



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

**“EFECTO DE LA INTERACCIÓN CON HONGOS  
AISLADOS DEL FRUTO DE AGUACATE CON PUDRICIÓN  
PEDUNCULAR SOBRE EL CRECIMIENTO Y  
DESARROLLO DE *Arabidopsis thaliana*”**

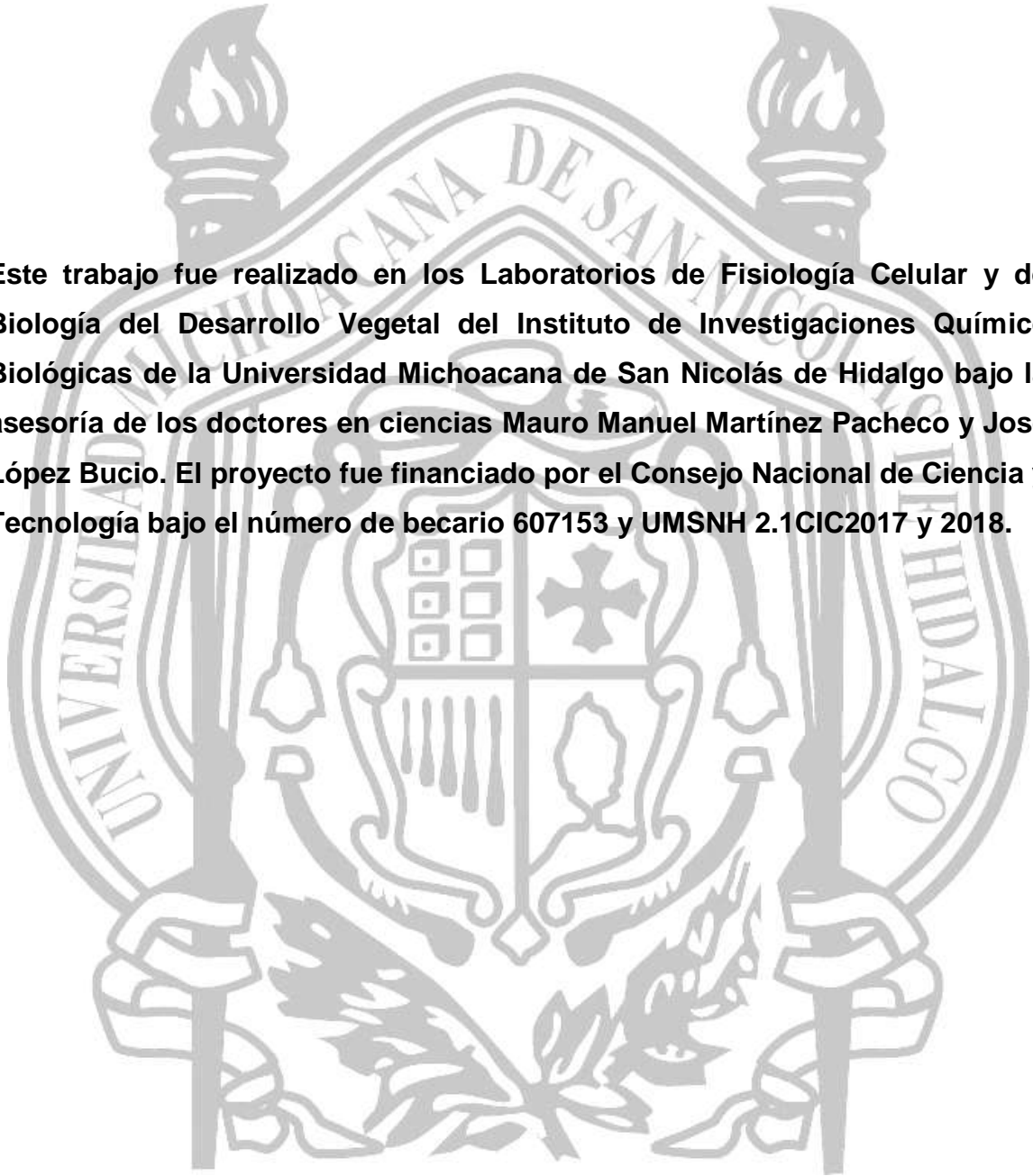
**TESIS QUE PRESENTA:  
BIÓLOGA MELISSA ADRIANA MENDOZA VÁZQUEZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ASESORES DE TESIS:  
D. EN C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO  
LABORATORIO DE FISIOLOGÍA CELULAR**

