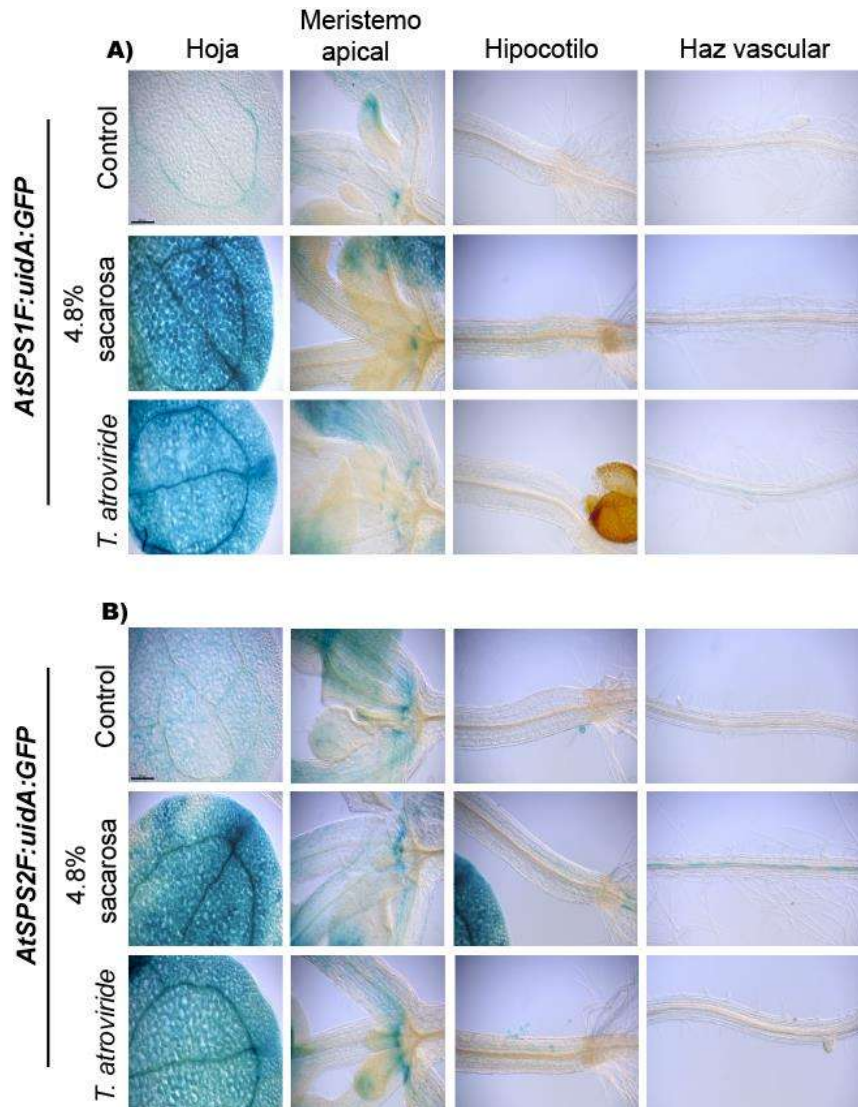


Figura 30. La sacarosa foliar y los volátiles de *T. atroviride* inducen la expresión de *SPS1F* y *SPS2F* en el follaje. A) Fotografías representativas de la actividad histoquímica del gen reportero GUS para *SPS1F* y B) *SPS2F* en hojas, meristemo apical, hipocotilo y zona de diferenciación de la raíz primaria en *A. thaliana* Barras de escala = 200 μ m.

También se decidió evaluar la expresión de *SPS3F* cuya expresión se ha reportado en el tejido vascular, y periciclo de la raíz, en este caso la sacarosa o los volátiles no incrementaron la expresión de GPF en la raíz, pero se indujo la actividad de GUS a través del cilindro vascular de la raíz, en la zona de formación de raíces laterales y en los pelos radiculares (Fig. 31A-C).

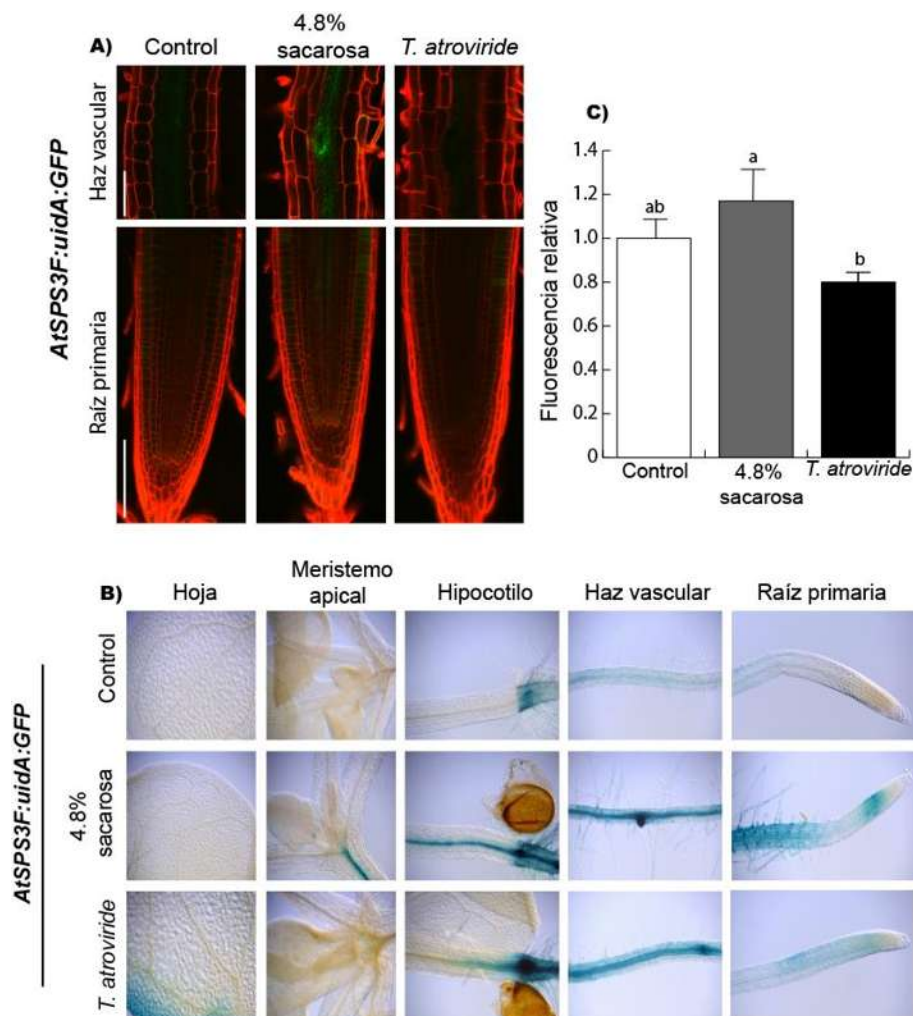


Figura 31. La sacarosa foliar y los volátiles de *T. atroviride* inducen la expresión de *SPS3F* en la raíz de *Arabidopsis*. Fotografías representativas de la actividad de los genes reporteros A) GFP y B) GUS por el promotor del gen *SPS3F*. C) La gráfica muestra la media $\pm$ error estándar (n=8) de la intensidad de fluorescencia relativa. Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). Barras de escala = 100 y 200 μm .

7. 9. Los volátiles de *T. atroviride* promueven la fotosíntesis a través del incremento en la concentración de clorofila en *Arabidopsis*

Los resultados anteriores de las líneas reporteras de las isoformas de la enzima SPS, sugieren que los volátiles de *Trichoderma* promueven la fotosíntesis, por lo que se procedió a comparar la respuesta de plantas silvestres y mutantes *chlorina-1* (*ch-1*), deficientes en la

producción de clorofila b que conlleva a la inestabilidad del complejo antena del fotosistema II (Murray y Kohorn, 1991; Ramel *et al.*, 2013). Los volátiles incrementaron la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales y la densidad de raíces, tanto en las plantas silvestres como en las mutantes *ch-1* en comparación con las plantas axénicas. No obstante, se observó que la magnitud del efecto inductor de los volátiles sobre la arquitectura radicular en *ch-1* fue menor en las mutantes (Fig. 32A-D).

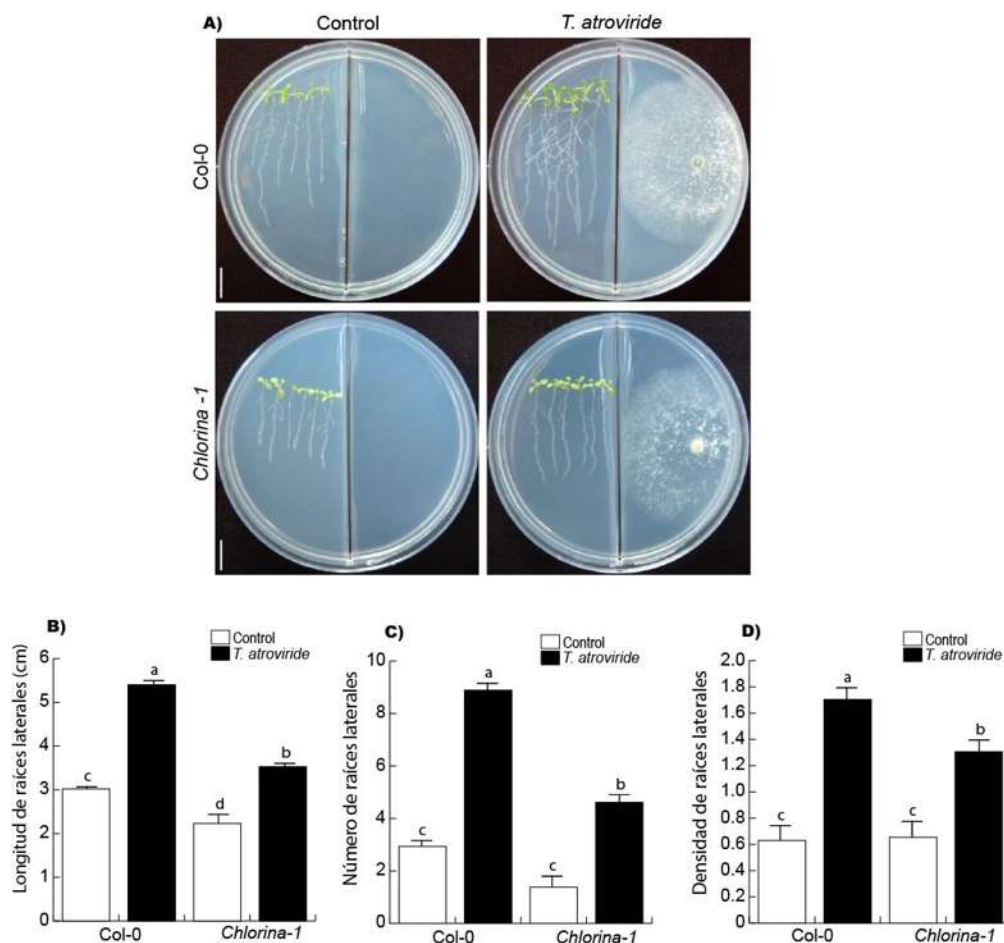


Figura 32. Arquitectura de la raíz de plantas silvestres y mutantes *chlorina-1* en respuesta a los volátiles de *T. atroviride*. A) Fotografías representativas del efecto de los volátiles de *T. atroviride* sobre *A. thaliana* (Col-0) y la mutante *ch-1* a los 4 días de interacción en medio MS 0.2x suplementado con 0.6% de sacarosa. B) Longitud de la raíz primaria, C) número de raíces laterales, D) densidad de raíces laterales. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=18). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis del contenido de clorofila para ambas líneas, donde se observó un mayor desarrollo de hojas y una mayor coloración verde en plantas expuestas a los volátiles de *Trichoderma* (Fig. 33A). Los valores obtenidos de clorofila por gramo de peso fresco fueron de 0.4 mg a 0.7 mg para las plantas silvestres y 0.27 a 0.5 mg para *ch-1* en condición control y bajo la presencia de volátiles, respectivamente (Fig. 33B). Estos valores de clorofila por gramo de peso fresco, representaron un incremento de casi el doble con respecto al control por efecto de los volátiles de *T. atroviride*, lo que establece el papel de dichos compuestos en la tasa fotosintética de las plantas.

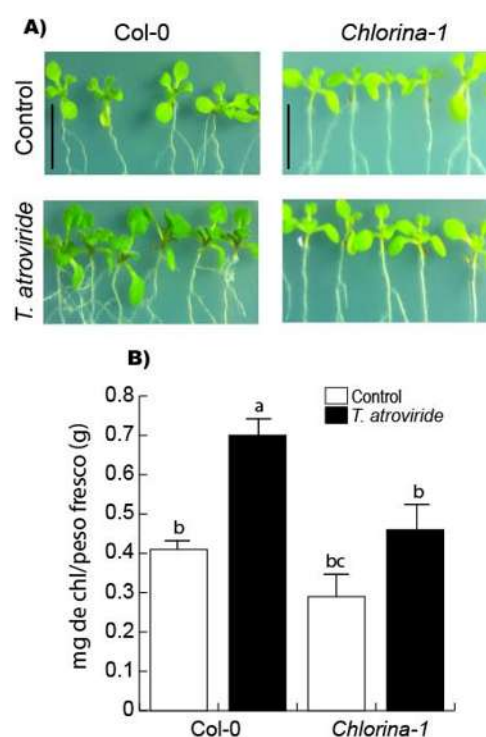


Figura 33. Los volátiles de *T. atroviride* incrementan la concentración de clorofila. A) Fotografías representativas de los volátiles de *Trichoderma* sobre el follaje de plantas silvestres de *A. thaliana* y mutantes *ch-1* a los 4 días de interacción en medio MS 0.2x suplementado con 0.6% de sacarosa. B) Gráfica de los valores en el contenido de clorofila. Los datos representan la media $\pm$ error estándar (n=6). Las letras indican diferencia estadística por prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra de escala representa 1 cm. El experimento fue realizado por duplicado con resultados similares.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las plantas son sensibles a los cambios en los factores bióticos y abióticos y ajustan sus programas de desarrollo mediante procesos celulares regulados por fitohormonas y por la disponibilidad de azúcares. La interacción que se establece con *Trichoderma* determina en gran medida el potencial de crecimiento y producción de biomasa en *Arabidopsis*, efecto inducido previo al contacto entre las hifas y las células corticales de la raíz, a través de un reconocimiento químico que involucra la emisión de compuestos volátiles (Castro-Sánchez, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Los mecanismos genéticos y moleculares por los cuales se inducen cambios en la arquitectura de la raíz y su relación con el metabolismo de carbono han sido poco estudiados, por lo que el uso de un sistema de cajas de Petri con dos compartimentos separados posibilita la exposición de plántulas de *Arabidopsis* a los volátiles de *T. atroviride* en condiciones variadas de suministro de sacarosa en la raíz y el follaje. Los resultados del presente estudio mostraron que la sacarosa promueve el incremento de biomasa de follaje, así como la ramificación del sistema radicular y confirman lo reportado por MacGregor y col. (2008), quienes propusieron que cuando una parte del follaje está en contacto con un medio rico en azúcares, éstos pueden captarse a través de los estomas para luego ser transportados a larga distancia por el floema. En esta vía, la sacarosa primero se mueve por difusión a hacia el apoplasto y luego se carga al floema para su distribución a los tejidos consumidores, incluyendo la raíz.

Los volátiles de *Trichoderma* tienen un efecto similar en el crecimiento al de la aplicación de azúcares, lo que permite suponer, que al menos en parte, esta bioestimulación ocurre por una mayor biosíntesis y translocación de fotosintatos hacia la raíz. Cuando se aplica una concentración alta de sacarosa y se exponen las plantas a los volátiles del hongo, se alcanza una respuesta máxima donde las plantas desarrollan sistemas radicales altamente ramificados. Al respecto, Rognoni y col. (2007) sugirieron que en etapas tempranas del desarrollo, las concentraciones de azúcares pueden tener efectos promotores o represores

sobre la expansión y proliferación celular en los cotiledones, en las hojas en desarrollo y en la raíz.

El apoplasto es el espacio intercelular delimitado por las membranas plasmáticas de las células. La sacarosa es expulsada desde las células del mesófilo hacia el apoplasto de los tejidos conductores por medio de los transportadores SWEET. Posteriormente, es importada al interior del floema a través de transportadores SUT, desde donde se mueve hacia los tejidos consumidores en función de su gradiente de concentración en el floema (Braun *et al.*, 2014). La acumulación de solutos en las nervaduras de las hojas puede regular de forma negativa a los transportadores mencionados. Sin embargo, el eflujo resultante está relacionado con la especificidad por el sustrato por parte de los transportadores y con la cinética de saturación, en la cual a medida que aumenta la concentración de la sacarosa que ha de translocarse, su velocidad de transporte alcanza un máximo (Geiger, 1975). Para conocer los transportadores implicados en la distribución de sacarosa y en la respuesta de la raíz a los volátiles de *Trichoderma*, se analizó la expresión específica de *AtSUC2*, cuya localización ocurre en las células acompañantes y en los elementos cribosos que se comunican a través de plasmodesmos. La migración de este transportador dentro del floema junto con el flujo de asimilados, se reportó por Imlau y col. (1999), hallazgo confirmado posteriormente por Stadler y col. (2005), quienes analizaron diversas fusiones traduccionales con la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor *AtSUC2* observando un transporte de la proteína desde el floema hacia el ápice de la raíz primaria.

En este trabajo, al analizar la expresión de *AtSUC2:GFP*, se observó una disminución en su expresión tanto por los volátiles de *Trichoderma* como por el suministro de sacarosa en diferentes órganos de la planta. Esta represión es muy evidente en la zona meristemática de la raíz primaria, en tanto que la limitación de fuente de carbono presentó el efecto contrario, promoviendo una alta expresión del transportador en el meristemo y en la zona de elongación. La regulación de la expresión de los transportadores SUT es complicada y no sigue un patrón común. Por ejemplo, Duan y col. (2014), demostraron que la expresión de *SUT4*, una proteína de carga al floema que se expresa y se transporta de manera similar a su homólogo funcional *SUC2*, aumentaba en hojas de plantas crecidas con altos niveles de CO₂ (780 ppm) en comparación con las expuestas a 370 ppm de CO₂; mientras que *SUC2*

mantenía sus niveles de expresión sin cambio. Los autores concluyeron que el CO₂ promueve la fotosíntesis y la translocación de fotosintatos dependiente de *SUT4*. Aunque en el presente trabajo no se investigó el papel de *SUT4* en las respuestas a volátiles o a la aplicación de sacarosa, no se descarta su posible participación en la distribución de azúcares durante las interacciones planta-hongo.

Los volátiles de *T. atroviride* promovieron el desarrollo de las hojas e incrementaron el número de primordios de raíces laterales. El aumento del tamaño de las hojas se debe en gran parte a la expansión de las células producto del aumento de su contenido citoplásmico, que genera un aumento del volumen y una mayor presión de turgencia, consecuentemente, un suministro adecuado de carbono en forma de sacarosa, o sus derivados glucosa o fructosa, proveen la energía para la biosíntesis y/o reconfiguración de la pared celular (Vanhaeren *et al.*, 2015). El suministro foliar de sacarosa causa un efecto sobre el crecimiento similar al de plantas con una alta tasa fotosintética, tal como ocurre con el estímulo atribuido a los volátiles de *Trichoderma* en *Arabidopsis* y otras especies de interés agronómico. Al respecto, Vargas y col. (2009), reportaron que la colonización de la raíz por *T. virens* incrementa la tasa fotosintética en plantas de maíz, lo que ocasiona cambios en el metabolismo del carbono. *Trichoderma* expresa invertasas extracelulares que permiten aprovechar fuentes de carbono en el aploplasto de los tejidos colonizados en la raíz, o bien la sacarosa presente en los exudados radiculares. Diversos estudios sobre los perfiles transcripcionales de *Trichoderma* durante la colonización de las raíces de las plantas, han mostrado la represión sobre la expresión de genes relacionados con el catabolismo de azúcares como las glucósido hidrolasas, quitinasas y celulasas, pero una inducción sobre genes de transporte de azúcares, y biosíntesis de pared celular, lo que indica una modificación del metabolismo del hongo durante establecimiento de la simbiosis, donde la fuente de carbono necesaria para el crecimiento del mismo, es aportada por las plantas (Samolski *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2012; Morán-Díez *et al.*, 2015; López-Ramírez, 2016). Esta interacción es similar a la descrita para los hongos micorrízicos, que dependen del suministro de azúcares por la planta hospedera para realizar sus funciones durante la simbiosis que se establece (Requena *et al.*, 2003; Délano-Frier y Tejeda- Sartorius, 2008; Bücking *et al.*, 2012).

Truernit y Sauer (1995), evaluaron la posible influencia de los carbohidratos en la expresión de *AtSUC2:GUS*. En este trabajo, la expresión de dicho transportador en hojas de

la roseta y raíz fue similar tanto en plantas crecidas en medio MS suplementado con 2% de glucosa, 2% de sacarosa y sin azúcares. Nosotros observamos que durante el desarrollo de las hojas jóvenes que actúan como órganos consumidores, la expresión de *SUC2* se presenta en el ápice de la hoja y en la lámina foliar, y conforme avanza el desarrollo de las hojas, la expresión se localiza en la nervadura principal y llega al peciolo. Esta regulación temporal del transportador indica que la dirección del flujo de asimilados depende de los niveles de sacarosa endógenos (Imlau *et al.*, 1999; Sauer, 2007).

En plantas expuestas a deficiencia de sacarosa se ha reportado una inhibición del crecimiento, junto con una rápida degradación de las proteínas citoplasmáticas y lípidos de membrana (Morkunas *et al.*, 2012; Contento *et al.*, 2004). Se realizaron experimentos en que plántulas de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en medios sin suministro de sacarosa, y éstas presentaron una disminución del crecimiento. En contraste, el efecto bioestimulante de los volátiles de *Trichoderma* donde se incrementó el crecimiento con la aplicación de sacarosa, glucosa y/o fructosa. Bajo deficiencia de sacarosa, el ápice de la raíz primaria presentó una marcada reducción de las zonas de división y elongación celular, en este caso se potenció la expresión de *AtSUC2:GFP* en ambas zonas. Dicho resultado podría explicarse por la importancia que reviste el meristemo radical, cuyo funcionamiento se ha asociado estrechamente con la adaptación de las plantas al estrés biótico y abiótico, así como durante las transiciones del desarrollo que implican un balance en el crecimiento de los tejido fuente y consumidores (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013).

Como ha sido mencionado, la 6-PP es el volátil mayoritario producido por *T. atroviride*. Su aplicación en la planta afectó la expresión de *SUC2* tanto en el ápice como en el haz vascular de la raíz primaria, de manera dependiente de la concentración. Conforme se incrementaba la concentración de 6-PP, se observó una deslocalización de *SUC2* en el floema, lo cual correlacionó con su ausencia en la punta de la raíz. Lo anterior corrobora lo reportado por Garnica-Vergara y col. (2015), donde concentraciones mayores a 100 μM de 6-PP afectaron el crecimiento de la raíz primaria, y promovieron el desarrollo de las raíces laterales. Es posible que la 6-PP, a través de la regulación de la expresión de *SUC2* pueda actuar como un elemento de reconocimiento que es parte del perfil de volátiles, aunque su posible participación en el desarrollo de las raíces laterales queda por esclarecer.

Algunos de los mecanismos por el cual las plantas regulan la exudación radicular son: la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la etapa específica de desarrollo de la planta y el reclutamiento de microorganismos benéficos como rizobacterias y hongos simbioses a través de metabolitos secundarios y la liberación de carbohidratos y aminoácidos que sirven como fuente de carbono para los mismos (Chaparro *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Sin embargo, los microorganismos de la rizósfera también influyen en la exudación radicular de la planta. Estudios recientes han mostrado que la colonización de hongos micorrízicos pueden cambiar la exudación de la raíz, incrementando las secreciones de nitrógeno, compuestos fenólicos, giberelinas y azúcares totales (Jones *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2013). El incremento en las concentraciones de sacarosa y glucosa en los exudados radiculares por efecto de los volátiles de *Trichoderma*, se asemeja a lo observado por Hage-Ahmed y col. (2013), donde el efecto de la inoculación con *Glomus mosseae* incrementó las concentraciones de azúcares y ácidos orgánicos en los exudados radiculares de tomate, y de manera similar, la inoculación con *Rhizobium spp.* también aumentó la presencia de azúcares totales en exudados de arroz (Naher *et al.*, 2008). El mecanismo de liberación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como los azúcares en los exudados radiculares es a través de un proceso de difusión pasiva, es decir depende de la permeabilidad de la membrana, la polaridad de los compuestos y pH citosólico, sin embargo, en algunos casos también se requiere de transportadores específicos para su liberación o reabsorción (Huang *et al.*, 2014).

Los transportadores SWEET mostraron patrones de expresión diferenciales en la raíz y en el follaje. Algunos antecedentes indican que *AtSWEET10*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12* y *AtSWEET16* se expresan en la vasculatura de las hojas y *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET17*, *AtSWEET13* y *AtSWEET14* se expresan tanto en la raíz como en el follaje. El análisis de la expresión de esta familia de genes realizado por RT-qPCR cuantitativo, mostraron que *T. atroviride* modifica la expresión de *AtSWEET2*, *AtSWEET4*, *AtSWEET13*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*. La mayoría de estos genes se expresan en la raíz y algunas de sus funciones principales, son el transporte de hexosas dentro de las vacuolas y la liberación de sacarosa en la rizósfera (Klemens *et al.*, 2013; Chen, 2014; Chen *et al.*, 2015b). La redundancia de los genes también influyen sobre la regulación diferencial de los volátiles de *Trichoderma*; mutantes de *AtSWEET4*, presentan un incremento en los transcritos de *AtSWEET2*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*, como una compensación ante la pérdida de función

de *AtSWEET4* (Liu *et al.*, 2016). De igual forma, *AtSWEET13* aumentó su expresión en la doble mutante *Atsweet11;12*, lo que indica que ante la ausencia de *AtSWEET11* y *AtSWEET12*, *AtSWEET13* realiza su función de carga apoplásmica del floema (Kanno *et al.*, 2013; Chen, 2014). Aunado a esto, Carvene-García (2014), también observó un efecto de regulación de la expresión de *ZmSWEETs* en maíz por la inoculación de *T. asperellum* y la infección con *Fusarium verticillioides*. De igual forma, Palacios-Vargas (2016) mostró el mismo efecto de regulación del efecto de *T. asperellum* sobre la expresión de los *ZmSWEET* en raíces embrionarias y post-embrionarias de maíz.