**D. EN C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETAL**

**MORELIA, MICHOACÁN, OCTUBRE DE 2018**



**Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Fisiología Celular y de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de los doctores en ciencias Mauro Manuel Martínez Pacheco y José López Bucio. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el número de becario 607153 y UMSNH 2.1CIC2017 y 2018.**

## **Agradecimientos:**

A mis padres Roberto y Mercedes y a mis hermanos Roberto y Javier, por todo el apoyo incondicional, el esfuerzo y sacrificios que siempre han hecho para que cumpla mis proyectos en la vida, los amo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

Al D. en C. Mauro Manuel Martínez Pacheco, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por todo el tiempo, atenciones y esfuerzo que dedicó en mi formación como investigadora, por guiarme en cada paso de este proyecto y siempre mantenerme motivada.

Al D. en C. José López Bucio, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por todas las atenciones, enseñanzas y por la dirección de la tesis.

A mi comité sinodal, a la D. en C. Lourdes Macías, por permitirme hacer uso de su laboratorio para los ensayos químicos, por la atención y dedicación en mi proyecto, a la D. en C. Elda Beltrán y el D. en C. Eduardo Valencia, por la amabilidad y dedicación en la revisión del manuscrito y por las sugerencias y recomendaciones en los seminarios.

Al M. en C. Alberto Flores García, por todo el apoyo, ayuda y sugerencias que me brindó desde mi primer día en el laboratorio y sobre todo, por su amistad.

A las M. en C. Rosy y Edith, por el apoyo, la disposición y la paciencia para atender siempre mis preguntas.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular y del Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, por su apoyo, cariño y la diversión. Además, se convirtieron en muy buenos amigos.

A Francisco, por apoyarme durante todo este proceso.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	2
1. Introducción .....	3
2. Antecedentes.....	5
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	5
2.2. La raíz de <i>Arabidopsis</i> .....	5
2.3. Raíces laterales.....	7
2.4. Pelos radiculares .....	8
2.5. Reguladores del crecimiento vegetal .....	9
2.5.1. Auxinas.....	9
2.5.2. Citocininas .....	15
2.5.3. Ácido jasmónico (AJ) .....	18
2.6. Hongos.....	21
2.6.1. Acidificación del medio .....	22
2.6.2. Interacción planta-hongo .....	23
2.7. Metabolismo secundario.....	25
2.7.1. Compuestos difusibles microbianos.....	26
2.7.2. Compuestos orgánicos volátiles fúngicos .....	27
2.7.3. Efecto de los metabolitos secundarios fúngicos en plantas .....	29
2.8. Pudrición peduncular .....	31
2.9. Hongos de estudio.....	33
2.9.1. <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	33
2.9.2. <i>Phomopsis viticola</i> .....	34
2.9.3. <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> .....	35
3. Justificación .....	38
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivo general.....	38
6. Objetivos específicos .....	38
7. Materiales y métodos.....	38
7.1. Material vegetal .....	38

7.2. Material fúngico .....	39
7.3. Ensayo de co-inoculación planta-hongo .....	39
7.4. Ensayos de acidificación del medio .....	40
7.5. Análisis de la actividad de GUS y GFP .....	40
7.6. Análisis de crecimiento en suelo post contacto con los hongos .....	41
7.7. Identificación de compuestos orgánicos volátiles .....	41
7.8. Análisis de datos .....	42
8. Resultados.....	42
8.1. Los hongos aislados de frutos de aguacate producen pudrición peduncular.....	42
8.2. Los hongos que causan pudrición peduncular modifican el crecimiento foliar y la morfología radicular .....	43
8.3. Los hongos que causan la pudrición peduncular en aguacate promueven la elongación de pelos radiculares .....	44
8.4. <i>P. viticola</i> 5480 y <i>D. phaseolorum</i> 5185 inducen la expresión del gen <i>EXP7:GUS</i> .....	46
8.5. Los hongos de la pudrición peduncular acidifican diferencialmente el medio de crecimiento .....	48
8.6. La inhibición del crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en interacción con <i>P. viticola</i> 5480 y <i>D. phaseolorum</i> 5185 no está asociada a la acidificación .....	49
8.7. <i>P. viticola</i> 5480 y <i>D. phaseolorum</i> 5185 inducen una respuesta auxínica local en las raíz primaria .....	51
8.8. Los hongos de la pudrición peduncular modifican las concentraciones de citocininas en la raíz .....	52
8.9. Los hongos de la pudrición peduncular activan rutas de defensa .....	54
8.10. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular inducen el crecimiento foliar y modifican diferencialmente la estructura radicular .....	55
8.11. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular promueven la formación y elongación de pelos radiculares .....	57

8.12. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular modifican la longitud de la raíz primaria a través de la alteración en la elongación y diferenciación celular .....	59
8.13. Los COVs de los hongos fitopatógenos modifican la ruta de señalización de las auxinas.....	60
8.14. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular activan la señalización de las citocininas .....	61
8.15. Los COVs de hongos fitopatógenos activan la ruta de defensa dependiente de ácido jasmónico .....	63
8.16. Identificación de los COVs producidos por hongos que causan pudrición peduncular.....	65
8.17. La estimulación del crecimiento de <i>Arabidopsis</i> por los compuestos difusibles y los COVs de hongos fitopatógenos se conserva durante el ciclo de vida.....	69
9. Discusión.....	73
10. Literatura citada .....	80
11. Apéndice.....	96

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Cambios morfológicos durante el proceso de formación de raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Niveles de regulación de las auxinas.....	11
<b>Figura 4.</b> Biosíntesis, percepción y señalización de auxinas .....	14
<b>Figura 5.</b> Señalización de citocininas .....	17
<b>Figura 6.</b> Biosíntesis y señalización del ácido jasmónico.....	20
<b>Figura 7.</b> Interacción planta-microorganismo.....	24
<b>Figura 8.</b> Estructura química de algunos compuestos orgánicos volátiles vegetales y fúngicos representativos.....	30
<b>Figura 9.</b> Pudrición peduncular del aguacate .....	31
<b>Figura 10.</b> <i>Diaporthe phaseolorum</i> .....	34
<b>Figura 11.</b> Síntomas en la uva asociados a <i>Phomopsis viticola</i> en California .....	35
<b>Figura 12.</b> <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> (CBS 117448).....	37
<b>Figura 13.</b> Efecto del co-cultivo de hongos de la pudrición peduncular sobre el crecimiento foliar y la morfología radicular .....	44
<b>Figura 14.</b> Efecto de la diferenciación de pelos radiculares en co-cultivo con los hongos de la pudrición peduncular.....	46
<b>Figura 15.</b> Efectos en la división y diferenciación celular del meristemo de la raíz primaria en co-cultivo con hongos de la pudrición peduncular .....	47
<b>Figura 16.</b> Capacidad de acidificación del medio de cultivo por hongos fitopatógenos y <i>T. atroviride</i> . .....	49
<b>Figura 17.</b> Efecto del crecimiento foliar y el desarrollo radicular de <i>Arabidopsis</i> en co-cultivo con hongos de la pudrición peduncular en medio de cultivo amortiguado .....	50
<b>Figura 18.</b> Efecto en la expresión de <i>DR5:GUS</i> y <i>DR5:GFP</i> en la punta de la raíz por los hongos de la pudrición peduncular .....	52
<b>Figura 19.</b> Efecto en la expresión de <i>TCS:GFP</i> y <i>ARR5:GUS</i> en la punta de la raíz en <i>Arabidopsis</i> por los hongos de la pudrición peduncular .....	54