Además de la exudación radicular, el microbioma del suelo puede influir sobre el metaboloma de las plantas (Badri *et al.*, 2013). La mayor acumulación de sacarosa en los tejidos de *Arabidopsis* en respuesta a *Trichoderma* correlaciona con el incremento de la expresión de dos genes que codifican la sacarosa-fosfato sintasa (SPS). Esta enzima cataliza una de las etapas de la síntesis de sacarosa en las plantas. El genoma de *Arabidopsis* contiene cuatro genes *SPS* (*SPS1F*, *SPS2F*, *SPS3F* y *SPS4F*), y de acuerdo con las construcciones de las líneas transgénicas generadas por Solís y col. (2017) dos genes presentan expresión similar en hojas y raíz, mientras que en los restantes lo hacen en la raíz y en estructuras reproductivas en desarrollo. Nuestros resultados demostraron que los volátiles de *T. atroviride* incrementan la expresión de *SPS1F* y *SPS2F* en la hojas y en la raíz. Esto sugiere una posible participación de las isoformas de esta enzima codificadas, en la síntesis de sacarosa o en la acumulación de almidón, un compuesto de reserva que se acumula en la cofia de la raíz. Una alta actividad de la SPS en la raíz podría contribuir con el incremento de la concentración de sacarosa en el meristemo, e incluso en su exudación a la rizósfera través de un mecanismo de difusión simple, lo que explicaría también en parte el incremento de glucosa y sacarosa en los exudados radiculares que ocurre en presencia de los volátiles del hongo.

La mayoría del carbono fijado en las hojas por el proceso de fotosíntesis se utiliza para la síntesis de sacarosa y almidón en el citoplasma y cloroplastos, respectivamente. Sin embargo, el flujo de carbono se dirige preferentemente a la síntesis de sacarosa cuando las tasas de producción de triosas-fosfato son bajas debido a los bajos niveles intracelulares de CO₂. Al contrario, cuando los niveles son altos, la síntesis de sacarosa alcanza una saturación que conlleva a la síntesis de almidón (Sun *et al.*, 2011). Esto se ha evidenciado en plantas transgénicas de maíz, tomate, tabaco y *Arabidopsis* que sobreexpresan genes de la *SPS*, en

las cuáles se incrementan las concentraciones de sacarosa y almidón (Baxter *et al.*, 2003). La mutante *chlorina-1* (*ch-1*), está afectada en la producción de clorofila b, en la captación de luz y en el ensamble de las proteínas en los complejos antena, y la estabilidad de los complejos fotosintéticos, principalmente el fotosistema II (PSII), por lo que tiene una capacidad fotosintética disminuida que correlaciona con hojas cloróticas y un retraso en el crecimiento (Eggink *et al.*, 2001). Cuando se compara el crecimiento de plantas silvestres y las mutantes *ch-1*, en ambos genotipos se estimularon la longitud de la raíz primaria, así como el número y la densidad de raíces laterales en respuesta a los volátiles de *Trichoderma*, en tanto que dicha bioestimulación disminuyó en las mutantes. Estos resultados concuerdan con la cuantificación de clorofila y con estudios previos en los que se ha reportado que los volátiles fúngicos incrementan el contenido de clorofila (Lee *et al.*, 2015; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017), lo que indica un posible mecanismo de regulación de los volátiles sobre la biosíntesis de clorofila a o xantofilas. Voigt y col. (2010) han relacionado al ácido abscísico (ABA) con el proceso de fotosíntesis, en tanto Kottb y col. (2015), demostraron que los volátiles *T. asperellum* IsmT5 incrementan los niveles de ABA en plantas, por lo que se anticipa una correlación importante de los niveles de ABA que se producen durante las interacciones microbianas con la biosíntesis de clorofila.

Con base en los resultados de este trabajo, se propone un modelo para explicar la forma en que los volátiles de *T. atroviride* influyen sobre el metabolismo del carbono en *Arabidopsis*. En la Figura 34, se plantea que los volátiles de *Trichoderma* liberados en la rizósfera, previo a la colonización de las raíces por el hongo, son percibidos por la planta, la cual incrementa la síntesis de la clorofila, activan la expresión de la sacarosa-fosfato sintasa y promueven el transporte de sacarosa hacia la raíz a través del transportador SUC2, parte de este azúcar podría enriquecer la rizósfera a partir de la liberación de glucosa y sacarosa a través de los exudados radiculares y algunos transportadores de tipo SWEET, los cuales serían utilizados por los microorganismos para su nutrición.

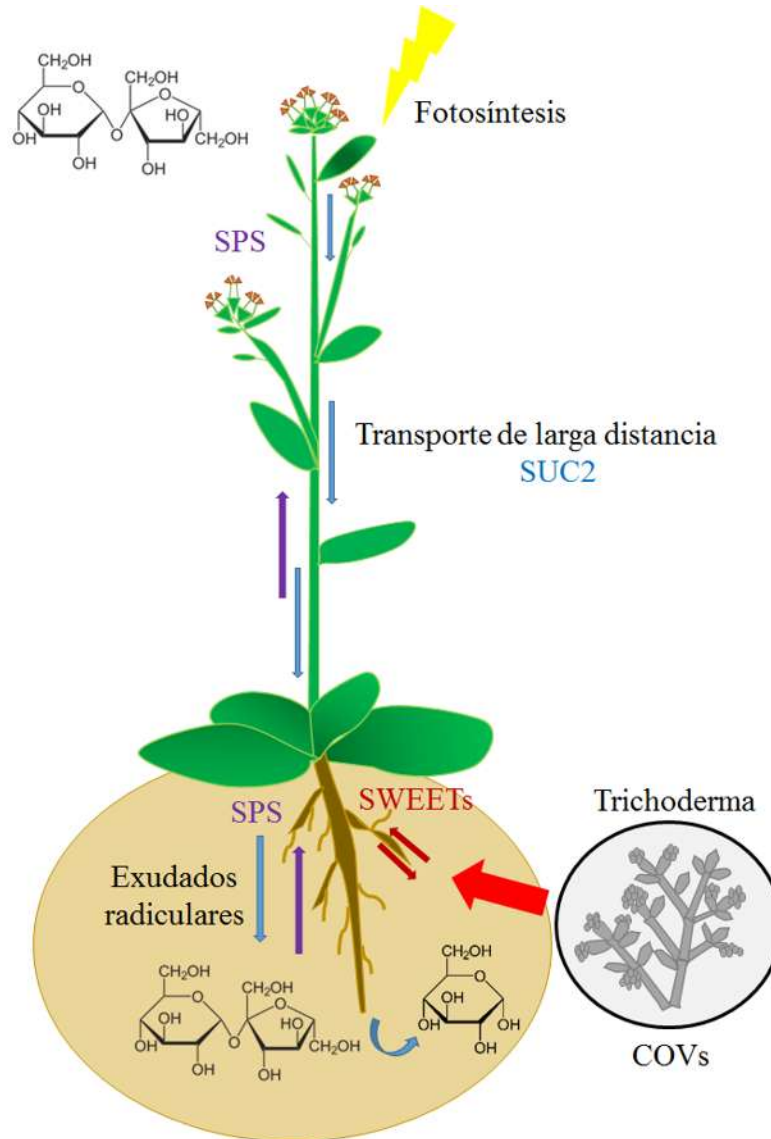


Figura 34. Modelo que explica la influencia de los volátiles de *T. atroviride* sobre la regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Se propone que los volátiles incrementan la síntesis de la clorofila, activan la expresión de la sacarosa-fosfato sintasa y promueven el transporte de sacarosa hacia la raíz a través del transportador SUC2 y diferentes transportadores de tipo SWEET, parte de este azúcar podría enriquecer la rizósfera a partir de la liberación de glucosa y sacarosa por medio de los exudados radiculares.

9. LITERATURA CITADA

- Atanasova L., Le Crom S., Gruber S., Couplier F., Seidl-Seiboth V., Kubicek C.P., Druzhinina I.S.** (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC Genomics* 14:121-135.
- Azcón-Bieto J., Talon M.** (1993). Fisiología y bioquímica vegetal. McGraw Hill–Interamericana de España. Madrid: 581 p.
- Badri D.V., Loyola-Vargas V.M., Broeckling C.D., De-la-Peña C., Jasinski M., Santelia D. Martinoia E., Sumner L.W., Banta L.M., Stermitz F., Vivanco J.M.** (2008). Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiol.* 146:762–771.
- Badri D.V., Vivanco J.M.** (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32:666–681.
- Badri Badri D.V., Zolla G., Bakker M.G., Manter D.K., Vivanco J.M.** (2013). Potential impact of soil microbiomes on the leaf metabolome and on herbivore feeding behavior. *New Phytol.* 1:264-273.
- Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S.Y., Vivanco J.M.** (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Barcelo-Coll J., Sabater B., Sánchez R., Rodrigo G.** (1983). Fisiología Vegetal. Ediciones Pirámide. Madrid, España. 813pp.
- Baudoin E., Benizri E., Guckert A.** (2003). Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 35:1183–1192.
- Baxter C.J., Foyer C.H., Turner J., Rolfe S.A., Quick W.P.** (2003). Elevated sucrose-phosphate synthase activity in transgenic tobacco sustains photosynthesis in older leaves and alters development. *J. Exp Bot.* 54:1813-1820.
- Benitez-Alfonso Y., Faulkner C., Pendle A., Miyashima S., Helariutta Y., Maule A.** (2013). Symplastic intercellular connectivity regulates lateral root patterning. *Dev. Cell* 26:136-147.
- Bielmelt S., Sonnewald U.** (2006). Plant-microbe interactions to probe regulation of plant carbon metabolism. *J. Plant Physiol.* 163:307-318.

- Boldt K., Pörs Y., Haupt B., Bitterlich M., Kühn C., Grimm B., Franken P.** (2011). Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *J. Plant Physiol.* 168:1256-1263.
- Braun D.M., Wang L., Ruan Y.L.** (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J. Exp. Bot.* 65:1713-1735.
- Broeckling C.D., Broz A.K., Bergelson J., Manter D.K., Vivanco J.M.** (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Appl Environ Microbiol.* 74:738–744.
- Bücking H., Liepold E., Ambilwade P.** (2012). The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. Licensee *InTech* open access chapter 4 (<http://dx.doi.org/10.5772/52570>).
- Carvene-García R.D.** (2014). Clonación molecular y perfil de expresión del RNAm de una transportador de azúcares tipo *SWEET* durante la infección del maíz por los hongos *Trichoderma asperellum* y *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de química UNAM, Ciudad de México 105p.
- Castro-Sánchez D.** (2013). Participación de la vía MAPK de *Trichoderma atroviride* en la interacción con *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Maestría en ciencias en Biología experimental. IIQB-UMSNH Michoacán 58p.
- Celenza J.L., Grisafi P.L., Fink G.R.** (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9:2131-2142.
- Chacón P.D., Martínez B.E.** (2007). Factores involucrados en la distribución de azúcares en las plantas vasculares: comunicación entre los tejidos fuente y tejidos demanda. *J. of Ed. Biochem.* 26:99-105.
- Chang A.B., Lin R., Studley W.K., Trand M.C.V.** (2004). Phylogeny as a guide to structure and function of membrane transport proteins. *Mol. Mem. Biol.* 21:171-181.
- Chaparro J.M., Badri D.V., Bakker M.G., Sugiyama A., Manter D.K., Vivanco J.M.** (2013). Root Exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* 8(8): 10:1371-1381.

- Chardon F., Bedu M., Calenge F., Klemens P.A., Spinner L., Clement G., Chietera G., L  ran S., Ferrand M., Lacombe B., Loudet O., Dinant S., Bellini C., Neuhaus H.E., Daniel-Vedele F., Krapp A.** (2013). Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 23:697–702.
- Chen L.Q., Hou B.H., Lalonde S., Takanaga H., Hartung M.L., Qu X.Q., Guo W.J., Kim J.G., Underwood W., Chaudhuri B., Chermak D., Antony G., White F.F., Somerville S.C., Mudgett M.B., Frommer W.B.** (2010). Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468:527–532.
- Chen L.Q., Qu X.Q., Hou B.H., Sosso D., Osorio S., Fernie A.R., Frommer W.B.** (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335:207–211.
- Chen L.Q.** (2014). SWEET sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytol.* 4:150–1155.
- Chen L.Q., Lin X.Q.Q., Sosso D., McFarlane H.E., Londo  o A., Samuels A.L., Frommer W.B.** (2015a). A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell* Online DOI: 10.1105/tpc.114.134585.
- Chen H.Y., Huh J.H., Yu Y.C., Ho L.H., Chen L.Q., Tholl D., Frommer W.B., Guo W.J.** (2015b). The *Arabidopsis* vacuolar sugar transporter SWEET2 limits carbon sequestration from roots and restricts *Pythium* infection. *Plant J.* 83:1046–1058.
- Chong J., Piron M.C., Meyer S., Merdinoglu D., Bertsch C., Mestre P.** (2014). The SWEET family of sugar transporters in grapevine: VvSWEET4 is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* 65:6589– 6601.
- Claydon N., Allan M., Itanson J.R., Avent A.G.** (1987). Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88:503–513.
- Collins P. R., Halim F. A.** (1972). Characterization of the major aroma constituents of the fungus *Trichoderma viride*. *J. Agric. Food Chem.* 20:437–438.
- Contento L.A., Kim S.J., Bassham C.D.** (2004). Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to sucrose starvation. *Plant Physiol.* 135:2330–2347.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L.I., 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.

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

Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L.I., Del Val E., Larsen J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:4, fiw036.

Corbesier L., Bernier G., Perilleux C. (2002). C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 43:684–88.

Crookshanks M., Taylor G., Dolan L. (1998). A model system to study the effects of elevated CO₂ on the developmental physiology of roots: The use of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 49:593–597.

Délano-Frier J.P., Tejeda-Sartorius M. (2008). Unraveling the network: Novel developments in the understanding of signaling and nutrient exchange mechanisms in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Signa. Behav.* 11:936-944.

Doidy J., Grace E., Kühn C., Simon-Plas F., Casieri L., Wipf D. (2012). Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends Plant Sci.* 7:413-422.

Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. Scheres B. (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.

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

Duan Z., Homma A., Kobayashi M., Nagata N., Kaneko Y., Fujiki Y., Nishida I. (2014). Photoassimilation, assimilate translocation and plasmodesmal biogenesis in the source leaves of *Arabidopsis thaliana* grown under an increased atmospheric CO₂ concentration. *Plant Cell Physiol.* 55:358-69.

Eggink L.L., Park H., Hooper J.K. (2001). The role of chlorophyll b in photosynthesis: Hypothesis. *BMC Plant Biol.* 1:2-9.

- Eom J.S., Chen L.Q., Sosso D., Julius B.T., Lin I.W., Qu X.Q., Braun D.M., Frommer W.B.** (2015). SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25:53–62.
- Freixes S., Thibaud M.C., Tardieu F., Muller B.** (2002). Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ.* 25: 1357–1366.
- Garnica-Vergara A., Barrera-Ortíz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L.I., Ruíz-Herrera L.F., López-Bucio J.** (2015). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209:1496-1512.
- Geiger D.R.** (1975) Phloem loading. In: Encyclopedia of plant physiology, transport in plants. Phloem transport (Ed. By M.H. Zimmermann and J.L. Milburn), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 395-431 pp.
- Guan Y.F., Huang X.Y., Zhu J., Gao J.F., Zhang H.X., Yang Z.N.** (2008). RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147:852–863.
- Guo W.J., Nagy R., Chen H.Y., Pfrunder S., Yu Y.C., Santelia D., Frommer W.B., Martinoia E.** (2014). SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol.* 164:777–789.
- Gupta A., Kaur N.** (2005). Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30:761–776.
- Hage-Ahmed K., Moyses A., Voglgruber A., Hadacek F., Steinkellner S.** (2013). Alterations in root exudation of intercropped tomato mediated by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *J. Phytopatol.* 161:763-773.
- 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., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M.** (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:43-56.

- Hedrich R., Sauer N., Neuhaus H.E.** (2015). Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 25:63–70.
- Hermans C., Hammond J.P., White P.J., Verbruggen N.** (2006). How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci.* 11:1360–1385.
- Huang X-F., Chaparro J.M., Reardon K.F., Zhang R., Shen Q., Vivanco J.L.** (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany* 92: 267–275.
- Hung R., Lee S., Bennett W.J.** (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol.* 6:19-26.
- Imlau A., Truernit E., Sauer N.** (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell* 11:309–322.
- Jaeger C.H., Lindow S.E., Miller W., Clark E., Firestone M.K.** (1999). Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2685-2690.
- Jelén H., Błaszczyk L., Chelkowski, J., Rogowicz K., Strakowska J.** (2014). Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol. Prog.* 13:589–600.
- Jones D.L., Hodge A., Kuzyakov Y.** (2004). Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 3:459–480.
- Kanchiswamy C.N., Malnoy M., Maffei M.E.** (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 6:151-174.
- Kanno Y., Oikawa T., Chiba Y., Ishimaru Y., Shimizu T., Sano N., Koshiba T., Kamiya Y., Ueda M., Seo M.** (2016). AtSWEET13 and AtSWEET14 regulate gibberellin-mediated physiological processes. *Nature Comm.* 7 no. 13245.
- Kircher S., Schopfer P.** (2012). Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:1217–11221.
- Klemens P.A.W., Patzke K., Deitmer J.W., Spinner L., Le H., Bellini C., Bedu M., Chardon F., Krapp A., Neuhaus E.** (2013). Overexpression of the vacuolar sugar carrier

- AtSWEET16 modifies germination, growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 163:1338–1352.
- Koch K.** (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:235-46.
- Kottb M., Gigolashvili T., Großkinsky K.D., Piechulla B.** (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front Microbiol.* 6: 995- 1009.
- Krafczyk I., Trolldenier G., Beringer H.** (1984). Soluble root exudates in maize: Influence of potassium supply and rhizosphere microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 16:315-322.
- Kunz S., Pesquet E., Kleczkowski L.A.** (2014). Functional Dissection of Sugar Signals Affecting Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 9:e100312.
- Lee S., Hung R., Yap M., Bennett J.W.** (2015). Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Arch. Microbiol.* 197:723–727.
- Lee S., Yap M., Behringer G., Hung R., Bennett J.W.** (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.* 3:7-21.
- Lemoine R., Camera S.L., Atanassova R., Dédaldéchamp F., Allario T., Pourtau N., Bonnemain J.L., Laloi M., Coutos-Thévenot P., Maurousset L., Faucher M., Girousse C., Lemonnier P., Parrilla J., Durand M.** (2013). Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Front. Plant Sci.* 4:272-293.
- Lichtenthaler H.** (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods enzymol.* 148:350-382.
- Lin W.I., Sosso D., Chen L.Q., Gase K., Kim S.G., Kessler D., Klinkenberg M.P., Gorder K.M., Hou B.H., Qu W.Q, Carter J.C., Baldwin T.I., Frommer W.B.** (2014). Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. *Nature* 508:546–549.
- Liu X., Zhang Y., Yang C., Tian Z., Li J.** (2016). AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. *Sci Rep.* 6:24563.
- López-Ramírez F.** (2016). Papel de las NADPH oxidasas en el control biológico por *Trichodema atroviride*. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología de plantas. CINVESTAV-IPN, Unidad de genómica avanzada. Irapuato, Guanajuato. 75p.

- MacGregor R.D., Deak I.K., Ingram A.P., Malamy E.J.** (2008). Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell* 10:2643–2660.
- Mahmood T., Voitke M., Gimmler H., Kaiser W.M.** (2002). Sugar exudation by roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth] is strongly affected by the nitrogen source. *Planta* 214:887–894.
- Manck-Götzenberger J., Requena N.** (2016) Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato *SWEET* sugar transporter family. *Front. Plant Sci.* 7:487-511.
- Meier I.C., Avis P.G., Phillips R.P.** (2013). Fungal communities influence root exudation rates in pine seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83:585–595.
- Mishra B. S., Singh M., Aggrawal P., Laxmi A.** (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS ONE* 4: e4502.
- Morán-Diez M.E., Trushina N., Lamdan N.L., Rosenfelder L., Mukherjee P.K., Kenerley C.M., Horwitz B.A.** (2015). Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. *BMC Genomics* 16:8-23.
- Morgan J.A.W., Bending G.D., White P.J.** (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J Exp Bot.* 56:1729–1739.
- Morkunas I., Borek S., Formela M., Ratajczak L.** (2012). Plant responses to sugar starvation. Chapter 19 Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology licensee InTech 30 p.
- Murashige T., Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473–497.
- Murray D.L., Kohorn B.D.** (1991). Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* homozygous for the *chl-1* locus lack chlorophyll b, lack stable LHCPII and have stacked thylakoids. *Plant Mol Biol.* 16:71-79.
- Naher U.A., Radziah O., Halimi M.S., Shamsuddin Z.H., Mohd Razi I.** (2008). Effect of inoculation on root exudates carbon sugar and amino acids production of different rice varieties. *Research J. Microbiol.* 3:580-585.

- Neuhaus H.E.** (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Lett.* 581:2223–2226.
- Nieto-Jacobo M.F., Steyaert J.M., Salazar-Badillo F.B., Nguyen D.V., Rostás M., Braithwaite M., De Souza J.T., Jimenez-Bremont J.F., Ohkura M., Stewart A., Mendoza-Mendoza A.** (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Front. Plant Sci.* 9:102-120.
- Oparka K.J., Santa-Cruz S.** (2000). The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:323-347.
- Orlando D.A., Brady S.M., Koch J.D., Dinneny JR., Benfey P.N.** (2009). Manipulating large-scale *Arabidopsis* microarray expression data: identifying dominant expression patterns and biological process enrichment. *Methods Mol. Biol.* 553:57-77.
- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J.** (2009) The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4:701–712.
- Palacios Vargas G.I.** (2016). Identificación de los transportadores *SWEET* de las raíces de plántulas de maíz y su regulación por la infección con *Trichoderma asperellum*. Tesis de Licenciatura Facultad de química UNAM, Ciudad de México 89p.
- Pfaffl M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 9:2003-2009.
- Pelagio-Flores R., Esparza-Reynoso S., Garnica-Vergara A., López-Bucio J., Herrera-Estrella F.** (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Front Plant Sci.* 8: 822.
- Ramel F., Ksas B., Akkari E., Mialoundama A.S., Monnet F., Krieger-Liszkay A., Ravanat J.L., Mueller M.J., Bouvier F., Havaux M.** (2013). Light-induced acclimation of the *Arabidopsis* chlorina1 mutant to singlet oxygen. *Plant Cell* 25:1445-1462.
- Reinders A., Sivitz A.B., Ward J.M.** (2012). Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Front. Plant Sci.* 3:22-34.
- Reinhardt D., Kuhlemeier C.** (2002). Plant architecture. *EMBO Rep.* 3:846-851.
- Reino J.L., Guerrero R.F., Hernández-Galan R., Collado I.G.** (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem.* 7:89–123.

- Reithner B., Schuhmacher R., Peissl I., Seidl V., Krska R., Zeilinger S.** (2005) The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet. Biol.* 42:479-760.
- Requena N., Breuninger M., Franken P., Ocón A.** (2003). Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H⁺-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol.* 132:1540–1549.
- Rognoni S., Teng S., Arru L., Smeekens C. M.S., Perata P.** (2007). Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul.* 52:217–228.
- Rolland F., Gonzalez B.E., Sheen J.** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:675-709.
- Ruan Y.L.** (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:33-67.
- Rubio M.B., Domínguez S., Monte M. Hermosa R.** (2012). Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiol.* 158:119–128.
- Shavrukov Y., Hirai Y.** (2016). Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 67:15–30.
- Salazar-Badillo F.B., Sánchez-Rangel D., Becerra-Flora A., López-Gómez M., Nieto-Jacobo F., Mendoza-Mendoza A.** (2015). *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species. *Plant Physiol. Biochem.* 95:49–56.
- Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S., Halliday, K.J.** (2007). Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant J.* 50:429–438.
- Samolski I., de Luis A., Vizcaíno J. A., Monte E., Suárez M.B.** (2009). Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiol.* 9:217-231.
- Sauer N.** (2007). Molecular physiology of higher plant sucrose transporter. *FEBS Lett.* 581:2309–2317.
- Schenkel D., Lemfack M. C., Piechulla B., Splivallo R.** (2015). A meta-analysis approach for assessing the diversity and specificity of belowground root and microbial volatiles. *Front. Plant Sci.* 6:707.

- Schiefelbein L.E., Masucci J.D., Wang H.** (1997). Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.
- Simon A., Dunlop R., Ghisalberti E., Sivasithamparam K.** (1988). *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. *Soil Biol. Biochem.* 20:263–264.
- Slewinski T.L.** (2011). Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Mol. Plant* 4:641–662.
- Solís G.M.G., Argüello A.G., López B.J., Ruíz H.L.F., López M.J.E., Sánchez C.L., Carreón A.Y., Martínez T.M.** (2017). *Arabidopsis thaliana* sucrose phosphate synthase (sps) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene Expr. Patterns* 25-26:92-101.
- Stadler R., Wright M.K., Lauterbach C., Amon G., Gahrtz M., Feuerstein A., Oparka J.K., Sauer N.** (2005). Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J.* 41:319-331.
- Stat Soft Inc** (2011). STATISTICA, version 10. Available at: www.statsoft.com
- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., Schuhmacher R.** (2010). Identification and profiling of volatiles metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods* 81:187-193.
- Sun J., Zhang J., Larue C.T., Huber S.C.** (2011). Decrease in leaf sucrose synthesis leads to increased leaf starch turnover and decreased RuBP regeneration-limited photosynthesis but not Rubisco-limited photosynthesis in *Arabidopsis* null mutants of SPSA1. *Plant Cell Environ.* 34:592-604.
- Taiz L., Zeiger E.** (2002) Plant physiology. Sunderland: Sinauer Associates 3rd Ed. 690 pp.
- Takahashi F., Sato-Nara K., Kobayashi K., Suzuki M., Suzuki H.** (2003). Sugar-induced adventitious roots in *Arabidopsis* seedlings. *J. Plant Res.* 116:83–91.
- Talbot N.J.** (2012). Living the sweet life: How does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants? *PLoS Biol.* 8:e1000308.
- Truernit E., Sauer N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196:564-570.
- Valverde-Valdés T., Cano-Santana Z., Meave del Castillo J. A., Carabias J.** (2005). Ecología y

medio ambiente. 1era ed. México: Pearson Educación Prentice Hall, 230 p.

- Van Wees S.C.M., Van Der Ent S., Pieterse C.M.J.** (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:443–448.
- Vanhaeren H., Gonzalez N., Inzé D.** (2015). A journey through a leaf: phenomics analysis of leaf growth in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 13: e0181.
- Vargas W.A., Mandawe J.C., Kenerley C.M.** (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151:792–808.
- Vargas W.A., Crutvher F.K., Kenerley C.M.** (2011). Functional characterization of plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*, Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytol.* 189:777–789.
- Vargas W.A., Kenerley C.M.** (2012). Carbohydrate uptake and catabolism in fungi. Importance of sugar trafficking during plant-host interactions. In: Silva A.P. and Sol M. (eds) *Fungi: Types, Environmental, Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, pp. 21-40.
- Verma M., Brar S., Tyagi R., Surampalli R., Valero J.** (2007). Antagonist fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* 37:1-20.
- Vinale F., Flematti G., Sivasithamparam K., Lorito M., Marra R., Skelton B.W., Ghisalberti E.L.** (2009). Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. *J. Nat. Prod.* 72:2032–2035.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L., Lorito M.** (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72:80–86.
- Vitha S., Yang M., Sack F. D., Kiss J. Z.** (2007). Gravitropism in the starch excess mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Bot.* 94:590-598.
- Voigt C., Oster U., Bornke F., Jahns P., Dietze K.J., Leister D., Kleine T.** (2010). In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signaling. *Physiol. Plantarum* 138:503–519.
- Wang Y., Li J.** (2008). Molecular bases of plant architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:253-279.

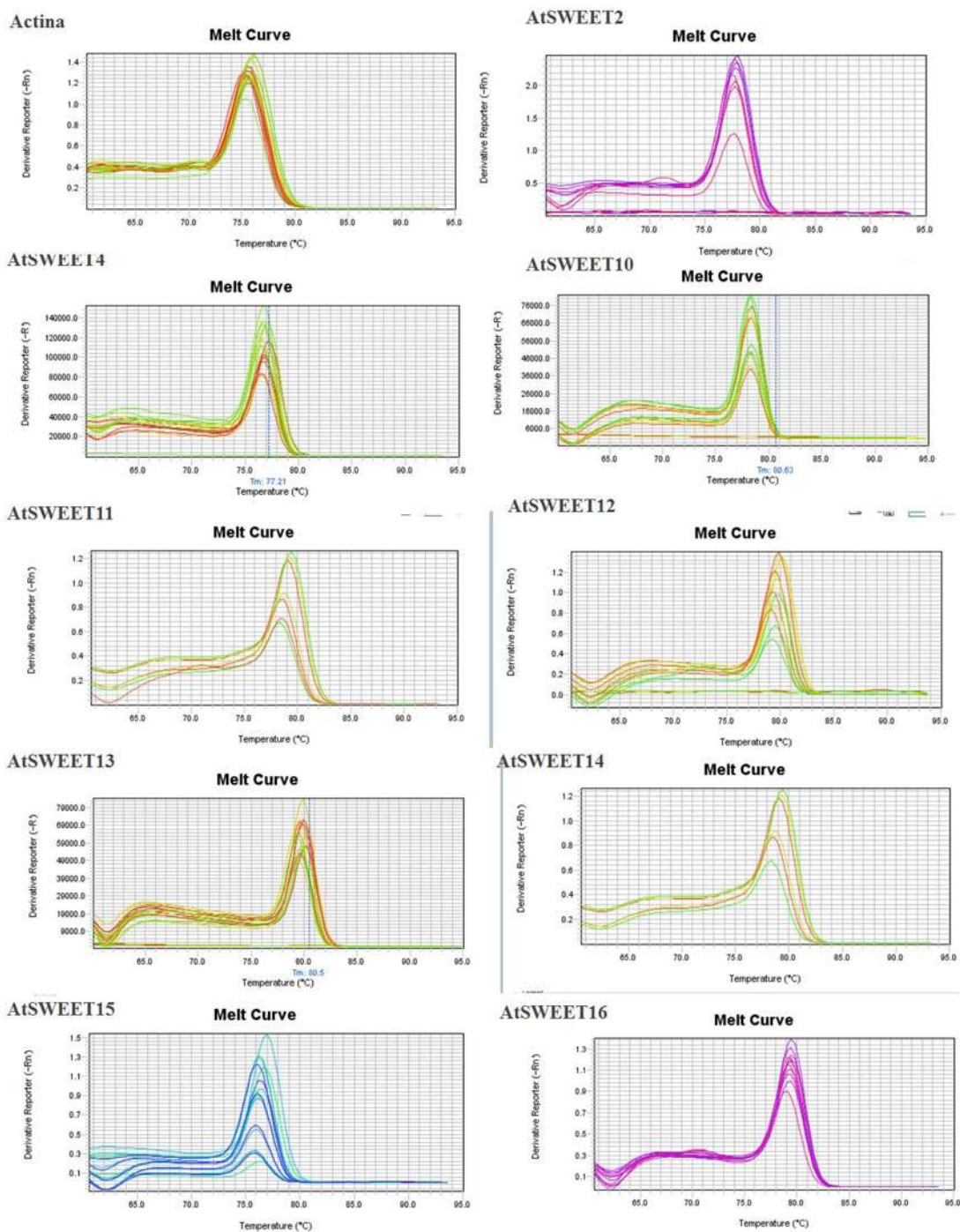
- Wenke K, Kai M, Piechulla B.** (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* 231:499-506.
- Wickel S. M., Citron C. A., Dickschat J. S.** (2013). 2H-Pyran-2-ones from *Trichoderma viride* and *Trichoderma asperellum*. *Eur. J. Org. Chem.* 2906–2913.
- Wippel K., Sauer N.** (2012). *Arabidopsis* SUC1 loads the phloem in suc2 mutants when expressed from the SUC2 promoter. *J. Exp. Bot.* 63:669-79.
- Wright D.P., Read D. J., Scholes J.D.** (1998). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Env.* 21:881–891.
- Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I.** (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7343-7353.
- Zhang H., Xie X., Kim M.S., Korniyev D. A., Holaday S., Pare W.P.** (2008). Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *Plant J.* 56:264–273.
- Zhi-Lin Y., Yi-Cun C., Bai-Ge X., Chu-Long Z.** (2012). Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32:363–373.

10. APÉNDICE

Publicaciones relacionadas con este trabajo:

- Pelagio-Flores R., Esparza-Reynoso S., Garnica-Vergara A., López-Bucio J., Herrera-Estrella F. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Front Plant Sci.* 8: 822.
- Garnica-Vergara A., Esparza-Reynoso S. (2017). *Trichoderma*: un hongo biofertilizante. Revista de divulgación científica Saber más. Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH. Ejemplar número 31.
- Barrera-Ortiz S., Garnica-Vergara A., Esparza-Reynoso S., García-Cárdenas E., Raya-González J., Ruiz-Herrera L., López-Bucio J. (2017). Jasmonic acid-ethylene crosstalk via ETHYLENE INSENSITIVE 2 reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation. Aceptado en *Journal of Plant Growth Regulation*.

Figuras suplementarias



10.1. Curvas de disociación para actina, *AtSWEET1*, *AtSWEET4*, *AtSWEET10*, *AtSWEET11*, *AtSWEET12*, *AtSWEET113*, *AtSWEET14*, *AtSWEET16* y *AtSWEET17*.

10.2 Tabla de valores obtenidos de curvas patrón para RT- qPCR

GEN/SWEET	m	% Eficiencia	Threshold	Eficiencia
actina	-2.911	121	0,235174	1,20547
2	-3.344	99,091	0,46711	0,99091
4	-3.392	97,172	0,213497	0,97172
10	-3.049	112,808	0,305087	1,12808
11	-3.005	115,152	0,053243	1,15152
12	-3.169	106,808	0,108152	1,06808
13	-2,91	120,60	0,14	1,21
14	-3,32	100,07	0,06	1,00
16	-3,28	101,88	0,02	1,02
17	-3,33	99,88	0,14	1,00

Artículos

Trichoderma: un hongo biofertilizante

Amira Garnica Vergara y Saraí Esparza Reynoso

Los registros fósiles muestran que la asociación entre las raíces y los hongos es tan antigua como las plantas terrestres. Hace millones de años, cuando las plantas evolucionaron en ambientes pantanosos, su colonización del suelo ocurrió gracias a la simbiosis establecida con diferentes especies de microorganismos, principalmente los hongos, cuyas hifas actúan como extensiones naturales del sistema radical. La liberación de sustancias ricas en carbono por la raíz, como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y otras sustancias nutritivas permite la selección de microbiomas en un ambiente especial denominado rizósfera, diferente en propiedades y funcionamiento a otras regiones del suelo y cuyo estudio representa una de las grandes pro-

mesas para mejorar las prácticas agrícolas y la sustentabilidad del campo.

El protagonismo de *Trichoderma*

Entre los microorganismos que interactúan con la raíz de las plantas, encontramos a los hongos del género *Trichoderma*, los cuales se adaptan a una amplia variedad de condiciones ambientales y obtienen su energía a partir de los residuos de materia orgánica o material vegetal en descomposición. En años recientes, se han confirmado sus propiedades benéficas que potencian su uso como bioestimulante para los cultivos.

Trichoderma es un hongo filamentoso que pertenece al grupo de los ascomicetos, en los que

Amira Garnica Vergara, es Maestra en Ciencias, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Saraí Esparza Reynoso es Ingeniera Agrónoma, estudiante del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Experimental de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Ambas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.



la mayoría de las especies no tienen un periodo sexual, simplemente producen esporas asexuales. Este hongo se caracteriza por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos. Son muy diversos, pueden ser de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas y micoparásitos. Además, pueden ser usados para producir un amplio rango de productos de interés comercial y agrícola. Algunas especies son utilizadas como agentes para el control de patógenos del suelo y de enfermedades vegetales y por sus habilidades de incrementar el crecimiento y desarrollo de plantas.

Colonización de *Trichoderma* en raíces

Entre las ventajas, destaca su inocuidad a los seres humanos, ya que no deja efectos residuales en el follaje, los frutos y las semillas, una diferencia fundamental al aplicarse fungicidas u otros agroquímicos. Además, posee un rápido crecimiento y desarrollo, puede proliferar en una amplia gama de suelos, es tolerante a condiciones ambientales extremas, puede tolerar altas concentraciones de agroquímicos y es capaz de parasitar, controlar y destruir hongos, nemátodos y otros fitopatógenos (patógenos de plantas).

-Es por estas propiedades que se le considera uno de los principales agentes para el control biológico en diferentes sistemas de producción-

Defensa en plantas

La colonización de la raíz por *Trichoderma* ejerce un efecto multifuncional en la biología de los cultivos como el maíz, el jitomate y la soya,



Colonización de *Trichoderma* en raíces

por mencionar algunos. Por ejemplo, se incrementan las defensas y las plantas se hacen más resistentes a las enfermedades causadas por hongos y bacterias. Este fenómeno puede ser ocasionado por la inducción de compuestos químicos llamados

fitoalexinas, los cuales se acumulan en altas concentraciones en la planta y ayudan a limitar la dispersión del patógeno o por la activación de rutas de señalización implicadas en defensa como la del ácido salicílico, ácido jasmónico o etileno.

¿Parásito de otros patógenos?

Además, *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros organismos fitopatógenos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Posee distintas formas de acción, como la producción de secreciones enzimáticas tóxicas, las cuales causan desintegración y muerte en hongos que habitan el suelo (micoparasitismo), la degradación de paredes celulares de hongos patógenos (depredación), la producción de químicos volátiles y antibióticos antifúngicos que inhiben otros hongos (amensalismo), la colonización directa del hongo (predación) y la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo. ¡De verdad, su función es muy importante cuando coloniza las raíces de diversas plantas!

Inducción del crecimiento vegetal

El estímulo del crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de *Trichoderma* ha sido conocido por muchos años. Muchas cepas que han sido aisladas y probadas en plantas, ya sea en condiciones de laboratorio o en suelos naturales de campo, incrementan el crecimiento de las raíces y esto repercute en el aumento de la productividad de las plantas.

En diversas investigaciones, los científicos han comprobado que la producción de fitohormonas como las auxinas y compuestos volátiles que libera *Trichoderma*, son los responsables de estimular la ramificación de la raíz, aumentando su capacidad para captar agua y nutrientes minerales.

Trichoderma facilita la asimilación de fósforo en plantas

Una problemática en la agricultura, es el bajo nivel de fósforo disponible en el suelo. El fosfato, principal forma asimilable del fósforo, es un macronutriente esencial para el desarrollo y crecimiento vegetal; un constituyente necesario para la división celular, la fotosíntesis, la producción de proteínas y ácidos nucleicos; también para la fijación de nitrógeno, la biosíntesis de azúcares y almidones y otros procesos del metabolismo.

Pero la movilidad y concentración de fósforo en los suelos es muy baja, por lo que se requiere la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes fosfatados, que además de ser muy costoso para la producción, propician efectos negativos para el ambiente. Se conoce que cerca del 90% del fosfato aplicado se precipita en formas insolubles con calcio y metales, como

hierro y aluminio, que no pueden ser asimilados, limitando la producción de los cultivos a nivel mundial.

Ante esta situación, se reporta que *Trichoderma* es eficaz en la solubilización del fosfato a través de la producción de ácidos orgánicos que reducen el pH del suelo haciéndolo más biodisponible, la liberación de metabolitos quelantes y enzimas especializadas en la degradación de compuestos orgánicos de fósforo como las fosfatasas ácidas y alcalinas.

Trichoderma: un impulso para la aplicación de biofertilizantes

La aplicación de microorganismos benéficos para las plantas implica la elaboración de biofertilizantes, es decir, vehículos en un medio líquido o sólido que usualmente contienen materia orgánica y microorganismos vivos o en un estado de "dormancia," que una vez en el suelo, colonizan las raíces promoviendo el crecimiento y el desarrollo vegetal. En general, se estima que un biofertilizante tiene un costo de sólo el 10% comparado con los fertilizantes químicos, lo que los convierte en productos rentables y útiles.

Si la aplicación de biofertilizantes representa un gran beneficio ¿por qué no se ha adoptado en México con tanto éxito?

Recientemente, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reportó que apoya 325 mil hectáreas con biofertilizantes, permitiendo

un incremento en la producción de un 15%, además de un ahorro importante por la reducción en la importación de fertilizantes químicos. Sin embargo, aún existen limitaciones para el uso extensivo de los biofer-



tilizantes, derivadas de la falta de información sobre su efectividad, mecanismos de acción y reproducibilidad de sus efectos probióticos en diferentes ambientes y condiciones de cultivo.

Con base en lo anterior, un reto de las investigaciones actuales es el desarrollo de nuevos y mejores bioinoculantes, que se adapten con eficiencia a diversos tipos de suelo y condiciones ambientales locales, pero sobre todo debe existir una mayor vinculación entre la industria, los productores y los investigadores con el fin de colaborar en el desarrollo de sistemas de producción que incrementen la calidad de los bioinoculantes y garanticen la reproducibilidad de sus efectos en los cultivos.

Actualmente se conocen más de 200 especies de *Trichoderma*, las más comercializadas en cultivos agrícolas para el control biológico son *T. harzianum* (cepa T-22), *T. reesei*, *T. viride* y *T. hamatum*, y pueden funcionar tanto para el control de enfermedades en hoja y tallo como de raíz. La forma más económica y extensa para emplear *Trichoderma* en la agricultura, consiste en el tratamiento de las semillas previo a la siembra, ya que este hongo es capaz de colonizar la superficie de la raíz a partir de las semillas tratadas. No obstante, existen tratamientos combinados para semillas y sustrato para asegurar que el inóculo permanezca viable en condiciones ambientales adversas y posteriormente se establezca como habitante normal de la rizósfera.

En el mercado existen diferentes formulaciones de *Trichoderma*, cuya presentación varía

en forma granular o en polvo mojable o bien en presentación líquida. Estas formulaciones son realizadas con aislamientos o cepas específicas bajo un reglamento de control de calidad, que incluye la verificación de la pureza y la efectividad biológica mediante un proceso semi-industrial.

Para obtener la eficacia que necesita el agricultor se deben tomar en cuenta varios aspectos muy importantes: la procedencia del producto, la experiencia y confiabilidad de la empresa que lo produce, el respaldo técnico, la fecha de vencimiento, la presentación y las características específicas del producto como especie de *Trichoderma*, concentración, viabilidad, especificidad, dosificación y forma de aplicación, que garanticen su eficacia y efectividad.

Actualmente los principales fabricantes y comercializadores de productos de *Trichoderma* radican en Asia, Europa y Estados Unidos. En México, la producción actual de biofertilizantes se realiza por parte de empresas privadas e instituciones de investigación como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Pero, a pesar del desarrollo, distribución y aplicación de esta tecnología, aún no se contempla como una alternativa para la sustitución parcial de los fertilizantes minerales.

Por lo tanto, la difusión y el empleo de *Trichoderma* representa un alto potencial para la generación de biofertilizantes en beneficio de una agricultura orgánica, con alta capacidad productiva y menos repercusiones hacia el medio ambiente.

Las autoras agradecen la revisión a la D.C. Lourdes Macías Rodríguez y al D.C. José López Bucio, Profesores e Investigadores del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

Crédito fotografías: Amira Garnica Vergara y Sarai Esparza Reynoso



Villegas. 2005. *Trichoderma*. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. http://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible.

Argumedo-Delira y col., 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4) 257-269. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n4/v25n4a6.pdf>

López-Bucio et al. 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196:109-123.



Trichoderma-Induced Acidification Is an Early Trigger for Changes in Arabidopsis Root Growth and Determines Fungal Phytostimulation

Ramón Pelagio-Flores¹, Sarai Esparza-Reynoso², Amira Garnica-Vergara², José López-Bucio² and Alfredo Herrera-Estrella^{1*}

¹ Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad-Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, México, ² Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

OPEN ACCESS

Edited by:

Jesús Mercado-Blanco,
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas (CSIC), Spain

Reviewed by:

Sabrina Sarrocco,
University of Pisa, Italy
David Ruano-Rosa,
Instituto de Agricultura Sostenible –
National Research Council, Spain

*Correspondence:

Alfredo Herrera-Estrella
alfredo.herrera@cinvestav.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 29 March 2017

Accepted: 02 May 2017

Published: 17 May 2017

Citation:

Pelagio-Flores R,
Esparza-Reynoso S,
Garnica-Vergara A, López-Bucio J
and Herrera-Estrella A (2017)
Trichoderma-Induced Acidification Is
an Early Trigger for Changes
in Arabidopsis Root Growth
and Determines Fungal
Phytostimulation.
Front. Plant Sci. 8:822.
doi: 10.3389/fpls.2017.00822

Trichoderma spp. are common rhizosphere inhabitants widely used as biological control agents and their role as plant growth promoting fungi has been established. Although soil pH influences several fungal and plant functional traits such as growth and nutrition, little is known about its influence in rhizospheric or mutualistic interactions. The role of pH in the *Trichoderma*–*Arabidopsis* interaction was studied by determining primary root growth and lateral root formation, root meristem status and cell viability, quiescent center (QC) integrity, and auxin inducible gene expression. Primary root growth phenotypes in wild type seedlings and STOP1 mutants allowed identification of a putative root pH sensing pathway likely operating in plant–fungus recognition. Acidification by *Trichoderma* induced auxin redistribution within *Arabidopsis* columella root cap cells, causing root tip bending and growth inhibition. Root growth stoppage correlated with decreased cell division and with the loss of QC integrity and cell viability, which were reversed by buffering the medium. In addition, *stop1*, an *Arabidopsis* mutant sensitive to low pH, was oversensitive to *T. atroviride* primary root growth repression, providing genetic evidence that a pH root sensing mechanism reprograms root architecture during the interaction. Our results indicate that root sensing of pH mediates the interaction of *Trichoderma* with plants.

Keywords: plant growth, root development, symbiosis, soil pH, pH sensing, biocontrol

INTRODUCTION

Plants are constantly exposed to biotic or abiotic stimuli and adjust their growth and developmental patterns to adapt and survive. Members of the fungal genus *Trichoderma* are frequently found in the rhizosphere, a narrow soil zone influenced by roots, where many species establish beneficial interactions with plants either antagonizing phytopathogens or directly influencing morphogenesis (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Harman, 2006; Druzhinina et al., 2011; Hermosa et al., 2012).

A complex chemical interaction is established between *Trichoderma* and their plant hosts comprising volatile and diffusible secondary metabolites, small peptides, and/or antibiotics, which influence root growth, branching and absorptive capacity (Samolski et al., 2012; López-Bucio et al., 2015). *T. virens* produces and releases auxinic compounds, including indole-3-ethanol (IET), indole-3-acetaldehyde (IALD), indole-3-carboxaldehyde (ICALD), and indole-3-acetic acid (IAA)

(Contreras-Cornejo et al., 2009), whereas *T. atroviride* and *T. asperellum* produce the volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP), which modulates plant growth and root system architecture (Kottb et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2016). *T. atroviride* also produces ethylene, and ethylene-related mutants *etr1* and *ein2* show defective root-hair induction and enhanced primary-root growth inhibition when co-cultivated with this fungus (Contreras-Cornejo et al., 2015). Thus, auxin and ethylene (ET) signaling play a major role in the *Arabidopsis* root developmental response to *Trichoderma*. Furthermore, *Trichoderma* induces plant defense responses and improves crop performance under different stress conditions (Mastouri et al., 2010, 2012; Contreras-Cornejo et al., 2011, 2014a; Salas-Marina et al., 2011; Rawat et al., 2013; Hashem et al., 2014).

The rhizosphere is the region where plant roots, soil conditions, and microorganisms interact. While *Trichoderma* root colonization is often of benefit to plants, improves nutrition, and/or enhances the degradation of toxic chemicals, the mechanisms of phytostimulation remain mostly unknown. The rhizosphere physicochemical conditions are the major driving forces influencing microbe proliferation (Husson, 2013), and no other single chemical soil characteristic is more important in determining the success of plants and soil microbes than pH (Brady and Weil, 1999). Optimum pH for growth varies considerably among plants, but most cultivated species grow well on slightly acid or neutral soils, in which root cells function properly (Marschner, 1991; Brady and Weil, 2010; Shavrukov and Hirai, 2016). However, when soil pH becomes more acid (lower than 5.5), root growth is repressed and plant yield decreases, correlating with an increase in toxic levels of aluminum (Al^{3+}), manganese (Mn^{2+}), iron (Fe^{2+}), and protons (H^+), as well as decrease in the availability of phosphorous (P), calcium (Ca^{2+}), and magnesium (Mg^{2+}) (von Uexküll and Mutert, 1995; Kochian et al., 2004; Fan et al., 2016a; Shavrukov and Hirai, 2016). An acidic pH further inhibits root cell division and elongation, and compromises meristem cell viability (Koyama et al., 1995; Yokota and Ojima, 1995; Lager et al., 2010; Graças et al., 2016).

In fungi, pH is also an important factor that affects growth, development and competition (Alkan et al., 2013). Several pathogenic fungi acidify the pH of the growth media such as *Penicillium* sp., *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus niger*, and *Phomopsis mangiferae*; whereas *Colletotrichum* sp, *Alternaria alternata*, and *Fusarium oxysporum* alkalize it, and this property is strongly involved in virulence regulation (Alkan et al., 2013; Prusky et al., 2016). *Trichoderma* spp. grows better in acidic conditions with an optimal growth at pH ranging from 4 to 6, and they can modify the pH of the rhizosphere (Trushina et al., 2013; Singh et al., 2014), but the consequences of fungal-mediated pH changes for root growth and development have not yet been analyzed.

Here, we hypothesized that acidification may play an important role in the configuration of root architecture and phytostimulation elicited by *Trichoderma*. Through detailed characterization of the effects of several *Trichoderma* species on *Arabidopsis* seedling growth, the fungal capacity to acidify the growth medium, the effects of low pH stress on root growth and

plant development, as well as testing the responses of selected *Arabidopsis* mutants defective on pH sensing, we demonstrate the critical role of fungal acidification as an early response influencing root morphogenesis and plant growth. Moreover, since lateral root initiation started earlier or in parallel to root tip bending and root stoppage, we propose that a low pH independent program operates at the root pericycle to induce root branching.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Growth Conditions

All plants used in this study were in the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Columbia (Col-0) background. Transgenic *Arabidopsis* lines *DR5::GFP* an auxin-inducible marker (Ottensschläger et al., 2003); *H2B::YFP* a cell viability marker (Boisnard-Lorig et al., 2001); *WOX5::GFP* a quiescent center (QC) marker in the root stem cell niche (SCN) (Sarkar et al., 2007); *CycB1::uidA* a marker of mitotic activity, expressed in the G2/M phase of the cell cycle (Colón-Carmona et al., 1999) previously characterized as well as the mutant *stop1* known to show a hypersensitive root response to low pH (salk_114108) obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), were used for the different experiments. Seeds were surface-disinfected with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min, washed five times with distilled water, and stratified for 2 days at 4°C. Seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog (1962) medium (MS basal salts mixture, M524; PhytoTechnology), 0.6% sucrose (Sucrose: Ultrapure, MB Grade, 21938; USB Corporation) and 1% Agar (Agar, Micropropagation Grade, A111; PhytoTechnology) at pH 7. The suggested formulation is 4.3 g.L⁻¹ of salts for 1x medium; we used 0.9 g.L⁻¹, which we consider and refer to as 0.2X MS. For MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) treatments it was included in the plant growth medium and the pH was adjusted to 7.0. All experiments were performed in an environmentally controlled growth room with a 16 h photoperiod (300 μmol m⁻² s⁻¹ of light intensity), and 22°C.

Fungal Strain and Culture Conditions

Trichoderma atroviride IMI 206040 was propagated on potato dextrose agar (PDA; Difco), at 28°C for 5 days and then conidia were collected adding a small amount of sterile water into the Petri dishes and scraping the surface of the fungus. For the different experiments inoculation was carried out by placing a drop of a spore suspension containing 1×10^6 spores. In the interaction assays the *Trichoderma* inoculum was placed at 5 cm from *A. thaliana* primary roots germinated and grown for 5 days on agar plates containing 0.2X MS medium. The plates, which included 10 *A. thaliana* seedlings each, were arranged in a completely randomized design. After 3 and 5 days of co-cultivation, plant growth was determined. For acidification experiments *T. atroviride* was inoculated on plates containing MS 0.2X supplied or not with bromophenol blue (0.006%) and analyzed every 24 h for 4 days.

Analysis of Growth

Growth of primary roots was registered using a ruler. Lateral root number was determined by counting the lateral roots present in the primary root from the tip to the root/stem transition. Images were recorded using a digital camera (Nikon D3300, Osaka, Japan). The length of meristems was determined as the distance from the QC to the cell file where cells started to elongate and measured using IMAGEJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, United States). All experiments were repeated at least twice as indicated in the figure legends and data analyzed in the STATISTICA 10 software (Stat Soft Inc, 2011). Univariate and multivariate analyses with a Tukey's *post hoc* test were used for testing differences in the experiments. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P \leq 0.05$).

Trichoderma Soluble Metabolites Experiments

Trichoderma atroviride was inoculated on Petri plates containing MS 0.2X covered by a sterile cellophane sheet and incubated in darkness for the indicated times in the different experiments. The cellophane was removed together with the mycelium, then *Arabidopsis* seeds or seedlings were germinated or transferred, respectively, onto the plates where *Trichoderma* was pre-grown, and further grown for the indicated times.

Propidium Iodide Staining, GFP, and YFP Detection

For confocal microscopy, transgenic *A. thaliana* seedlings co-cultivated or not with *Trichoderma* were transferred from the growth medium to microscope slides with propidium iodide (20 μ M), used as counterstain. All imaging was done using a Zeiss LSM 510 META inverted confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) with either a 20X or 40X objective. GFP was excited with a 488 nm line of an Argon laser and propidium iodide (PI) with a 514 laser line. GFP emission was filtered with a BP 500–520 nm filter and PI emission was filtered with a LP 575 nm filter, or by using a confocal microscope (Olympus FV1000; Olympus Corp., Tokyo, Japan), with a 568-nm wavelength argon laser for excitation, and an emission window of 585–610 nm for propidium iodide and GFP or YFP fluorescence (488 nm excitation/505–550 nm emission, 514 nm excitation/527 nm emission, and 532 nm excitation/588 nm emission, respectively). Ten independent seedlings were analyzed per line, and treatment representative images were selected for figure construction.

Histochemical Analysis of GUS Expression

Histochemical β -glucuronidase (GUS) expression was evaluated by incubating the plant tissues in 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chlorium-3-indolyl, β -D-glucuronide) phosphate buffer (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 , 0.1 M; pH 7), 10 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100 with 2 mM potassium ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide for 12 h at 37°C. Plants were cleared and fixed using the method of Malamy and Benfey (1997). For each marker line and for each treatment, at least 15 transgenic plants were analyzed.

Determination of Developmental Stages of Lateral Root Primordia (LRP)

Lateral root primordia (LRP) were quantified 6 days after germination. Seedling roots were first cleared to enable LRP at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Malamy and Benfey (1997). The developmental stages are as follows. Stage I: LRP initiation (in the longitudinal plane, approximately eight to 10 'short' pericycle cells are formed). Stage II: the LRP are divided into two layers by a periclinal division. Stage III: the outer layer of the primordium divides periclinally, generating a three-layer primordium. Stage IV: an LRP with four cell layers. Stage V: the LRP are midway through the parent cortex. Stage VI: the LRP have passed through the parent cortex layer and has penetrated the epidermis. It begins to resemble the mature root tip. Stage VII: the LRP appear to be just about to emerge from the parent root.

RESULTS

Early Root Responses during *Arabidopsis* Interaction with *Trichoderma*

To study the early responses of *Arabidopsis* seedlings to *Trichoderma*, we performed time-course experiments of *Arabidopsis* seedlings co-cultured with *T. atroviride*. We found that in the early stages of the interaction, from 24-to-60 h, primary root growth is unaffected (Figure 1A), and the meristem normally expresses *CyCB1:uidA*, a marker of mitotic activity, and the QC marker *WOX5:GFP*, whose corresponding WT protein is required to maintain the root SCN (Figure 1B). Nevertheless, *T. atroviride* clearly activated root branching at 60 h of the interaction (Figure 1C). The number of LRP per plant changed slightly at early stages of the interaction (24 and 48 h). However, such differences were no longer observed after 60 h (Figure 1D), suggesting that the differences in root branching could be due to an accelerated growth of LRP in response to *Trichoderma*. This was evidenced by analyzing the LRP developmental stages, where a decrease in the number of LRP still at the early stages of development, particularly those at stages III and IV, and an increase in the number of those more developed (stage VII) and emerged lateral roots (ELR), as early as 24 h of co-cultivation was observed (Figure 1E). These data suggest that *Trichoderma* increases root branching in *Arabidopsis* mainly by inducing the maturation of LRP and not *de novo* formation of LRP, as an early response that occurs independently of primary root growth inhibition.

Late Root Responses during Interaction with *Trichoderma*

Early root responses of *Arabidopsis* to *T. atroviride* did not evidenced any negative effect. In agreement with a previous report (Contreras-Cornejo et al., 2009), we observed that *T. atroviride* promoted growth and development of lateral roots. However, after a longer time of interaction (72–96 h), a primary

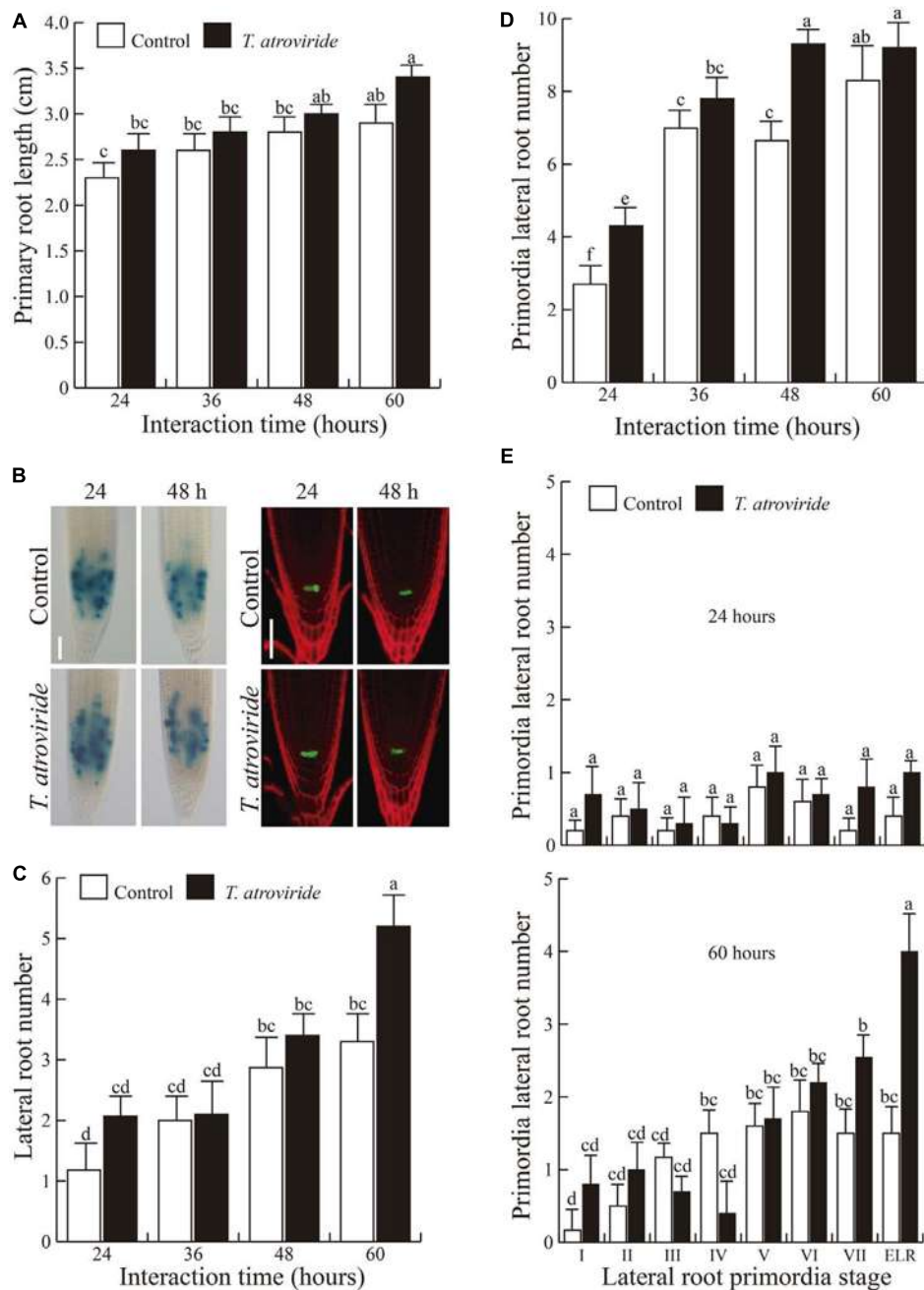


FIGURE 1 | Early responses of *Arabidopsis* to *Trichoderma atroviride*. *Arabidopsis* WT (Col-0) seeds were germinated and grown on agar solidified MS 0.2X medium. Four-day-old seedlings were inoculated with 1×10^6 spores of *T. atroviride* at the opposite side of where seeds were sown and analyzed at the indicated times. **(A)** Primary root length. **(B)** *CycB1:uidA* (left) and *WOX5:GFP* (right) expression after 24 and 48 h of *Trichoderma* inoculation. **(C)** Lateral root number per plant. **(D)** Total lateral root primordia (LRP) per plant. **(E)** Number of LRP per plant after 24 and 60 h of interaction. Stage I: LRP initiation (in the longitudinal plane, approximately eight to 10 'short' pericycle cells are formed). Stage II: the LRP are divided into two layers by a periclinal division. Stage III: the outer layer of the primordium divides periclinally, generating a three-layer primordium. Stage IV: an LRP with four cell layers. Stage V: the LRP are midway through the parent cortex. Stage VI: the LRP have passed through the parent cortex layer and has penetrated the epidermis. It begins to resemble the mature root tip. Stage VII: the LRP appear to be just about to emerge from the parent root. Values shown represent means with SE of at least 30 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P \geq 0.05$). Scale bars = 50 μ m. The experiment was repeated three times with similar results.

root growth inhibitory effect could be appreciated. Hence, we characterized in detail this late root response and its relationship with lateral root formation.

Inoculation with *T. atroviride* shortened primary roots (Figures 2A,C) while increasing lateral root number (Figures 2B,C). Surprisingly, the root tips bent forming a

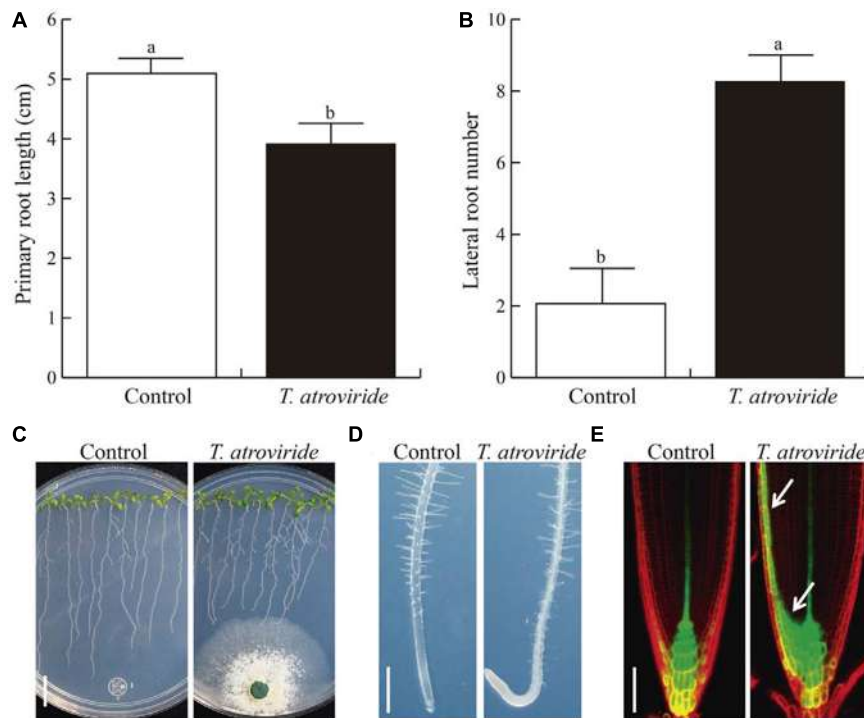


FIGURE 2 | Effects of *T. atroviride* inoculation on *Arabidopsis* root architecture. (A) Primary root length. **(B)** Lateral root number. **(C)** Representative photographs of *Arabidopsis* seedlings co-cultivated with *Trichoderma*. **(D)** Root tips of axenic or *Trichoderma* co-cultivated WT seedlings, and *DR5::GFP* seedlings **(E)**. White arrows show auxin redistribution. *Arabidopsis* seedlings were germinated and grown for 5 days on the surface of agar plates containing MS 0.2X medium and then inoculated with *T. atroviride* at the opposite side of the plate and grown for 4 more days. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). Error bars represent SE. Scale bars in images **(C–E)** = 1 cm, 500 and 50 μ m, respectively. The experiment was repeated three times with similar results.

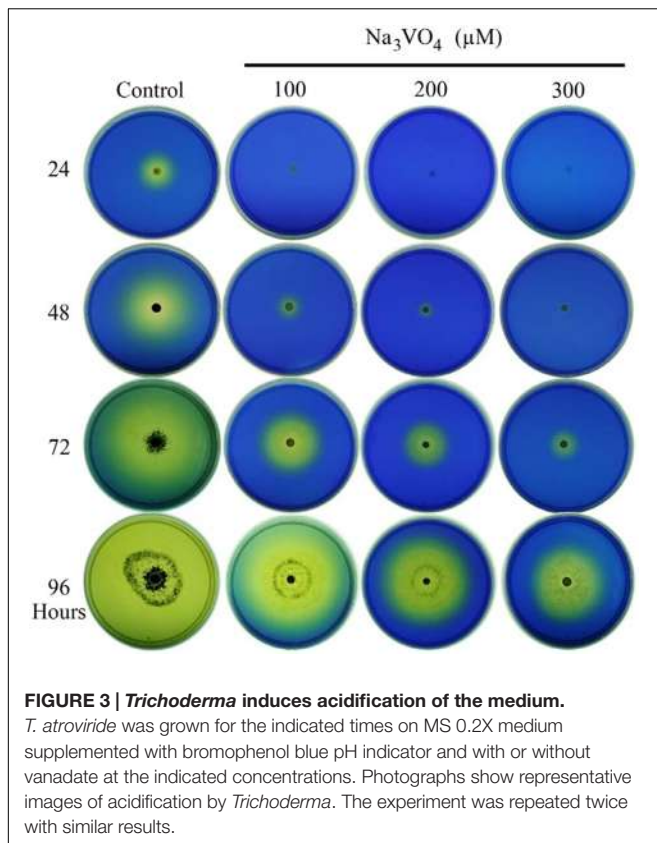
hook. The latter event is followed by inhibition of primary root elongation, stopping at the place where hook formation occurred, before contacting the mycelium (**Figures 2C,D**). Unexpectedly, upon prolonged interaction these responses were accompanied by pigmentation and chlorosis of leaves (Supplementary Figure S1). To investigate whether the bending response was specific to *T. atroviride*, we analyzed the root response to different *Trichoderma* species (*T. asperellum*, *T. koningii*, and *T. harzianum*) and about 50 other native soil isolates. Interestingly, this response was similar, regardless of the *Trichoderma* species or isolate tested (representative images are shown in Supplementary Figure S2). These results suggest that a common signal released into the growth medium may be sensed by plants, thereof triggering the observed root responses.

To understand the signaling mechanisms involved in the elicited root bending response, and since *Trichoderma* was reported to produce auxins (Contreras-Cornejo et al., 2009), we analyzed the role of auxin signaling in this process. Like in the case of gravitational stimulation, an auxin-redistribution was observed in the root curvature response to *T. atroviride*, where auxins are redistributed within the root tip and accumulate on one side of the columella root cap cells, as indicated by the expression of the auxin-induced *DR5::GFP* marker (**Figure 2E**). This redistribution of auxin likely provokes a reduction of growth

on one side of the root, which in turn could lead to the formation of the hook, or causes root growth reorientation. However, the observed redistribution of auxins did not explain the subsequent root growth inhibition, suggesting the involvement of additional fungal signals in root growth inhibition.

T. atroviride Has a Strong Capacity to Acidify the Growth Medium

Even though several studies have shown that pH is an important factor in fungal growth and development, little is known about the impact of fungal-mediated pH changes in root growth. Thus, we first determined the capacity of *T. atroviride* to modify the pH of the culture medium. For this purpose, we inoculated 1×10^6 spores in MS 0.2X medium supplemented with bromophenol blue, which is used as a pH indicator. We found that *T. atroviride* strongly acidifies the medium, which occurs at least in part through proton extrusion in a process that involves vanadate sensitive ATPases, since acidification was strongly reduced by adding increasing amounts of Sodium Orthovanadate (Vanadate, Na_3VO_4), a competitive inhibitor of plasma membrane ATPases (**Figure 3**). Therefore, media acidification by *Trichoderma* may explain the root bending response and thus, the primary root growth inhibition of *Arabidopsis* plants co-cultivated with *T. atroviride* described above.



Acidification Induced by *T. atroviride* Strongly Represses the *Arabidopsis* Growth and Development

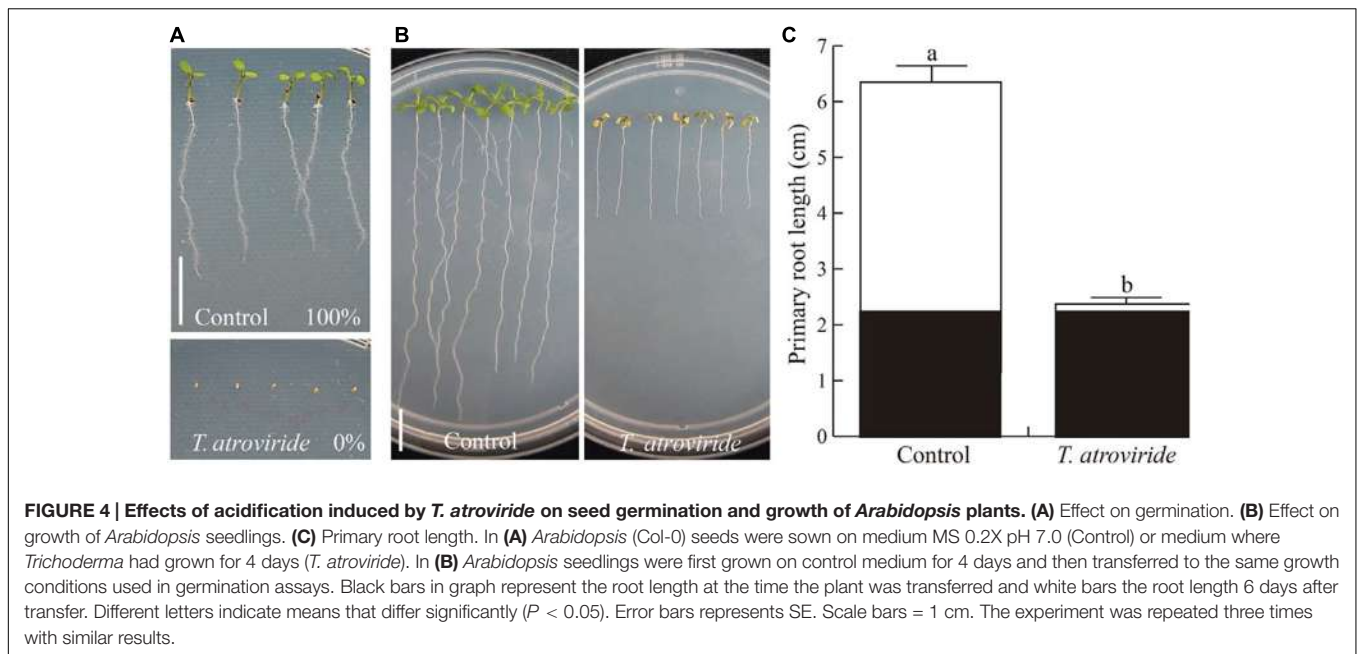
To study the effect of *Trichoderma* induced-acidification on plant growth and development, *Arabidopsis* seeds or seedlings were sown or transferred, respectively, onto 0.2X MS growth medium where *Trichoderma* had grown. Interestingly, germination of *Arabidopsis* seeds sown on plates where *Trichoderma* had grown for 96 h was completely inhibited, in contrast with germination on control plates where all seeds germinated and seedlings developed normally (Figure 4A). Similar results were observed in *Arabidopsis* seedlings in transfer assays in which 4 days old *Arabidopsis* seedlings grown on MS 0.2X were transferred to control media or media where *T. atroviride* had been grown, and allowed to grow for 6 additional days. In this case, we observed that *Arabidopsis* primary root growth and overall plant development were inhibited in *Trichoderma*-treated media, as compared with the continuing growth observed for control plants (Figures 4B,C). Moreover, when the experiment was repeated allowing *Trichoderma* to grow on a cellophane sheet for 18, 24, 30, or 36 h, we observed a gradual plant response. Evident inhibition was observed when plants were transferred onto media where *Trichoderma* had grown for 30 h, and growth was completely inhibited six hours later (Supplementary Figure S3A). Similarly, *Arabidopsis* seed germination occurred when sown on media where *Trichoderma* had been grown for 30 h but growth stopped almost immediately,

and no germination was observed by 36 h (Supplementary Figure S3B).

To determine if plant growth repression was indeed due to changes in the media conditions provoked by *Trichoderma*, we performed another experiment, in which *T. atroviride* was grown on un-buffered MS (0.2X) medium with initial pH 7 on a side of the plates for 48 h, time in which the growth medium has not been completely acidified by *Trichoderma*, and then *Arabidopsis* seeds were germinated and allowed to grow on the opposite side of the Petri dish. Interestingly, in seedlings that were grown under this condition, root growth orientation was affected, avoiding the area influenced by *Trichoderma*, compared with the normal vertical root growth of untreated seedlings (Supplementary Figure S3C). These results indicate that plants may sense the gradual changes in pH and adjust their root growth to escape from strongly acidic conditions.

The Growth Repressing Effects of *Trichoderma* on *Arabidopsis* are Associated with Acidification

All our findings on the root response of *Arabidopsis* to *Trichoderma*, were tightly correlated with the reported effects of low pH on plants (Koyama et al., 2001; Kang et al., 2013; Kobayashi et al., 2013). Thus, we evaluated the growth of plants in interaction with *Trichoderma* in pH-buffered media. Under these conditions, primary root growth of *Arabidopsis* seedlings co-cultivated with *Trichoderma* was not inhibited at all, as compared to control plants without *Trichoderma* (Figure 5A). Moreover, lateral root emergence was strongly stimulated, with 7–8-fold more lateral roots than in plants without *Trichoderma*, which were also much longer than those in the control (Figures 5B,C). Similar results were obtained in experiments in which *Arabidopsis* seeds were directly germinated (Supplementary Figure S4) or seedlings transferred (Supplementary Figure S5) to buffered medium (pH 7) where *Trichoderma* had been grown. Thus, buffering the medium eliminated the negative effects caused by *Trichoderma* on un-buffered media. In addition, we tested the toxic effects of low pH provoked by *T. atroviride* on *Arabidopsis* primary roots, to determine if it could be responsible for the observed growth inhibition. For this purpose, we analyzed cell viability by monitoring the expression of the *H2B::YFP* reporter construct (Figure 6A), which is specifically expressed in the nuclei of living cells (Boisnard-Lorig et al., 2001), and by using a vital staining with propidium iodide, by confocal microscopy. Further, as root growth is maintained by the SCN, which includes cells of the QC in the root apical meristem (van den Berg et al., 1997; Bennett and Scheres, 2010), we also followed the status of the QC by monitoring the expression of the reporter construct *WOX5::GFP* (Figure 6B). Finally, we analyzed the expression of the cell division marker *CyCB1::uidA* (Figure 6C), which is expressed only in cells in the G2/M transition of the cell cycle in the primary root meristem (Colón-Carmona et al., 1999). In all cases, the expression of each reporter construct was lost in the primary root meristem of plants grown on un-buffered medium in the presence of *Trichoderma*, correlating



with primary root growth inhibition (Figures 6A–C) and a clear pH drop (Figure 6D). Together, these data indicate that media acidification by *T. atroviride* strongly affects cell viability and cell division in primary roots, consequently impairing meristem functionality.

Stop1 Response to *T. atroviride* Supports the Role of pH in the Plant–*Trichoderma* Communication

The *Arabidopsis* mutant *stop1* (sensitive to proton rhizotoxicity 1) is well-known to be hypersensitive to low pH (Iuchi et al., 2007; Sawaki et al., 2009). Therefore, we evaluated whether *stop1* was also oversensitive to *T. atroviride* or not. Interestingly, in the presence of *Trichoderma*, the primary root of the *stop1* mutant stopped growing much earlier than WT *Arabidopsis* seedlings (Figures 7A,B), but root bending was not observed (Figure 7B). It is likely that the root tip of the *stop1* mutant could not bend or form a hook, because of its greater sensitivity to low pH. Indeed, the primary root tip of the mutant showed clear signs of deterioration. This sensitivity was more clearly confirmed in two independent experiments in which *T. atroviride* had been grown for 27 h on the plant growth media supplied or not with MES buffer (Figure 8). As shown in Figure 8, primary root growth of the *stop1* mutant was significantly reduced both at 10-day (Figure 8A) and 3-days after transfer (dat) (Figure 8B). In both cases exposure to *T. atroviride* resulted in primary root growth similar to that observed at pH 4.7. In addition, we determined the effects of these treatments on cell division and elongation by measuring the primary root meristem size and length of fully developed cortical cells at the differentiation zone of 5 days old WT and *stop1* *Arabidopsis* seedlings 48 h after transfer. Strong primary root growth inhibition of WT and *stop1* seedlings under low pH (4.7) and *T. atroviride* treatment correlated

with smaller cortical cells and a smaller primary root meristem (Supplementary Figure S7). None of the negative effects caused by *Trichoderma* on the *stop1* mutant on un-buffered media was observed when media was buffered with MES (Figure 8 and Supplementary Figure S6). The sensitivity of the *stop1* mutant to *Trichoderma* indicates that the transcription factor STOP1 is involved in mediating the *Arabidopsis* root responses to media acidification by *T. atroviride*.

DISCUSSION

The beneficial effects of *Trichoderma* on plants such as stimulation of growth, nutrient uptake, induction of defense responses, and indirectly due to its mycoparasitic activity have been widely documented (Altomare et al., 1999; Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Shores et al., 2010; Contreras-Cornejo et al., 2013; López-Bucio et al., 2015). In this study, we show that *Arabidopsis* growth promotion is clearly observed during the early stages of the interaction and that acidification by *Trichoderma* plays an essential role in the *Trichoderma*-plant interaction.

Growth promotion effects of *Trichoderma*, reflected in root branching patterns and its correlation with plant biomass production have been studied to some extent but are not yet well understood. The participation of auxins in modulating these effects is supported by the induction of the expression of the auxin-inducible marker gene *DR5:uidA* in roots and shoots of WT plants and by the reduced response of *Arabidopsis* mutants affected in auxin transport or signaling to *Trichoderma virens* (Contreras-Cornejo et al., 2009). Although *Trichoderma* produces auxins and other diffusible compounds, which may modulate plant growth and development, the whole phytostimulation program may not solely or completely be

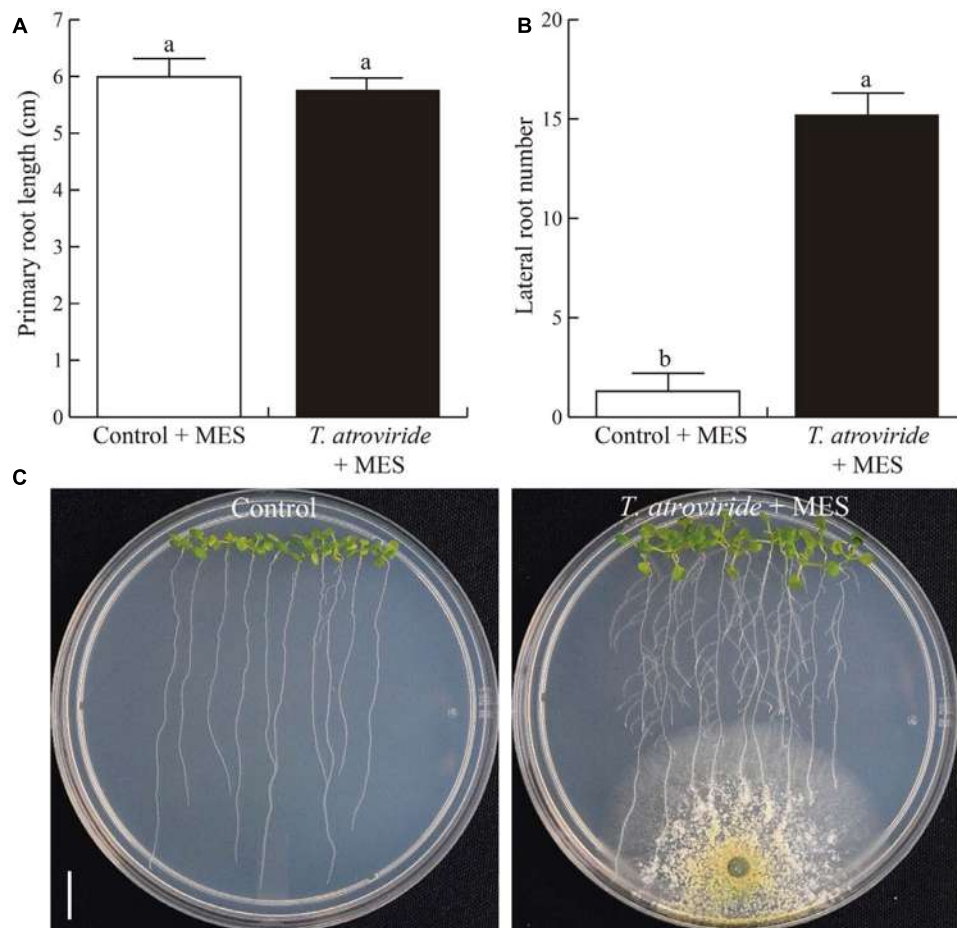


FIGURE 5 | Effects of *T. atroviride* inoculation on *Arabidopsis* growth under buffered medium. (A) Primary root length. (B) Lateral root number.

(C) Representative photographs of *Arabidopsis* seedlings co-cultivated with *Trichoderma*. *Arabidopsis* seedlings were germinated and grown on MS 0.2X medium buffered with MES 0.12%, after 5 days *T. atroviride* was inoculated at the opposite side of the plate and grown for 4 additional days. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). Error bars represents SE. Scale bar = 1 cm. The experiment was repeated three times with similar results.

explained by an auxinic mechanism, since IAA production is strain dependent and can be affected by diverse external stimuli (Nieto-Jacobo et al., 2017). Furthermore, some *Trichoderma* strains inhibit the auxinic root response of *Arabidopsis* primary roots (Nieto-Jacobo et al., 2017). In this regard, recent findings suggest that growth promotion induced by *Trichoderma* during the early plant–*Trichoderma* interaction stages could be attributed mostly to volatile organic compounds (VOCs) more than to the release of auxins or other diffusible compounds by the fungus. Exposure of plants to VOCs of different *Trichoderma* species have been found to stimulate plant growth, chlorophyll content, and plant size and biomass, which could be correlated with an enhanced soil exploratory capacity, better rooting and an enhanced capacity to take up nutrients and water (Hung et al., 2013; Contreras-Cornejo et al., 2014b; Lee et al., 2016; Nieto-Jacobo et al., 2017). It is noteworthy, that we found that longer interaction times with *Trichoderma* had clear detrimental effects on primary roots compared with untreated plants, such as root tip bending and growth inhibition, which correlate

with anthocyanin-like pigmentation of leaves and the eventual development of leaf chlorosis. Anthocyanin production in leaves has been found to occur as consequence or parallel effect of plant defense induction in response to *Trichoderma* (Contreras-Cornejo et al., 2011). Based on our findings, we suggest that anthocyanin accumulation could be related with a plant response to acidification by *Trichoderma* rather than to the induction of the plant defense response.

Rhizosphere acidification by *Trichoderma* spp. particularly *Trichoderma harzianum* strain T-22, has been reported in a couple of studies, one of them performed by Altomare et al. (1999), which investigated the fungal capacity to solubilize, *in vitro*, insoluble or sparingly soluble minerals by acidification of the medium. In their report the authors indicated that *Trichoderma* acidified the medium, but concluded that acidification was not the major mechanism of solubilization of insoluble minerals. Similarly, Sofo et al. (2012) found that *T. harzianum* T22 acidified the growth medium and that this may account for its beneficial effects on plants under hostile growth

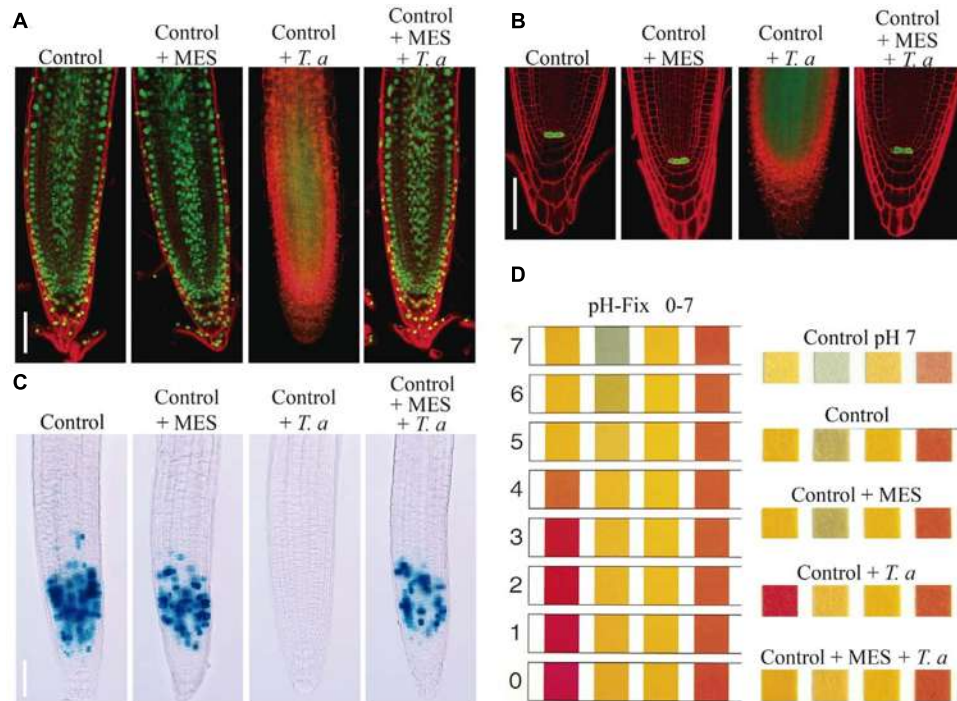


FIGURE 6 | Acidification induced by *T. atroviride* impairs the *Arabidopsis* root meristem functionality. (A) Expression of vital marker *H2B::YFP*. **(B)** Expression of the root quiescent center (QC) marker *WOX5::GFP*. **(C)** Expression of the cell division marker *CycB1::uidA*. **(D)** Estimated pH on the different growth conditions. Five-day-old seedlings of different transgenic lines used were transferred to the indicated treatments and analyzed 24 h later. Photographs show representative images of at least 10 seedlings analyzed per experiment. Scale bars = 50 μ m. These experiments were repeated twice with similar results.

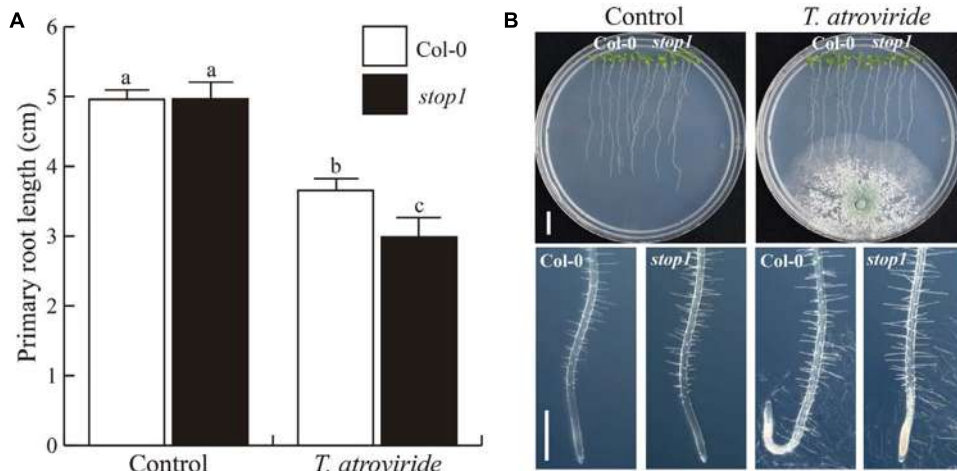


FIGURE 7 | Effect of *T. atroviride* on growth of *Arabidopsis* WT and *stop1* mutants. (A) Six-day-old *A. thaliana* WT seedlings and *stop1* mutant were co-cultivated with 1×10^6 spores of *T. atroviride*, by placing the fungus on the opposite side of the Petri plate, where seeds were sown. **(A)** Effect on primary root length. **(B)** Photographs of WT and *stop1* seedlings. Different letters indicate means statistically different at $P < 0.05$. Error bars represent SE. Scale bars = 1 cm and 500 μ m. This experiment was repeated three times with similar results.

conditions. More recently, medium acidification by *T. atroviride* and *T. virens* was also observed in co-cultivation experiments with *Arabidopsis*, a phenomenon that was correlated with the plant promoting effects exerted by *Trichoderma* on *Arabidopsis* seedlings (Contreras-Cornejo et al., 2016).

It is known that plants can naturally acidify the rhizosphere to improve nutrient availability or uptake, and this may be particularly relevant in alkaline calcareous soils in which phosphate and iron are very limiting, but only a slight acidification can be beneficial for plant growth and development

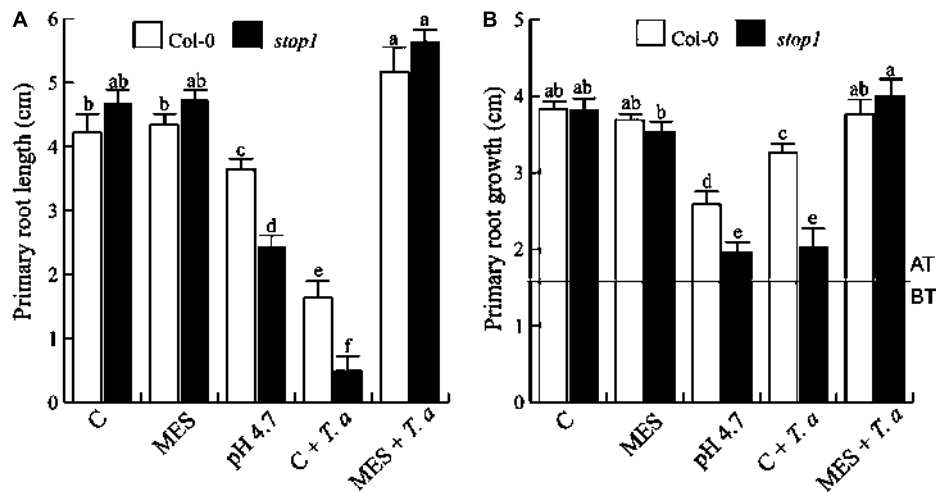


FIGURE 8 | Sensitivity of *stop1* to acidification induced by *T. atroviride*. (A,B) Primary root length. (A) Seeds were germinated and grown directly under the indicated conditions or (B) on a pH 7.0 medium for 4 days and then transferred to the indicated treatments and analyzed 3 days after transfer. BT and AT in graph (B) indicate the root growth before and after transfer, respectively. Different letters in graphic indicate means statistically different at $P < 0.05$. This experiment was repeated twice with similar results.

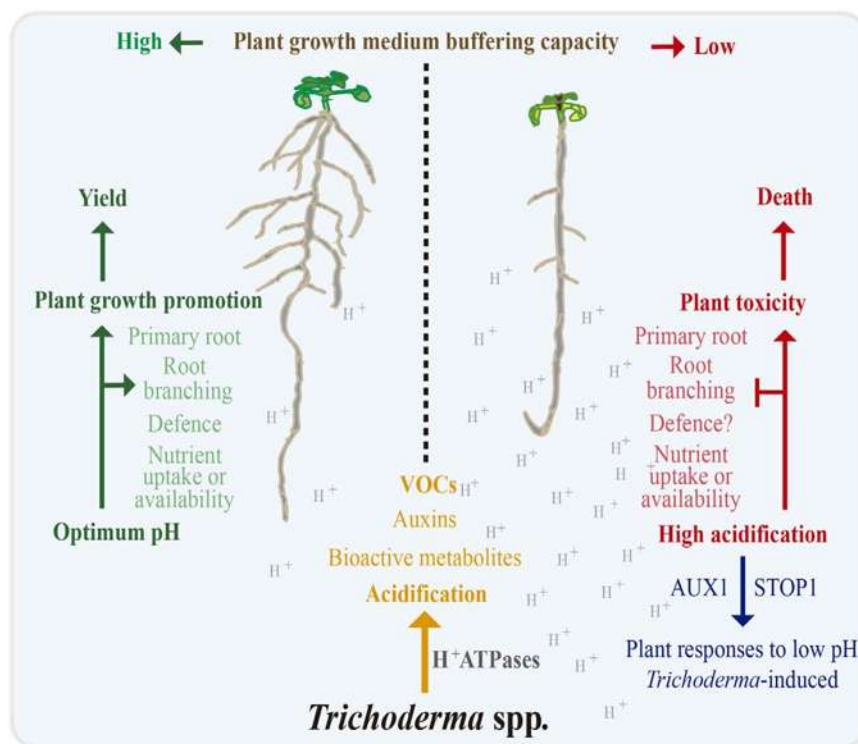


FIGURE 9 | Model for the interaction of *Trichoderma* with plants. Rhizosphere acidification by *Trichoderma* together with auxins, VOCs, and other bioactive molecules reconfigure root architecture and may promote or impair plant growth depending upon soil pH conditions. STOP1 and AUX1 likely act in a root pH sensing pathway to adapt the root system to the acidification likely via lateral root production.

in soils with neutral or slightly acid pHs (Marschner, 1991; Hinsinger et al., 2003), while strong acidification negatively affects plant growth. Here, we found that *T. atroviride* strongly acidified the medium, through a process mediated at least in part

by H^+ -ATPases, because the addition of sodium orthovanadate (Na_3VO_4), an ATPase inhibitor reduced acidification in a dose-dependent manner. Our data indicate that media acidification by *Trichoderma* has a clear detrimental effect on *Arabidopsis*,

affecting plant development, from seed germination to root and shoot growth. These findings are consistent with the effects of low pH reported in various studies, where acidity was found to affect *Arabidopsis* root growth (Koyama et al., 1995, 2001; Kang et al., 2013), and inhibit seed germination of different plants (Fan and Li, 1999; Zeng et al., 2005). Thus, the inhibitory effects observed on *Arabidopsis* seedlings in co-cultivation with *T. atroviride* may be explained by a high level of acidification. Furthermore, when the *Arabidopsis*-*Trichoderma* experiments were carried out under buffered conditions, a clear increase in growth promotion by *Trichoderma* was observed, and the negative effects (i.e., germination and growth inhibition) were negligible, restoring completely plant growth. These results correlated with the expression of different markers used to test root meristem functionality as well as with pH levels observed under the different growth conditions. Similar detrimental effects on *Arabidopsis* root growth were recently reported for certain *Trichoderma* strains (Nieto-Jacobo et al., 2017). Although, the authors associated this response with an impaired auxin signaling, in our view, root growth repression may rather be a consequence of loss of root meristem functionality caused by acidification.

Low pH stress is related with Al toxicity, because at low pH the highly toxic Al^{3+} severely affects plant growth. However, increasing evidence supports that toxic H^+ and Al^{3+} elicit different adaptive mechanisms in plants (Shavrukov and Hirai, 2016). In bacteria and fungi, different pH-signaling pathways have been identified (Arst and Peñalva, 2003; Yuan et al., 2008), but in plants no specific mechanisms for pH sensing have been reported. The transcription factor *STOP1* is one of the very few regulators of gene expression in plant responses to Al^{3+} and low pH stress (Iuchi et al., 2007; Sawaki et al., 2009). Accordingly, we found that the *Arabidopsis* mutant *stop1* showed higher root growth repression when co-cultivated with *Trichoderma* than WT seedlings, evidenced by a shorter primary root and absence of root bending or hook in the root tip. Such oversensitivity was confirmed in experiments where the WT and the *stop1* mutants were grown in medium supplemented with MES buffer, in which *Trichoderma* had been grown, supporting a role of pH as a signal in the interaction of *Trichoderma* with plants. Taken together, these results suggest that the pH status could be sensed by roots to activate a signaling cascade that modulates root growth and its orientation, and possibly, to activate lateral root initiation.

A recent report demonstrated that the inhibitory effects of low pH on root growth are mediated by an adaptive plant response rather than by a direct toxic effect of H^+ , because direct root exposure to low pH, suppressed root growth and caused high cell death, while roots exposed gradually to the low pH stress stopped growth but maintained cell viability (Graças et al., 2016). Although the molecular components mediating the root responses to pH or their possible link with auxin signaling are currently unknown, the idea of pH as a signal in plant-microbe interactions is supported by global gene expression analyses, which showed that low pH alters the expression of genes related to auxin signaling, pathogen elicitors, and defense-associated hormones. It is possible that pH-sensing and Ca^{2+} signaling may be mediated by proton effects on inward rectifying

K^+ -channels or via a pH specific sensor (Lager et al., 2010). The fact that the *Arabidopsis aux1-7* mutant is hypersensitive to low pH, suggests an important role of auxin transport in root growth response to acidification (Inoue et al., 2016), and since the same mutant had a reduced response to *T. virens* inoculation in terms of shoot biomass production and lateral root development (Contreras-Cornejo et al., 2009), we propose that normal auxin transport is important for plant growth and root adaptation to low pH following *Trichoderma* inoculation. In addition, the nitrate transporters *NRT1.1* and *OsNRT2.3b* are involved in H^+ resistance in *Arabidopsis* and rice, respectively, a phenomenon that depends on their nitrate uptake activity (Fang et al., 2016; Fan et al., 2016b). The relationship of *Trichoderma* with nitrate nutrition of plants represents an interesting research avenue to follow.

CONCLUSION

This report provides compelling evidence that root sensing of pH mediates the interaction of *Trichoderma* with plants. Rhizosphere acidification by *Trichoderma* may influence the root developmental response to auxins, VOCs, and other bioactive molecules and stimulate or repress different plant processes in a plant specific manner and depending upon the soil characteristics (Figure 9). We have further identified STOP1 as a critical factor in mediating root adaptation to fungal-induced acidification, which might act in a pathway involving auxin signaling and transport, where AUX1 links acidity to growth responses and plant adaptation to H^+ stress. These data may help in the management of *Trichoderma* based strategies for crop improvement, and may aid in the identification of more efficient *Trichoderma*-strains for their use in bio-fertilizers or bio-inoculant formulation to increase plant growth and yield.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RP-F designed and performed experiments, collected, and interpreted data; AG-V performed experiments; SE-R performed experiments and provided technical support; JL-B and AH-E: designed experiments and contributed to data interpretation. RP-F, JL-B, and AH-E wrote the manuscript.

FUNDING

This work was financially supported by a grant from SEP-CONACYT (236825). RP-F is indebted to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for a postdoctoral fellowship.

ACKNOWLEDGMENTS

José Irepan Reyes-Olalde and León Francisco Ruíz Herrera are gratefully acknowledged for technical support for confocal

microscopy analysis. We are also grateful to José Pedro Martínez Hernández for his kind technical support for *Trichoderma* management and Stefan de Folter for helpful advice. We thank Javier Mora-Macías and the Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) for providing *Arabidopsis* seeds.

REFERENCES

- Alkan, N., Espeso, E. A., and Prusky, D. (2013). Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1012–1025. doi: 10.1089/ars.2012.5062
- Altomare, C., Norvell, W. A., Bjorkman, 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.
- Arst, H. N., and Peñalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19, 224–231. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00052-0
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., and Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7, 249–260.
- Bennett, T., and Scheres, B. (2010). Root development—two meristems for the price of one? *Curr. Top. Dev. Biol.* 91, 67–102. doi: 10.1016/S0070-2153(10)91003-X
- Boisnard-Lorig, C., Colon-Carmona, A., Bauch, M., Hodge, S., Doerner, P., Bancharel, E., et al. (2001). Dynamic analyses of the expression of the HISTONE:YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell.* 13, 495–509. doi: 10.1105/tpc.13.3.495
- Brady, N. C., and Weil, R. R. (1999). In “*Nature and Properties of Soils.*” Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.
- Brady, N. C., and Weil, R. R. (2010). *Elements of the Nature and Properties of Soils.* Hoboken, NJ: Pearson Education International.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P. (1999). Spatiotemporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20, 503–508. doi: 10.1046/j.1365-313x.1999.00620.x
- Contreras-Cornejo, H. A., López-Bucio, J. S., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, A., et al. (2015). Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 701–710. doi: 10.1094/MPMI-01-15-0005-R
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L. I., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. (2014a). *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolyte production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 503–514. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0265-R
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., and López-Bucio, J. (2011). *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signal. Behav.* 6, 1554–1563. doi: 10.4161/psb.6.10.17443
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., del-Val, E., and Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:fiw036. doi: 10.1093/femsec/fiw036
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L. I., Cortés-Penagos, C., and 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. doi: 10.1104/pp.108.130369
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L. I., Herrera-Estrella, A., and López-Bucio, J. (2014b). The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil.* 379, 261–274. doi: 10.1007/s11104-014-2069-x
- Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castro, R., and López-Bucio, J. (2013). “Promotion of plant growth and the induction of systemic defence by *Trichoderma*: physiology, genetics and gene expression,” in *Trichoderma: Biology and Applications*, eds P. K. Mukherjee, B. A. Horwitz, U. S. Singh, M. Mukherjee, and M. Schmoll (Wallingford: CABI), 173–194.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., et al. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637
- Fan, H. B., and Li, C. R. (1999). Effects of simulated acid rain on seedling emergence and growth of five broad-leaved species. *J. For. Res.* 10, 83–86. doi: 10.1007/BF02855532
- Fan, W., Lou, H. Q., Yang, J. L., and Zheng, S. J. (2016a). The roles of STOP1-like transcription factors in aluminum and proton tolerance. *Plant Signal. Behav.* 11:e1131371. doi: 10.1080/15592324.2015.1131371
- Fan, X., Tang, Z., Tan, Y., Zhang, Y., Luo, B., Yang, M., et al. (2016b). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 7118–7123. doi: 10.1073/pnas.1525184113
- Fang, X. Z., Tian, W. H., Liu, X. X., Lin, X. Y., Jin, C. W., and Zheng, S. J. (2016). Alleviation of proton toxicity by nitrate uptake specifically depends on nitrate transporter 1.1 in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 211, 149–158. doi: 10.1111/nph.13892
- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., et al. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209, 1496–1512. doi: 10.1111/nph.13725
- Graças, J. P., Ruiz-Romero, R., Figueiredo, L. D., Mattiello, L., Peres, L. E. P., and Vitorello, V. A. (2016). Root growth restraint can be an acclimatory response to low pH and is associated with reduced cell mortality: a possible role of class III peroxidases and NADPH oxidases. *Plant Biol.* 18, 658–668. doi: 10.1111/plb.12443
- Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 96, 190–194. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56. doi: 10.1038/nrmicro797
- Hashem, A., Allah, E. F., Alqarawib, A. A., Al Huqaila, A., and Egamberdieva, D. (2014). Alleviation of abiotic salt stress in *Ochradenus baccatus* (Del.) by *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier. *J. Plant Interact.* 9, 857–868. doi: 10.1080/17429145.2014.983568
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17–25. doi: 10.1099/mic.0.052274-0
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., and Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil.* 248, 43–59. doi: 10.1023/A:1022371130939
- Hung, R., Lee, S., and Bennett, J. W. (2013). *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effects of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol.* 6, 19–26. doi: 10.1016/j.funeco.2012.09.005
- Husson, O. (2013). Redox potential (Eh) and pH as drivers of soil/plant/microorganism systems: a transdisciplinary overview pointing to integrative opportunities for agronomy. *Plant Soil* 362, 389–417. doi: 10.1007/s11104-012-1429-7
- Inoue, S. I., Takahashi, K., Okumura-Noda, H., and Kinoshita, T. (2016). Auxin influx carrier AUX1 confers acid resistance for *Arabidopsis* root elongation through the regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell Physiol.* 57, 2194–2201. doi: 10.1093/pcp/pcw136
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., et al. (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 9900–9905. doi: 10.1073/pnas.0700117104

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00822/full#supplementary-material>

- Kang, T. T., Kari, N. A., Maxwell, B. H., and Soquela, J. D. (2013). The effect of various pH levels on the root growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Expedition* 2. Available at: <http://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/article/view/184145>
- Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Shaff, J. E., Ohta, H., Kochian, L. V., et al. (2013). Molecular and physiological analysis of Al³⁺ and H⁺ rhizotoxicities at moderately acidic conditions. *Plant Physiol.* 163, 180–192. doi: 10.1104/pp.113.222893
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., and Piñeros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459–493. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141655
- Kottb, M., Gigolashvili, T., Grobkinsky, D., and Piechulla, B. (2015). *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Front. Microbiol.* 6:995. doi: 10.3389/fmicb.2015.00995
- Koyama, H., Toda, T., and Hara, T. (2001). Brief exposure to low-pH stress causes irreversible damage to the growing root in *Arabidopsis thaliana*: pectin-Ca interaction may play an important role in proton rhizotoxicity. *J. Exp. Bot.* 355, 361–368. doi: 10.1093/jexbot/52.355.361
- Koyama, H., Toda, T., Yokota, S., Zuraida, D., and Hara, T. (1995). Effects of aluminium and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant Cell Physiol.* 36, 201–205. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078740
- Lager, I., Andréasson, O., Dunbar, T. L., Andreasson, E., Escobar, M. A., and Rasmusson, A. G. (2010). Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant Cell Environ.* 33, 1513–1528. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02161.x
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., and Bennett, J. W. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol. Biotechnol.* 3:7. doi: 10.1186/s40694-016-0025-7
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., and Herrera-Estrella, A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hort.* 196, 109–123. doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.043
- Malamy, J. E., and Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33–44.
- Marschner, H. (1991). Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant Soil.* 134, 1–24. doi: 10.1007/BF00010712
- Mastouri, F., Bjorkman, T., and Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100, 1213–1221. doi: 10.1094/PHYTO-03-10-0091
- Mastouri, F., Bjorkman, T., and Harman, G. E. (2012). *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1264–1271. doi: 10.1094/MPMI-09-11-0240
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., et al. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Front. Plant Sci.* 8:102. doi: 10.3389/fpls.2017.00102
- Ottenschlager, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R. P., Sandberg, G., Ishikawa, H., et al. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2987–2991. doi: 10.1073/pnas.0437936100
- Prusky, D., Barad, S., Ment, D., and Bi, F. (2016). The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens. *Isr. J. Plant Sci.* 63, 22–30. doi: 10.1080/07929978.2016.1151290
- Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., and Kumar, J. (2013). Salinity tolerant *Trichoderma harzianum* reinforces NaCl tolerance and reduces population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress conditions. *Arch. Phytopathology Plant Protect.* 46, 1442–1467. doi: 10.1080/03235408.2013.769316
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., and Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* 131, 15–26. doi: 10.1007/s10658-011-9782-6
- Samolski, I., Rincon, A. M., Pinzon, L. M., Viterbo, A., and Monte, E. (2012). The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158, 129–138. doi: 10.1099/mic.0.053140-0
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., et al. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811–814. doi: 10.1038/nature05703
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., et al. (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* 150, 281–294. doi: 10.1104/pp.108.134700
- Shavrukov, Y., and Hirai, Y. (2016). Good and bad protons: genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 15–30. doi: 10.1093/jxb/erv437
- Shores, M., Harman, G. E., and Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 1–23. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450
- Singh, A., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., and Kumar, V. (2014). Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. *Virol. Mycol.* 3:127. doi: 10.4172/2161-0517.1000127
- Sofa, A., Tataranni, G., Xiloyannis, C., Dichio, B., and Scopa, A. (2012). Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6® (*Prunus cerasus* × *Prunus canescens*) rootstock. *Environ. Exp. Bot.* 76, 33–38. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.10.006
- Stat Soft Inc (2011). *STATISTICA, version 10*. Available at: www.statsoft.com
- Trushina, N., Levin, M., Mukherjee, P. K., and Horwitz, B. A. (2013). PaC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics* 14:138. doi: 10.1186/1471-2164-14-138
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287–289. doi: 10.1038/36856
- von Uexküll, H. R., and Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil.* 171, 1–15. doi: 10.1007/BF00009558
- Yokota, S., and Ojima, K. (1995). Physiological responses of root tips of alfalfa to low pH and aluminium stress in water culture. *Plant Soil.* 171, 163–165. doi: 10.1007/978-94-011-0221-6_46
- Yuan, Z. C., Liu, P., Saenkham, P., Kerr, K., and Nester, E. W. (2008). Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J. Bacteriol.* 190, 494–507. doi: 10.1128/JB.01387-07
- Zeng, Q. L., Huang, X. H., and Zhou, Q. (2005). Effect of acid rain on seed germination of rice, wheat and rape. *Environ. Sci.* 26, 194–197.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Pelagio-Flores, Esparza-Reynoso, Garnica-Vergara, López-Bucio and Herrera-Estrella. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**Jasmonic acid-ethylene crosstalk via ETHYLENE
INSENSITIVE 2 reprogrammes Arabidopsis root system
architecture through nitric oxide accumulation.**

Journal:	<i>Journal of Plant Growth Regulation</i>
Manuscript ID	JPGR-17-0244.R1
Manuscript Type:	Original Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Barrera-Ortiz, Salvador; Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Instituto de investigaciones Químico Biologicas Garnica-Vergara, Amira; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Esparza-Reynoso, Saraí; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas García-Cárdenas, Elizabeth; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Raya-Gonzalez, Javier; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Ruiz-Herrera, León; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas López-Bucio, José; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Keywords:	Arabidopsis, Jasmonic acid, Nitric oxide, Root development, Phytohormones

SCHOLARONE™
Manuscripts

03-Aug-2017

Prof. Jutta Ludwig-Müller

Editor in Chief

Journal of Plant Growth Regulation

Dear Prof. Ludwig-Müller:

Please find enclosed a revised version of manuscript (JPGR-17-0244) entitled “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”. The former title was “Jasmonic acid reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* signaling”, which was changed following recommendation by the Editor and the Reviewers.

Please note that minor changes were applied to figures 6, 7 and S2 according to the suggestion of Reviewer 1, who pointed out that it is better to use “Inhibition of primary root length by JA (percentage)” and “Promotion of lateral root density by JA (percentage)” to gain better comparison between wild type and the mutants in response to JA or other chemicals treatments.

The changes to the manuscript can be appreciated in colored text.

I take this opportunity for acknowledge the time and effort of the editors and the reviewers for the kind comments and suggestions that helped us to improve the manuscript. Hopefully, this revised version is now acceptable.

Sincerely,

José López Bucio

Reviewing Editor's Comments to Author:

Reviewing Editor

Comments to the Author:

The manuscript (ID JPRG-17-0244) has now been seen by the two reviewers who saw the first version of the paper. As you can see from the reviews attached, their comments are quite positive and no more experiments are requested.

However, still some concerns remain (including change of the title, which I strongly support) that should be addressed in a new version for a better understanding of the study.

In a revised version the comments made by the reviewers must be carefully addressed using the track change feature.

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1

Comments to the Author

I reviewed the previous version of the manuscript before and raised some points regarding the conclusions derived from the study and the presented manner of the data. Although the authors made great changes in the revised version, they did not completely address the problems I concerned. Some comments on the current version are described in the following.

1. I pointed out that it is better to use "Inhibition of primary root length by JA (percentage)" and "Promotion of lateral root density by JA (percentage)" to gain better comparison between wild type and the mutants in response to JA or other chemicals treatments. However, the authors did not solve the problem in Figures 6~7, especially, in supplemental Fig. S2. Thus, they may come up with inaccurate conclusions.

We agree with the reviewer, thus minor changes were applied to figures 6, 7 and S2 according to the suggestion of use "Inhibition of primary root length by JA (percentage)" and "Promotion of lateral root density by JA (percentage)".

2. The figure legends in Figures 6~7 did not match the data. For example, Fig. 6a depicts the inhibition of primary root length by JA, rather than primary root length

We have updated the legends of Figs. 6, 7 and S2, according to the changes made and taking into account this suggestion.

3. In Fig. 7, the double mutant *ein2-1jar1-1* showed phenotypic responses similar to *ein2-1* mutant under SNP treatment, which suggests that EIN2 may act in the downstream of JAR1-mediated signaling in response to NO effect. Thus, the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

authors should emphasize this regulation, leading to the conclusion in the title that the authors proposed.

We agree with this recommendation and changed the title as follows: “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”. The former title was “Jasmonic acid reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* signaling”, which was changed following recommendation by the Editor and the Reviewers.

Reviewer: 2

Comments to the Author

The revised version of the document had added considerable data to strengthen the work. However the title is rather misleading. Authors highlight only JA part and not its crosstalk to with ethylene as clearly mentioned in discussion (457-464). I would modify the title as "JA-ethylene crosstalk via EIN2 reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through NO accumulation".

We appreciate the new title suggested by this reviewer, which was taken into account for the current title of the manuscript: “Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation”.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

Full title: Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprogrammes *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation.

Full name of authors: Salvador Barrera-Ortiz, Amira Garnica-Vergara, Saraf Esparza-Reynoso, Elizabeth García-Cárdenas, Javier Raya-González, León Francisco Ruiz-Herrera, José López-Bucio.
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

Author to whom correspondence should be addressed:

Name: José López-Bucio.

Address: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

Telephone: 52 (443) 3265788, **Fax:** 52 (443) 3265788; **e-mail:** jlbucio@umich.mx.

To: Journal of Plant Growth Regulation

Section: Full paper

Abstract

Plant growth and development are tightly regulated by phytohormones, including jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), two canonical players in plant defense and in the control of root system architecture. Here, we show that JA inhibits primary root growth and promotes lateral root development while inducing nitric oxide (NO) accumulation in the wild-type (WT) primary root, but not in *jar1-1*, *coi1-1*, *myc2-1* and *myc2-2* *Arabidopsis* mutants defective in JA biosynthesis or response. NO-related mutants *nia1/nia2* and *Atnoa1* were indistinguishable in root architectural responses to JA when compared to WT seedlings and the developmental changes were apparently unrelated to reactive oxygen species (ROS) accumulation. Root growth inhibition by NO-donor sodium nitroprusside (SNP) was reduced in *coi1-1* mutants and NO accumulation induced the expression of the downstream repressors *JAZ1* and *JAZ10* at the differentiation and/or meristematic root regions. Comparison of growth of WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants further revealed a critical role of *ETHYLENE INSENSITIVE2* (*EIN2*) in mediating both JA-and NO root sensing. Our results suggest that NO mediates JA signaling during the configuration of the *Arabidopsis* root system architecture and that *EIN2* plays a role in this developmental program.

keywords: *Arabidopsis*, jasmonic acid, nitric oxide, root development, phytohormones.

Introduction

The fatty acid-derived plant hormone jasmonic acid regulates physiological and phenotypic plasticity as well as environmental adaptation. Besides being an inducer of plant defense, JA plays a key role in the configuration of the root system by inhibiting primary root growth and promoting lateral root formation (Staswick and others 1992; Chen and others 2011; Raya-González and others 2012).

Several molecular components are involved in JA-induced root architectural reprogramming. JA reduces root growth affecting both cell elongation and meristem activity, and represses the AP2-domain transcription factors PLETHORA1 (PLT1) and PLT2. This process requires the functioning of MYC2/JASMONATE INSENSITIVE1, a basic helix loop-helix transcription factor (Chen and others 2011; Gasperini and others 2015). In addition, the *Arabidopsis* F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1), which forms a functional E3 ubiquitin ligase SCF^{COI1} and acts as a JA receptor, plays a role in JA-induced lateral root formation (Xu and others 2002; Raya-González and others 2012).

The JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) proteins interact with TOPLESS (TPL) and NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA) to form a repressor complex that inhibits MYC2 activity in the absence of JA (Chini and others 2007; Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). However, when the levels of JA increase and upon binding to it, COI1 targets the JAZ repressors for proteolytic degradation, allowing JA-responsive transcriptional activation (Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). Regarding what is known on shoots, little is known about the cellular organization and regulation of the JAZ and other JA signaling components in roots.

Jasmonic acid and ethylene regulate a common set of plant responses to biotic stimuli and are frequently found to act in parallel. Both phytohormones are required for plant resistance to necrotrophic pathogens and defense related gene expression (Xu and others 1994; Penninckx and others 1998; Lorenzo and others 2003), while acting as negative players in mutualistic plant-fungus symbiosis (Plett and others 2014). In roots, ethylene may also inhibit cell

99 proliferating activity of meristems, since *CULLIN3* genes regulate cell division
100 through the canonical ethylene signal transduction pathway that incorporates
101 CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1, ETHYLENE INSENSITIVE2, and
102 ETHYLENE INSENSITIVE3 as well as a phosphorelay pathway based on
103 receptor histidine kinases and the type B cytokinin response regulators
104 (Thomann and others 2009; Street and others 2015).
105 Some secondary metabolites, such as the plant alkamides, influence JA
106 homeostasis. The alkamides are fatty acid amides naturally present in many
107 plant families, and are structurally related to *N*-acyl-*L*-homoserine lactones
108 (AHLs) from Gram-negative bacteria and to *N*-acylethanolamines (NAEs) from
109 plants and mammals (Ramírez-Chávez and others 2004; Ortiz-Castro and
110 others 2008; Blancaflor and others 2014; Greger 2016). Global analysis of gene
111 expression in *Arabidopsis* seedlings in response to the strongly active alkamide
112 *N*-isobutyl decanamide, revealed an overrepresentation of genes encoding
113 enzymes for JA biosynthesis, which occurred in parallel with JA and NO
114 accumulation, indicating the possible link between these two plant signals
115 (Méndez-Bravo and others 2011).
116 Nitric oxide (NO) is a free radical present in most plant organs, where it controls
117 a wide range of environmental and physiological functions acting as a cellular
118 messenger (Wendehenne and Hancock 2011). In *Arabidopsis* roots, NO
119 reduces cell division and elongation (Fernández-Marcos and others 2012), and
120 activates lateral root formation (Campos-Cuevas and others 2008; Méndez-
121 Bravo and others 2010; Schlicht and others 2013). The precise role of NO and
122 downstream targets in regulating the configuration of the root system and its
123 relationship with jasmonic acid and ethylene signaling still awaits clarification.
124 Therefore, a major current goal is to uncover new genetic elements integrating
125 the hormonal plant response to NO sensing.
126 Here, we report that JA induces NO production in *Arabidopsis* primary roots in a
127 *JAR1*, *COI1*, and *MYC2*-dependent manner, and activates *JAZ1* and *JAZ10* as
128 downstream targets during root architecture configuration. Moreover, we identify
129 *ETHYLENE INSENSITIVE2* as an important player in JA-induced primary root
130 growth and NO accumulation. Our results suggest that NO mediates [JA-ET](#)
131 [crosstalk via EIN2](#) and that this interaction is important for root morphogenesis.

132

133 Materials and methods

134

135 Plant material and growth conditions

136

137 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (Col-0), and mutant lines *coi1-1* (Feys
138 and others 1994), *jar1-1* (Staswick and others 1992), *myc2-1* (SALK_061267),
139 *myc2-2* (SALK_017005), *ein2-1* (Guzmán and Ecker 1990), *rcd1*
140 (SALK_116432), *nia1/nia2* (Wilkinson and Crawford 1993) and *Atnoa1* (Guo
141 and others 2003) were used for the different experiments. Generation of
142 *Arabidopsis ein2 jar1* double mutants was done by outcrossing *ein2-1* single
143 mutants with *jar1-1* pollen to obtain the F1 progeny and the corresponding
144 plants were allowed to self-fertilize to recover the F2 generation. Homozigous
145 *ein2 jar1* seedlings were identified upon the primary root resistance to both
146 jasmonic acid and ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
147 (ACC) in primary root growth assays, and were propagated for at least three
148 generations. *Arabidopsis* transgenic seedlings included *JAZ1/TIFY10A-GFP*
149 (Grunewald and others 2009) and *JAZ10-GFP* (Pilliteri and others 2011).

150 Seeds were surface sterilized with 95 % (v/v) ethanol for 4 min and 10% (v/v)
151 bleach for 4 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated
152 and grown on agar plates containing 0.2X MS medium. The MS medium
153 (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, catalogue no. M5524) was
154 purchased from Sigma. Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow
155 root growth along the agar surface and to allow unimpeded aerial growth of the
156 hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival AR-95 L)
157 with a photoperiod of 16 h of light/8 h darkness, light intensity of 300 μ mol and
158 temperature of 22 °C.

159

160 Selection of *Arabidopsis coi1-1* homozigous seedlings

161

162 For transfer experiments of WT and *coi1-1* seedlings, seeds were first sterilized
163 and germinated on 0.2X MS medium as described above. For *coi1-1* mutant
164 selection, 300 seeds from a *coi1-1/CO1* segregating population were screened

for sustained primary root growth in agar solidified MS 0.2X medium supplemented with 4 μ M JA by placing seeds on 100 cm² nutrient agar plates (20 seeds per plate). The seeds were distributed in two rows on the agar surface at a density of 1 seed/cm, stratified at 4 °C for 48 h, and then incubated at 22 °C. Putative JA-resistant mutants with long roots were selected and transferred to plates with the different treatments.

Analysis of growth

Arabidopsis root system was analyzed with a stereoscopic microscope (Leica, MZ6). All lateral roots emerged from the parent root were observed and registered with the 3X objective. Primary root length was determined for each root using a ruler. Lateral root density was determined by dividing the lateral root number value by the primary root length for each seedling. For all experiments, the data were statistically analyzed using STATISTICA 10.0 program (Dell StatSoft, Austin, Texas, USA). Univariate and multivariate analyses with Tukey's post hoc test were used for testing differences in growth and root development responses. Different letters were used to indicate means that differ significantly ($p < 0.05$).

Confocal microscopy

NO was monitored by incubating *Arabidopsis* seedlings with 10 μ M of the fluorescent probe DAF-2DA in 1 M Tris-HCl (pH 7.4). Living cells incorporate DAF-2DA, which subsequently is hydrolyzed by cytosolic esterases to release 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), which reacts with NO to produce the fluorescent triazole derivate triazolofluorescein (DAF-2T). General ROS were visualized with 10 μ M of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) a cell-permeable non-fluorescent probe that is de-esterified intracellularly and turns to highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation. JAZ1/TIFY10A-GFP and JAZ10-GFP seedlings were incubated with each fluorophore for 1 h in darkness, and washed three times for 20 min with fresh buffer. Fluorescence signals were detected using a confocal laser scanning microscope (Olympus

FV1200), and monitored with an argon blue laser with an excitation line from 488 to 568 nm and an emission window from 585 to 610 nm. Micrographs acquired with the confocal microscope were analyzed in ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For each treatment and line, fluorescence intensity was registered from 6 micrographs. Fluorescence intensity was quantified by determining green pixels in a defined area. An arbitrary unit value was obtained (AU= pixels μm^2) for each micrograph, and means were obtained from whole data sets.

Results

Jasmonic acid induces nitric oxide accumulation in *Arabidopsis* roots

As a first step to investigate the possible involvement of NO underlying JA regulation of root growth, we analyzed *in situ* levels and localization of NO by using the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) in seedlings grown in medium supplemented with increasing concentrations of JA. As expected, JA modified *Arabidopsis* root system architecture, by inhibiting primary root growth and increasing lateral root density (number of lateral roots (LR)/cm) in a dose dependent manner (Fig. 1a, b). The greatest JA concentration tested (8 μM) repressed root growth by 80%, whereas LR density was stimulated up to seven times respect to control conditions.

When primary roots of WT seedlings grown in medium lacking JA were loaded with DAF-2DA and analyzed by confocal microscope, NO was detected in several tissues and structures, including epidermal cells, root hairs, root elongation zone, root cap, and the quiescent center (QC) (Fig. 1c). Interestingly, the inhibition of root growth and enhanced LR formation in response to JA tightly correlated with the increased NO fluorescence in all these regions, and particularly at the primary root meristem (Fig. 1c). These data show that NO accumulates in *Arabidopsis* roots following JA application.

JA biosynthesis and signaling components mediate JA-induced root-growth inhibition and nitric oxide accumulation in primary roots

230

231 Several molecular components involved in JA-biosynthesis and response play a

232 role in root architecture reprogramming (Chen and others 2011; Raya-González

233 and others 2012). To evaluate at the genetic level the possible interaction

234 between JA and NO on root system architecture, we tested root growth

235 responses and changes in NO levels of *Arabidopsis* WT seedlings grown side

236 by side with *jar1-1* or *myc2-1* and *myc2-2* in media with or without JA.

237 Supplementation of 1 and 4 μ M JA to WT seedlings showed inhibition of

238 primary root growth that was reduced in *jar1-1* or in two *myc2* mutant lines

239 defective on two independent alleles (Figs. 2a and 3a). Besides to primary root

240 growth, *jar1-1*, *myc2-1* and *myc2-2* mutants showed insensitivity to JA effects in

241 promoting LR formation (Fig. 2b, and 3b), indicating that JA requires an intact

242 mechanism via JAR1 and MYC2 to modify root system architecture.

243 Accordingly, JA could induce NO production in WT primary root tissues, but not

244 in *jar1* or *myc2* mutants (Figs. 2c and 3c).

245 In another set of experiments, WT and homozygous *coi1-1* mutants were

246 compared for primary root growth repression in medium supplemented with 4

247 μ M JA. The strong resistance of the mutants to JA correlated with decreased

248 levels of NO accumulation at the root tip (Supplementary Fig. S1). Together,

249 these data suggest that *JAR1*, *COI1* and *MYC2* are required for NO production

250 in primary roots in response to JA.

251

252 **Jasmonic acid-induced changes in root growth occur independently of**

253 ***NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1***

254

255 NO levels in *Arabidopsis* are controlled by the activity of two nitrate reductases,

256 encoded by the *NIA1* and *NIA2* genes, and the *NITRIC OXIDE ASSOCIATED1*

257 (*AtNOA1*; Rockel and others 2002; Sudhamsu and others 2008). Given that JA

258 modulates root development by inducing NO accumulation, we evaluated JA

259 effects on *nia1/nia2*, and *Atnoa1* double and single mutants, respectively. Since

260 *nia1/nia2* and *Atnoa1* mutants develop shorter primary roots with lesser lateral

261 roots than WT seedlings in medium lacking JA, the growth repression and

262 lateral root density was calculated as percentage. In response to JA treatment,

WT, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seedlings were indistinguishable regarding primary root growth inhibition or lateral root density (Supplementary Fig. S2), suggesting that JA regulated root architecture re-configuration operates independently of the *NIA1*, *NIA2* and *AtNOA1*.

Nitric oxide modulates JAZ1 and JAZ10 protein levels in roots

The JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) proteins are induced by JA and act as downstream repressors of its own signaling pathway (Chini and others 2007; Thines and others 2007; Pauwels and others 2010). To test the role of nitric oxide in regulating JAZ proteins in roots, we compared the expression pattern of *JAZ1/TIFY10A-GFP* (Grunewald and others 2009) and *JAZ10-GFP* (Chung and Howe 2009) in response to increasing concentrations of the NO donor SNP. In agreement with previous results (Grunewald and others 2009), *JAZ1/TIFY10A-GFP* was localized in the nucleus of the vascular cylinder as discrete speckles or nuclear bodies (Supplementary Fig. S3). NO clearly increased the number of cells with nuclear bodies expressing the construct in the vascular cylinder and cortex at the differentiation zone of the root, but not in primary root tips (Supplementary Fig. S3). On the other hand, the analysis of *JAZ10-GFP* expression clearly indicated its induction in lateral root primordia and the protoxylem of primary root tips by NO (Fig. 4). Since *JAZ1* is inducible by JA (Grunewald and others 2009), the current data are consistent with a role of NO as mediator in the JA signaling pathway.

The loss of *COI1* function decreases nitric oxide accumulation and response in roots

If NO acts as a modulator of JA signaling, then we hypothesized that *Arabidopsis* mutants that are JA-resistant would also be resistant to NO in root growth and lateral root formation. To test this possibility, the primary root growth and root branching responses of WT and *coi1-1* mutants were compared in medium with or without SNP. Supplementation of 20 μ M SNP repressed root growth while increasing lateral root density in WT plants, which correlated with

296 NO-fluorescence in primary root tips, and this response was reduced in *coi1-1*
297 mutants (Fig. 5a-c). Thus, the NO response of *Arabidopsis* roots requires the JA
298 receptor COI1.

299

300 ***ETHYLENE INSENSITIVE2* plays a role in jasmonic acid-induced primary-**
301 **root growth and nitric oxide accumulation and sensitivity**

302

303 Jasmonic acid and ethylene regulate a common set of plant responses to biotic
304 stimuli and act in parallel to modulate gene expression (Lorenzo and others
305 2003; Plett and others 2014). Therefore, it could be possible that genetic
306 elements of the ethylene signal transduction could be responsible for JA-
307 induced repression of root growth. One of the most ethylene insensitive mutants
308 identified to date is defective at *ETHYLENE INSENSITIVE2* (*EIN2*; Guzmán
309 and Ecker 1990).

310 To determine possible synergic effects in response to JA among JA-related
311 genes and ethylene signaling, comparisons of primary root growth and lateral
312 root formation of WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants were performed
313 in response to 1 and 4 μM JA, and NO detection was performed in primary root
314 tips. Interestingly, the *ein2-1* mutants were clearly resistant to the growth
315 repressing effects of JA and also in root branching promotion by this hormone,
316 and this effect further increased in *ein2-1/jar1-1* double mutants (Fig. 6a-c). JA
317 sensitivity in *ein2-1* and *jar1-1* single, and double mutant combinations
318 correlated with lower accumulation of NO in response to the JA treatments.
319 These data reveal a novel and critical role of *EIN2* in JA-mediated NO
320 accumulation in the *Arabidopsis* primary roots.

321 To test whether the strong JA-resistance of *ein2-1/jar1-1* double mutants
322 correlate with an altered NO sensitivity, the primary root growth response to
323 SNP was compared in WT, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* single and double
324 mutants. The data show a strong resistance to NO accumulation and response
325 in both single and double mutants (Fig. 7a-c), implying a JA-ethylene crosstalk
326 orchestrating NO biosynthesis and response during the configuration of the
327 *Arabidopsis* root system.

328

Reactive oxygen species did not act as modulators during the JA-induced root reprogramming

Reactive oxygen species (ROS), which include the hydroxyl radical ($\text{HO}^\cdot$), superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), are continuously produced as a result of the normal aerobic metabolism of plants, the photosynthesis process and in response to different exogenous and endogenous cues (Mittler and others 2011). To investigate if ROS could be part of the mechanism of primary root inhibition by JA, we monitored ROS accumulation in root tips by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA) and confocal imaging in WT and *coi1-1* plants treated with JA, SNP and the herbicide methyl viologen (paraquat). Interestingly, *coi1-1 Arabidopsis* mutants showed higher ROS levels under standard growth conditions and no further increases were evident in either the WT or the mutant in the JA treatment (Fig. 8a, b). Paraquat increased ROS levels in WT seedlings and in *coi1-1* mutants, suggesting that its accumulation within the root tip might not determine primary root growth inhibition by JA according to the resistance to JA of *coi1-1*.

We next compared primary root growth in response to JA of WT and *radical cell death (rcd1)* mutants, which are resistant to paraquat-induced ROS accumulation in primary roots (Pelagio-Flores and others 2016). The WT and *rcd1* seedlings displayed similar sensitivity to the primary root growth inhibition caused by JA (Supplementary Fig. S4). These results suggest that the primary root growth inhibition in response to JA is not mediated by an altered ROS homeostasis.

Discussion

Jasmonic acid orchestrates plant development and adaptation to biotic challenges through its regulated biosynthesis via JAR1 and closely related enzymes. JAR1 catalyzes the conjugation of isoleucine to JA, forming the bioactive jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) molecule, which upon recognition by COI1 results in the degradation of the JAZ repressors and the subsequent activation of MYC2 dependent transcriptional responses. This signal

transduction pathway may influence the biosynthesis of other phytohormones and second messengers play important roles in hormonal crosstalk acting as modulators of gene expression (Lorenzo and others 2003; Mur and others 2008).

JA signaling has been thoroughly investigated in the shoot system, but scarce information is available about its importance for root organogenesis. Recently, it was reported that repetitive wounding of cotyledons transmits the shoot-to-root JA signal, which restricts root growth by inhibiting both cell proliferation and elongation (Gasperini and others 2015), an aspect that is mimicked either by application of nitric oxide or ethylene (Fernández-Marcos and others 2012; Street and others 2015). Indeed JA triggers NO accumulation in *Arabidopsis* under wounding stress and defense, while NO activates early JA signaling genes, indicating the existence of crosstalk between NO and JA signaling (Huang and others 2004; Xu and others 2005). The finding that JA induces NO levels in a concentration-dependent manner at the primary root tip indicates a repressing role on the activity of stem cells and/or the cell proliferation capacity, in agreement with its negative regulation of the AP2-domain transcription factors PLETHORA1 (PLT1) and PLT2 (Chen and others 2011). Gel shift and chromatin immunoprecipitation experiments revealed that MYC2 directly binds to the promoters of *PLT1* and *PLT2* and represses their expression (Chen and others 2011), which explains its critical role in root meristem activity and stem cell niche maintenance.

Whole-genome transcriptional profiling of *Arabidopsis thaliana* seedlings in response to *N*-isobutyl decanamide, a metabolite that improves root branching and defense responses increasing JA levels, revealed the induction of both JA-responsive and senescence-associated genes, and nitric oxide accumulation in roots and in leaves, and such responses were absent in the *coi1-1* mutants defective on the JA receptor (Méndez-Bravo and others 2011). Our current data extend these observations by showing that JA biosynthesis and signaling components including JAR1, COI1 and MYC2 mediate NO accumulation in primary roots in response to JA. In this regard, NO-related mutants *nia1/nia2* and *Atnoa1* were indistinguishable in root architectural responses to JA when compared to WT seedlings. This was somewhat surprising since the activity of

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

the nitrate reductases encoded by the *NIA1* and *NIA2* genes are an important NO source to drive plant growth and development (Park and others 2011). An alternate oxidative pathway for NO biosynthesis requiring a putative nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme has been long proposed to act in plants. However, despite of years of research on this topic, little advancement has been achieved (Santolini and others 2017). Initial efforts to identify a plant NOS led to characterization of the *Atnoa1* mutant (Guo and others 2003), but strong evidence suggests that this protein did not function as a nitric oxide synthase but rather acts as a plastid-targeted GTPase, and that it might be required for ribosome function (Sudhamsu and others 2008). Here we show that *Atnoa1* is not involved in the root architectural response to JA, and thus additional efforts should be conducted towards identifying the genetic elements acting in NO sensing for hormonal or environmental configuration of root architecture. NO interacts with several phytohormone pathways to orchestrate plant growth and defense and in an organ and tissue specific manner. Lateral root formation plays an important role in plant branching and absorptive capacity to take up nutrients and water. A relationship of JA-mediated NO production and an improved lateral root formation can be explained due to the positive function of NO activating root pericycle cells or via promoting auxin signaling in lateral root primordia (Schlicht and others 2013), since NO donors increase auxin-dependent gene expression and NO depletion blocks Aux/IAA protein degradation (Terrile and others 2012). Moreover, TIR1 S-nitrosylation enhances TIR1-Aux/IAA interaction, facilitating Aux/IAA degradation and subsequent activation of gene expression. Nitric oxide was found to induce the expression of *JAZ1* in the vascular cylinder and cortex at the differentiation zone of the root, but not in primary root tips, and enhanced *JAZ10* expression in lateral root primordia and the protoxylem of primary root tips. Thus, *JAZ1* and *JAZ10* have different expression domains in roots. Since *JAZ1* is inducible by JA (Grunewald and others 2009), the current data are consistent with a role of NO as mediator in the JA signaling pathway likely involved in lateral root formation and/or elongation. Following the observation that the JA receptor mutant *coi1-1* was resistant to the repressing effects of NO-donor SNP in primary roots, we hypothesized that

428 mutations conferring strong resistance to JA would render plants less sensitive
429 to local accumulation of NO at the root tip. Since JA and ethylene have common
430 targets for regulation of gene expression, we compared the WT primary root
431 growth with that of *ein2-1* and *ein2-1/jar1-1* mutants in response to either JA or
432 NO-donor SNP. Interestingly, the loss of *EIN2* function renders plants resistant
433 to JA and SNP for primary root growth stoppage. This suggests that EIN2 could
434 be part of a NO sensing pathway not only because it mediates ethylene
435 responsiveness in roots, but also because recent data demonstrated that NO
436 coordinates responses throughout development based on targeted degradation
437 of ethylene response factors (ERFs), which act as plant-specific transcriptional
438 regulators (Gibbs and others 2014). Moreover, NO itself has been reported to
439 induce ethylene production during the so called hypersensitive response, which
440 allows the plant to resist pathogen attack (Mur and others 2008).

441 In plants, both NO and reactive oxygen species (ROS) signaling occur through
442 complex mechanisms and hormone response crosstalk with salicylic acid,
443 jasmonic acid and ethylene (Mittler and others 2011). Recently, the onset of
444 nitrite-induced cell death was correlated with NO and H₂O₂ signaling and the
445 decrease in the cellular level of antioxidants (Kasten and others 2016). Two
446 sets of experiments indicated that ROS did not act as modulators during the JA-
447 induced root reprogramming. First, paraquat-induced ROS accumulation in WT
448 seedlings proceeds normally in *coi1* mutants, and second, *rcd1* mutants that are
449 defective on the *RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 (RCD1)* gene, were
450 equally sensitive to the WT in JA-induced repression of root growth. *RCD1*
451 encodes an ADP-ribosyl-transferase domain-containing protein involved in
452 intracellular ROS generation by the herbicide paraquat and/or ultraviolet-B
453 irradiation (Ahlfors and others 2004; Fujibe and others 2004). Therefore,
454 although NO and ROS may have common targets in plant stress signaling, the
455 root developmental responses triggered by JA actually depend more on NO
456 accumulation linked to elements of the JA signal transduction pathway, which
457 may act in concert with ethylene via the function of *ETHYLENE INSENSITIVE2*.
458 Our findings underline the importance of NO in phytohormone signaling
459 pathways and highlight its role as a second messenger during the
460 configuration of the root system architecture.

461

462 **Acknowledgments**

463

464 This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y
 465 Tecnología (CONACYT, México, grant no. 177775) and the Consejo de la
 466 Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26). Salvador
 467 Barrera-Ortiz and Amira Garnica-Vergara are indebted to CONACYT for a
 468 doctoral fellowship, and Saraí Esparza-Reynoso and Elizabeth García-
 469 Cárdenas are indebted to CONACYT for masters scholarships. Kind donation of
 470 *Arabidopsis* lines by Drs. Keiko Torii, and Alain Goossens are appreciated.

471

472 **References**

473

- 474 **Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosché M, Tauriainen A,**
 475 **Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M, Inzé D, Palva ET,**
 476 **Kangasjärvi J** (2004) *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1
 477 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and
 478 modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell*
 479 16:1925-1937.
- 480 **Blancaflor EB, Kilaru A, Keereetaweep J, Khan BR, Faure L, Chapman KD**
 481 (2014) *N*-acylethanolamines: lipid metabolites with functions in plant growth and
 482 development. *Plant J* 79:568-583.
- 483 **Campos-Cuevas JC, Pelagio-Flores R, Raya-González J, Méndez-Bravo A,**
 484 **Ortiz-Castro R, López-Bucio J** (2008) Tissue culture of *Arabidopsis thaliana*
 485 explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation
 486 and nitric oxide accumulation. *Plant Sci* 174:165-173.
- 487 **Chen Q, Sun J, Zhai Q, Zhou W, Qi L, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang H, Qi J,**
 488 **Li, X, Palme K, Li C** (2011) The basic Helix-Loop-Helix transcription factor
 489 MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated
 490 modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3335-3352.
- 491 **Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, García-**
 492 **Casado G, López-Vidriero I, Lozano FM, Ponce MR, Micol JL, Solano R**

(2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448:666-671.

Chung HS, Howe GA (2009) A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:131-145.

Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis D, Muday GK, Lorenzo O (2012) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18506-18511.

Feys BJF, 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.

Fujibe T, Saji H, Arakawa K, Yabe N, Takeuchi Y, Yamamoto KT (2004) A methyl viologen-resistant mutant of *Arabidopsis*, which is allelic to ozone-sensitive *rcd1*, is tolerant to supplemental ultraviolet-B irradiation. *Plant Physiol* 134: 275-285.

Gasparini D, Chételat A, Acosta IF, Goossens J, Pauwels L, Goossens A, Dreos R, Alfonso E, Farmer E (2015) Multilayered organization of jasmonate signalling in the regulation of root growth. *PLoS Genet* 11:e1005300.

Gibbs DL, Isa MD, Movahedi M, Lozano-Juste J, Mendiando GM, Berckhan S, Marin-de la Rosa N, Conde JV, Sousa Correia C, Pearce SP, Bassel GW, Hamali B, Talloji P, Tome DFA, Coego A, Beynon J, Alabadí D, Bachmair A, León J, Gray JE, Theodoulou FL, Holdsworth MJ (2014) Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors *Molecular Cell* 53:369-379.

Greger H (2016) Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochemistry Rev* 15:729-770.

Grunewald W, Vanholme B, Pauwels L, Plovie E, Inze D, Gheysen G, Goossens A (2009) Expression of the *Arabidopsis* jasmonate signaling repressor JAZ1/TIFY10A is stimulated by auxin. *EMBO Rep* 10:923-928.

Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* 302:100-103.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

- 526 **Guzmán P, Ecker JR** (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to
527 identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513-523.
- 528 **Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller MJ, Durner J** (2004)
529 Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in
530 *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218:938-946.
- 531 **Kasten D, Mithöfer A, Georgii E, Lang H, Durner J, Gaupels F** (2016) Nitrite
532 is the driver, phytohormones are modulators while NO and H₂O₂ act as
533 promoters of NO₂-induced cell death. *J Exp Bot* 67:6337-6349.
- 534 **Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE
535 RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate
536 pathways in plant defense. *Plant Cell* 15:165-178.
- 537 **Méndez-Bravo A, Raya-González J, Herrera-Estrella L, López-Bucio J**
538 (2010) Nitric oxide is involved in alkamide-induced lateral root development in
539 *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51:1612-1626.
- 540 **Méndez-Bravo A, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J,**
541 **Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Guevara-García A, López-Bucio J,**
542 **Herrera-Estrella L** (2011) Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and
543 signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*
544 *thaliana*. *PLoS ONE* 6:e27251.
- 545 **Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K,**
546 **Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F** (2011) ROS signaling: the new
547 wave? *Trends Plant Sci* 16:300-309.
- 548 **Mur LAJ, Laarhoven L, Harren FJM, Hall MA, Smith AR** (2008) Nitric oxide
549 interacts with salicylate to regulate biphasic ethylene production during the
550 hypersensitive response. *Plant Physiol.* 148:1537-1546.
- 551 **Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J** (2008)
552 *N*-acyl-*L*-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter
553 post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*
554 31:1497-1509.
- 555 **Park BS, Song JT, Seo HS** (2011) *Arabidopsis* nitrate reductase activity is
556 stimulated by the E3 SUMO ligase AtSIZ1. *Nat Commun* 2:400.
- 557 **Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Cuéllar**
558 **Pérez A, Chico JM, vanden Bossche R, Sewell J, Gil E, García-Casado G,**

559 **Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010)
560 NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*
561 464:788-791.

562 **Pelagio-Flores R, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J** (2016) Serotonin
563 modulates *Arabidopsis* root growth via changes in reactive oxygen species and
564 jasmonic acid-ethylene signaling. *Physiol Plant* 158:92-105.

565 **Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Métraux JP, Broekaert WF** (1998)
566 Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is
567 required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*
568 10:2103-2113.

569 **Plett JM, Khachane A, Ouassou M, Sundberg B, Kohler A, Martin F** (2014)
570 Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic
571 symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots. *New Phytol* 202:270-
572 286.

573 **Pillitteri LJ, Peterson KM, Horst RJ, Torii KU** (2011) Molecular profiling of
574 stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and
575 commonalities among stem cell populations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23:3260-
576 3275.

577 **Ramírez-Chávez E, López-Bucio J, Herrera-Estrella L, Molina-Torres J**
578 (2004) Alkamides isolated from plants promote growth and alter root
579 development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1058-1068.

580 **Raya-González J, Pelagio-Flores R, López-Bucio J** (2012) The jasmonate
581 receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and
582 lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 169:1348-1358.

583 **Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002) Regulation of nitric
584 oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot*
585 53:103-110.

586 **Santolini J, Andre F, Jeandroz S, Wendehenne D** (2017) Nitric oxide
587 synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide* 63:30-38.

588 **Schlicht M, Ludwig-Muller J, Burbach C, Volkmann D, Baluska F** (2013)
589 Indole-3-butyric acid induces lateral root formation via peroxisome-derived
590 indole-3-acetic acid and nitric oxide. *New Phytologist* 200:473-482.

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

- 591 **Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root
592 growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana*
593 mutant. Proc Natl Acad Sci USA 89:6837-6840.
- 594 **Street I, Aman S, Zubo Y, Ramzan A, Wang X, Shakeel S, Kieber J,**
595 **Schaller G** (2015) Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root
596 meristem. Plant Physiol 169:338-350.
- 597 **Sudhamsu J, Lee GI, Klessig DF, Crane BR** (2008) The structure of YqeH. An
598 AtNOS1/AtNOA1 ortholog that couples GTP hydrolysis to molecular recognition.
599 J Biol Chem 283:32968-32976.
- 600 **Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He**
601 **SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the
602 SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. Nature 448:661-665.
- 603 **Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbliauskas E, Parmentier Y, Kieber**
604 **J, Scheres B, Genschik P** (2009) *Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate
605 primary root growth and patterning by ethylene-dependent and independent
606 mechanisms. PLoS Genet 5: e1000328.
- 607 **Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L,**
608 **Estelle M, Casalengué CA** (2012) Nitric oxide influences auxin signaling
609 through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR
610 RESPONSE 1 auxin receptor. Plant J 70:492-500.
- 611 **Wendehenne D, Hancock JT** (2011) New frontiers in nitric oxide biology in
612 plant. Plant Sci 181:507-508.
- 613 **Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterization of a
614 chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate
615 reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. Mol Gen Genet 239:289-297.
- 616 **Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D,**
617 **Xie D** (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for
618 jasmonate response in *Arabidopsis*. Plant Cell 14:1919-1935.
- 619 **Xu Y, Chang P, Liu D, Narasimhan ML, Raghothama KG, Hasegawa PM,**
620 **Bressan RA** (1994) Plant defense genes are synergistically induced by
621 ethylene and methyl jasmonate. Plant Cell 6:1077-1108.

Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol* 139:991-998.

Figure legends

Fig. 1 Effects of JA on root architecture and nitric oxide accumulation in *Arabidopsis*. Primary root length (a) and lateral root density (b) were analyzed from 10-day-old WT (Col-0) seedlings germinated and grown on the indicated concentrations of JA. (c) NO detection on primary root tips of seedlings loaded with DAF-2DA and visualized by confocal microscope. Values shown in (a) and (b) represent the mean of 30 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($p < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar= 100 μm .

Fig. 2. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type and *jar1-1* *Arabidopsis* seedlings. WT and *jar1-1* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n = 15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p < 0.05$). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 3. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *myc2-1* and *myc2-2* *Arabidopsis* seedlings. WT, *myc2-1* and *myc2-2* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 4. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on *JAZ10* expression in *Arabidopsis* roots. Transgenic *Arabidopsis* seedlings harboring the *JAZ10-GFP* gene construct were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP for 10 days; at least 6 seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of expression pattern in two zones of primary root were taken (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 5. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seeds were germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent or 20 μM SNP for 8 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 6. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1*, and *ein2-1/jar1-1* *Arabidopsis* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 or 4 μM JA for 7 days. (a) Inhibition of

primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 30). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 7. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μ M SNP for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots (n=6) (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

Fig. 8. Reactive oxygen species (ROS) accumulation in the primary root of wild-type and *coi1-1* mutant in response to jasmonic acid (JA), sodium nitroprusside (SNP) and paraquat (PRQ). Wild-type and *coi1-1* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in media supplemented with 4 μ M JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 4 μ M JA, 20 μ M SNP or 0.1 μ M PRQ for 8 days. (a) Fluorescence intensity was quantified using the IMAGEJ program in micrographs of the primary roots treated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA). Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 6). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (b) Representative confocal micrographs of the detection of

Jasmonic acid and nitric oxide in root development

721 endogenous ROS with H₂DCF-DA mentioned above (scale bar= 100 μ m). The
 722 experiment was repeated twice with similar results.

723

724 **Supplementary fig. S1.** Root response to jasmonic acid and nitric oxide
 725 accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seedlings were germinated
 726 and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous
 727 *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1/COI1* segregating population in
 728 media supplemented with 4 μ M JA two days after germination, subsequently
 729 wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS
 730 media supplied either with the solvent or 4 μ M JA for 8 days. (a) Primary root
 731 length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the
 732 mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical
 733 differences following a Tukey test analysis ($p < 0.05$). (c) Representative
 734 micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein
 735 diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each
 736 type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μ m). The
 737 experiment was repeated twice with similar results.

738

739 **Supplementary fig. S2.** Effect of jasmonic acid on root development in wild-
 740 type, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seedlings. WT, *nia1/nia2* and *Atnoa1* seeds were
 741 germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media
 742 supplied with the solvent, 1 and 4 μ M JA for 10 days. (a) **Inhibition of primary**
 743 **root length (percentage)** and (b) **Promotion of lateral root density (percentage)**.
 744 Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters
 745 indicate statistical differences from a Tukey test analysis with a value at $p < 0.05$.
 746 (c) Representative images of the conditions in which all seedlings were grown
 747 (scale bar= 1 cm). Note the different sizes of Col-0, *nia1/nia2* and *Atnoa1* in the
 748 control (solvent supplied) condition. The experiment was repeated twice with
 749 similar results.

750

751 **Supplementary fig. S3.** Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on
 752 *JAZ1* expression in *Arabidopsis* roots. Transgenic *Arabidopsis* seedlings
 753 harboring the *JAZ1/TIFY10A-GFP* construct were germinated and grown on

754 agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP
755 for 10 days. The seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal
756 micrographs of the expression pattern were recorded in two zones of the
757 primary root (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with
758 similar results.

759
760 **Supplementary fig. S4.** Root response of wild-type and *rcd1* seedlings to
761 jasmonic acid. Wild-type and *rcd1* seedlings were germinated and grown on
762 agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 and 4 μM JA for 10
763 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values
764 shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 15). Different letters
765 indicate statistical differences from a Tukey test analysis ($p < 0.05$). The
766 experiment was repeated twice with similar results.

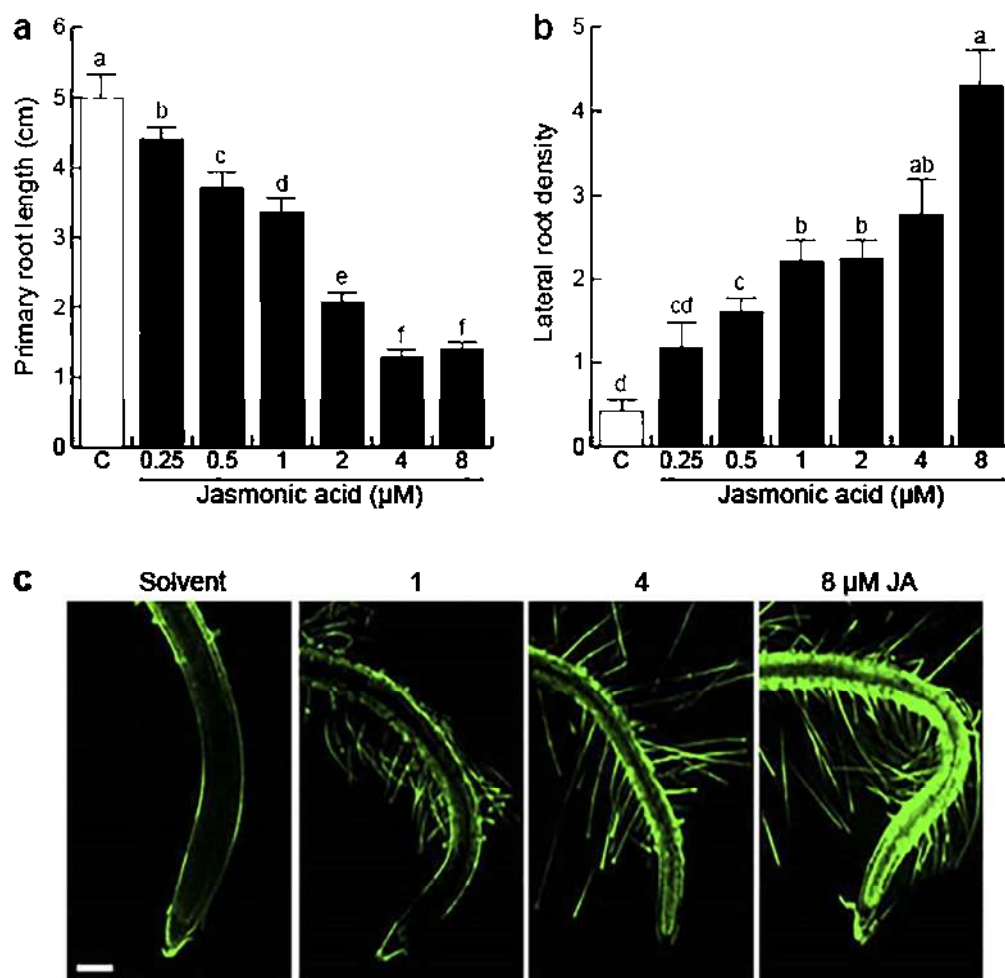


Fig. 1 Effects of JA on root architecture and nitric oxide accumulation in Arabidopsis. Primary root length (a) and lateral root density (b) were analyzed from 10-day-old WT (Col-0) seedlings germinated and grown on the indicated concentrations of JA. (c) NO detection on primary root tips of seedlings loaded with DAF-2DA and visualized by confocal microscope. Values shown in (a) and (b) represent the mean of 30 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($p < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results. Scale bar = 100 μm .

150x145mm (300 x 300 DPI)

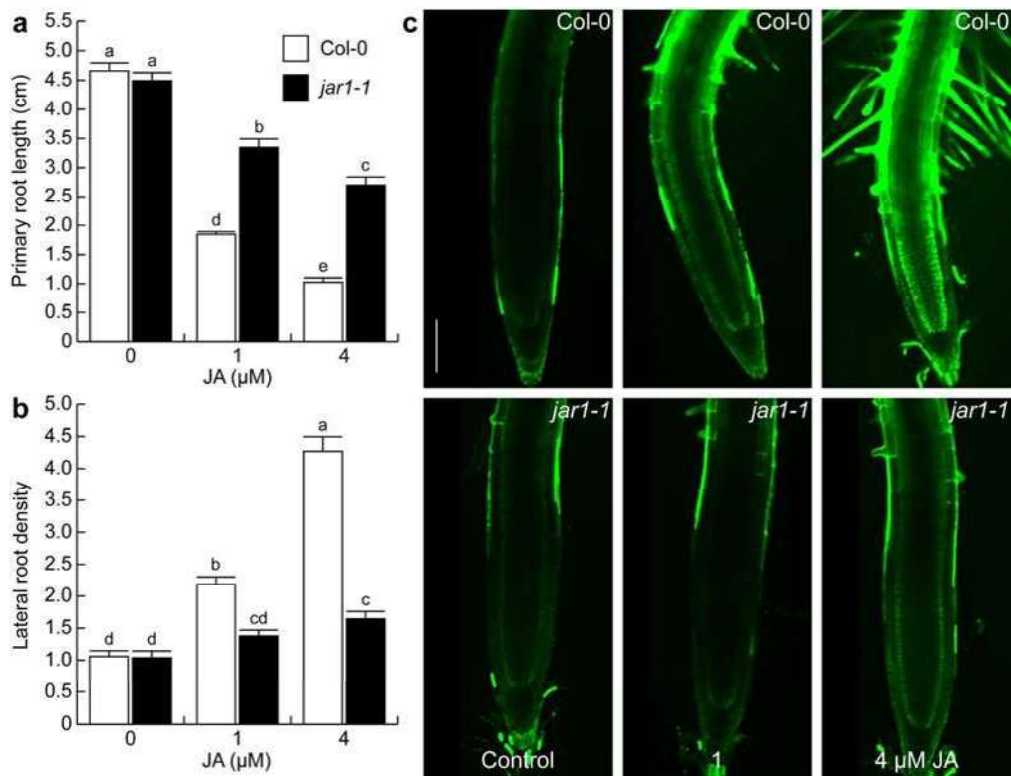


Fig. 2. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type and jar1-1 Arabidopsis seedlings. WT and jar1-1 seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the mean ± standard deviation (n= 15). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis (p<0.05). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

248x190mm (300 x 300 DPI)

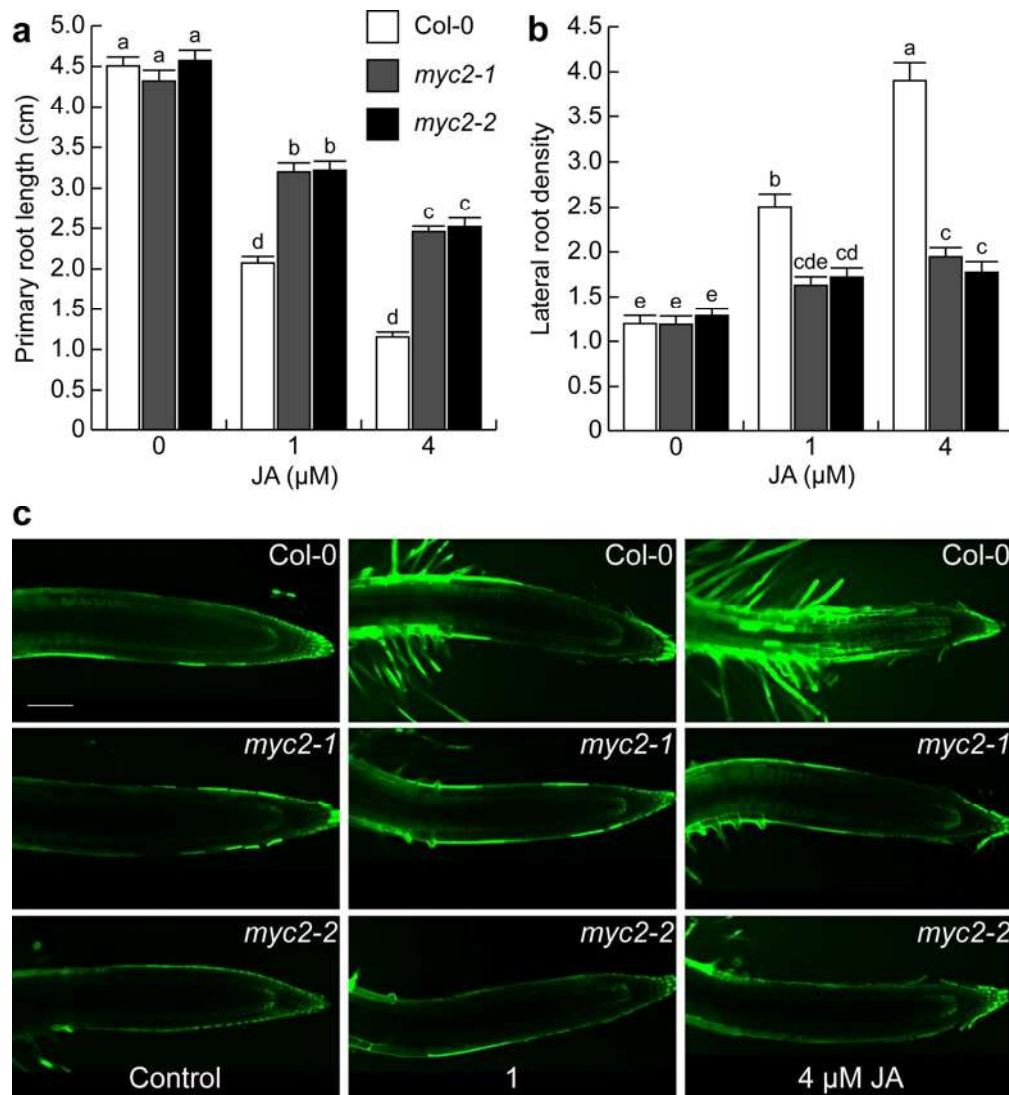


Fig. 3. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *myc2-1* and *myc2-2* Arabidopsis seedlings. WT, *myc2-1* and *myc2-2* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, or with 1 and 4 μM JA for 10 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings of each type and each growth condition mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

197x214mm (300 x 300 DPI)

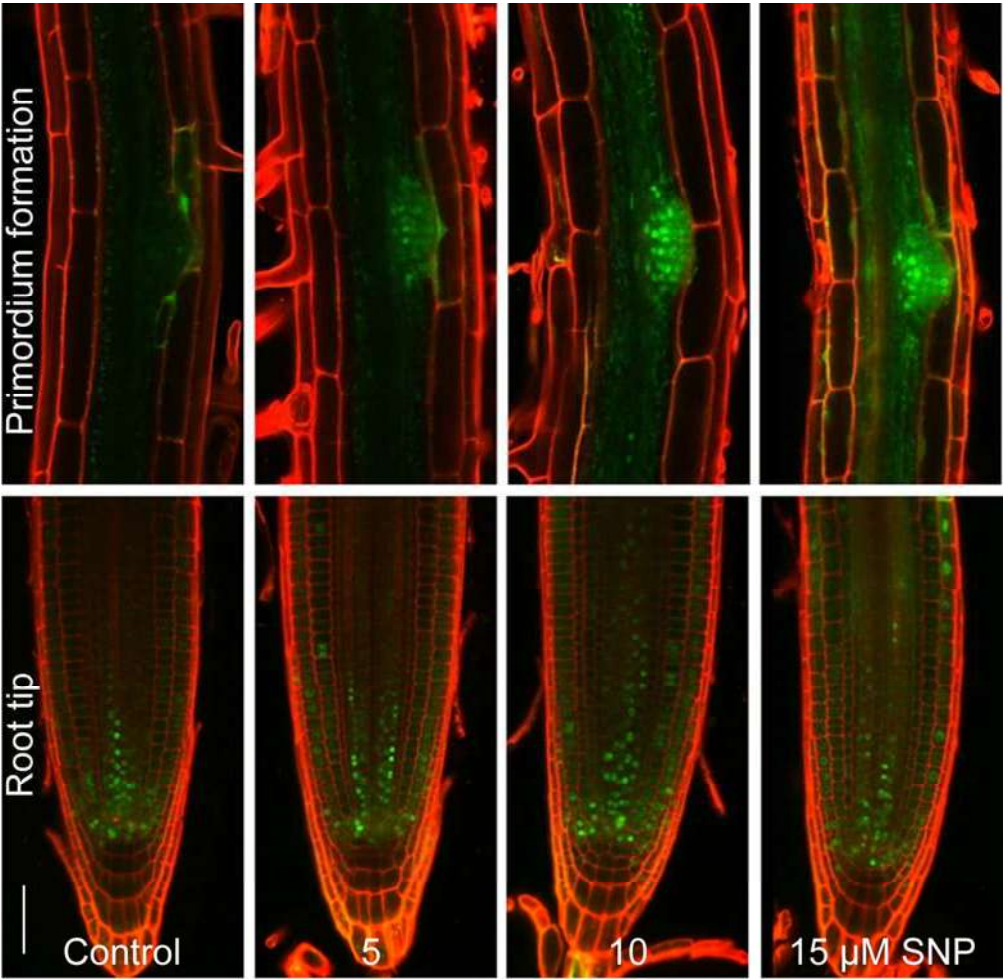


Fig. 4. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on JAZ10 expression in Arabidopsis roots. Transgenic Arabidopsis seedlings harboring the JAZ10-GFP gene construct were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μM SNP for 10 days; at least 6 seedlings were incubated with propidium iodide, and confocal micrographs of expression pattern in two zones of primary root were taken (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

154x150mm (300 x 300 DPI)

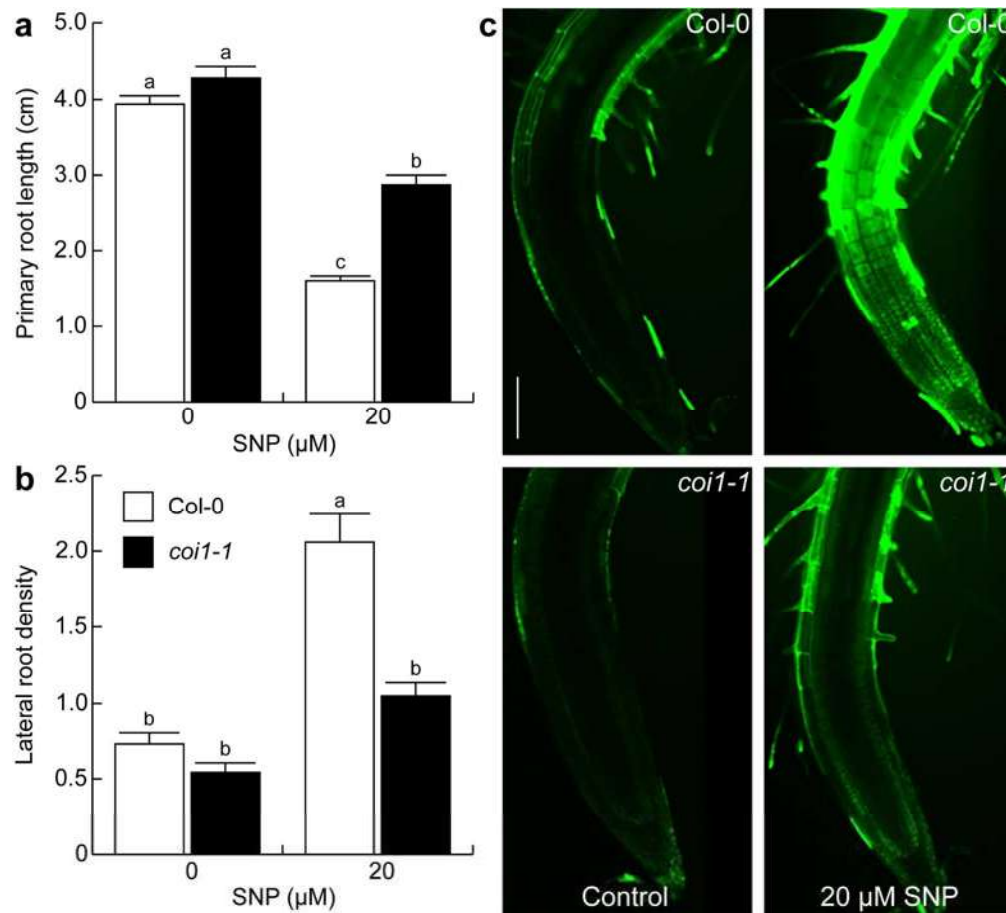


Fig. 5. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type and *coi1-1* seedlings. WT seeds were germinated and seedlings were grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1*/COI1 segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent or 20 μM SNP for 8 days. (a) Primary root length and (b) lateral root density. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

209x190mm (300 x 300 DPI)

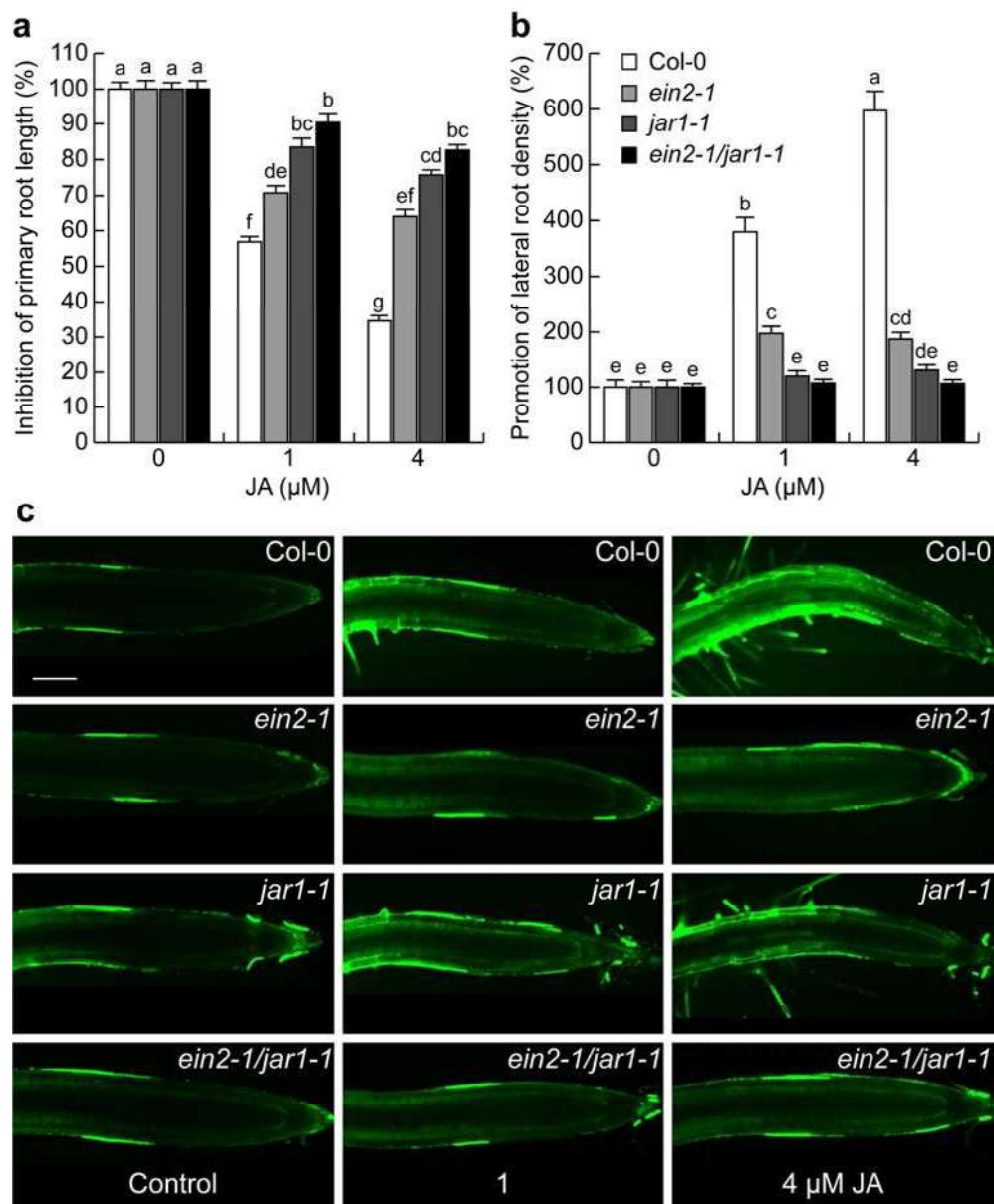


Fig. 6. Root response to jasmonic acid and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1*, and *ein2-1/jar1-1* Arabidopsis seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 1 or 4 μ M JA for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation (n= 30). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ($p<0.05$). (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots of at least 6 seedlings (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

200x244mm (300 x 300 DPI)

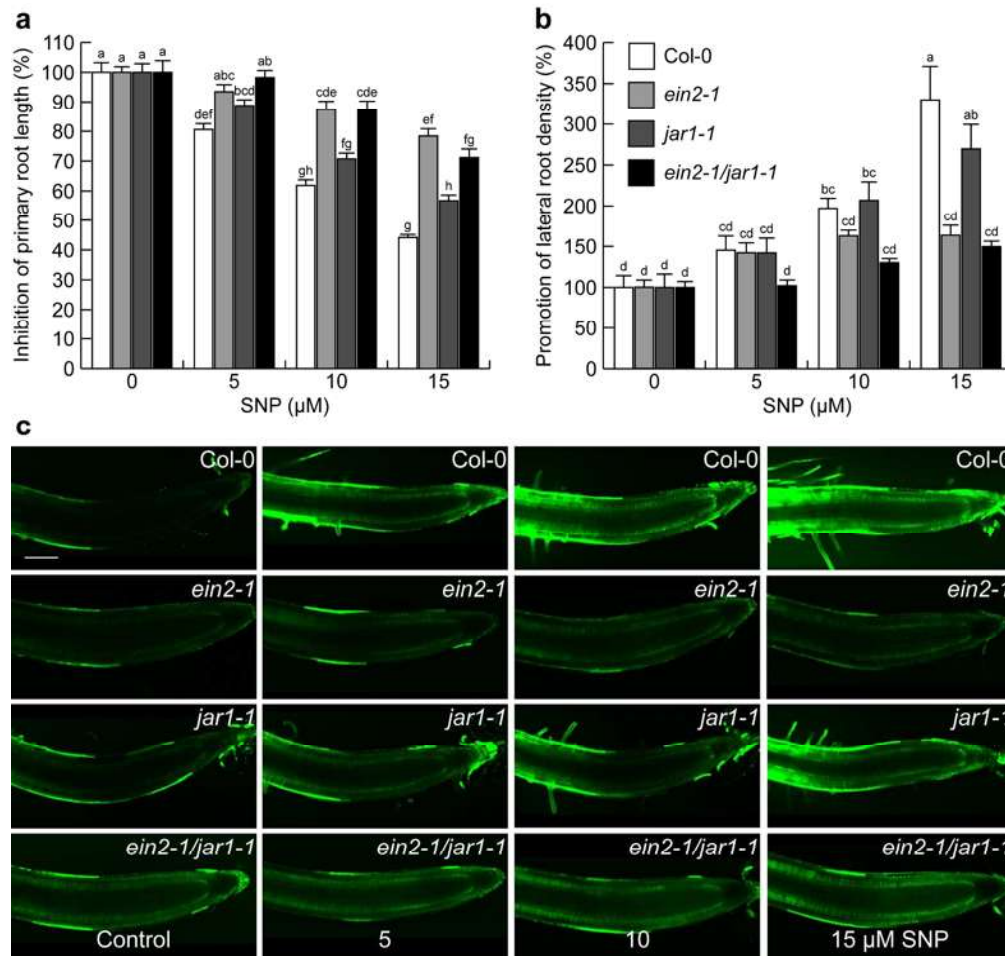


Fig. 7. Effect of nitric oxide donor sodium nitroprusside on root development and nitric oxide accumulation in wild-type, *ein2-1*, *jar1-1* and *ein2-1/jar1-1* seedlings. WT, single and double mutant seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 5, 10 and 15 μ M SNP for 7 days. (a) Inhibition of primary root length (percentage) and (b) Promotion of lateral root density (percentage) were recorded. Values shown represent the mean $\pm$ standard deviation ($n=15$). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (c) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous NO with 4,5-diaminofluorescein diacetate, which was determined in primary roots ($n=6$) (scale bar= 100 μ m). The experiment was repeated twice with similar results.

244x232mm (300 x 300 DPI)

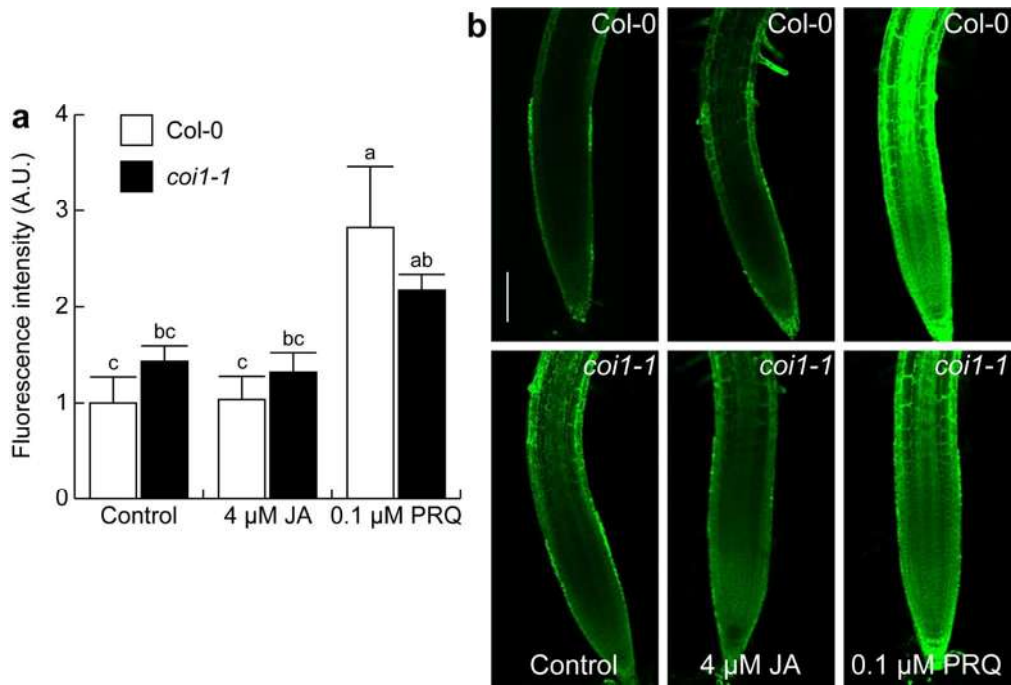


Fig. 8. Reactive oxygen species (ROS) accumulation in the primary root of wild-type and *coi1-1* mutant in response to jasmonic acid (JA), sodium nitroprusside (SNP) and paraquat (PRQ). Wild-type and *coi1-1* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2X MS media for two days, and homozygous *coi1-1* seedlings were selected from a *coi1-1*/COI1 segregating population in media supplemented with 4 μM JA two days after germination, subsequently wild-type and *coi1-1* seedlings were transferred to agar-solidified 0.2X MS media supplied with the solvent, 4 μM JA, 20 μM SNP or 0.1 μM PRQ for 8 days. (a) Fluorescence intensity was quantified using the IMAGEJ program in micrographs of the primary roots treated with 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCF-DA). Values shown represent the mean ± standard deviation (n= 6). Different letters indicate statistical differences of a Tukey analysis with a value at $p<0.05$. (b) Representative confocal micrographs of the detection of endogenous ROS with H2DCF-DA mentioned above (scale bar= 100 μm). The experiment was repeated twice with similar results.

206x140mm (300 x 300 DPI)