<b>Figura 20.</b> Efecto en la expresión de <i>LOX2:GUS</i> inducible por el ácido jasmónico en el follaje durante la interacción con hongos de la pudrición peduncular. ....	55
<b>Figura 21.</b> Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular en el crecimiento foliar y la morfología radicular .....	57
<b>Figura 22.</b> Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la longitud de pelos radiculares.....	58
<b>Figura 23.</b> Efecto en la división y diferenciación celular del meristemo de la raíz primaria de los COVs de hongos de la pudrición peduncular .....	60
<b>Figura 24.</b> Efecto en la expresión de <i>DR5:GFP</i> en la punta de la raíz por los COVs de hongos de la pudrición peduncular.....	61
<b>Figura 25.</b> Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la expresión de <i>TCS:GFP</i> y <i>ARR5:GUS</i> en la punta de la raíz .....	63
<b>Figura 26.</b> Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la expresión de <i>LOX2:GUS</i> inducible por ácido jasmónico .....	64
<b>Figura 27.</b> Cinética del crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en suelo después de la interacción en co-cultivo en caja completa con los hongos de la pudrición peduncular .....	71
<b>Figura 28.</b> Cinética del crecimiento de <i>Arabidopsis</i> en suelo después de la interacción con los COVs de los hongos de la pudrición peduncular.....	72

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Abundancia (%) de compuestos orgánicos volátiles producidos por hongos que causan pudrición peduncular.....	67
---	----

## Resumen

Los frutos de aguacate desarrollan pudrición peduncular durante la maduración, lo cual reduce su calidad, así como sus valores nutrimental y económico. Un estudio dirigido a la identificación de microorganismos que proliferan en la pudrición del pedúnculo permitió el aislamiento de los hongos *Phomopsis viticola*, *Diaporthe phaseolorum* y *Pseudofusicoccum stromaticum*. Para el entendimiento de la relación planta-hongo que se establece y la exploración de algunos mecanismos de señalización, usamos *Arabidopsis thaliana* como una planta hospedera heteróloga y exploramos la influencia de cada aislado fúngico en el crecimiento de la raíz, capacidad de acidificación y la expresión de genes de división celular, diferenciación y respuesta a auxinas, citocininas y ácido jasmónico.

Los resultados que se obtuvieron indican una respuesta diferencial y específica en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* en la interacción con cada uno de los hongos. En co-cultivo, *P. viticola* y *D. phaseolorum* reprimen fuertemente el crecimiento de la raíz primaria, mientras que *P. stromaticum* induce el crecimiento radicular y la biomasa en el brote, así como la formación de raíces. Además, los volátiles de *D. phaseolorum* y *P. stromaticum* estimulan el crecimiento de *Arabidopsis*.

Estudios de microscopía de campo claro y confocal acompañados de análisis tisulares revelaron que ninguno de los tres hongos afecta la división celular en los meristemas, pero influyen tanto en la elongación, como en la diferenciación celular. Esta respuesta se relaciona con la señalización de auxinas y citocininas. Por otro lado, los tres hongos indujeron la expresión del gen inducible por ácido jasmónico *LOX2:GUS* en las hojas, lo que indica una activación de las rutas de defensa. La transferencia de las plantas que interactuaron *in vitro* con *P. stromaticum* y *D. phaseolorum* a suelo y el monitoreo durante su ciclo de vida reveló que una exposición temprana a los volátiles fúngicos promueve la formación de tallos más largos. Los resultados sugieren que los aislados fúngicos de frutos de aguacate con pudrición peduncular interactúan con las plantas de *Arabidopsis* de manera diversa y contrastante, influyendo en programas de crecimiento, desarrollo y defensa.

Palabras clave: crecimiento, fitohormonas, defensa, metabolitos secundarios.

## Abstract

During ripening and postharvest management, avocado fruits develop stem-end rots that reduce quality, as well as nutritional and economical value. A survey aimed at identifying microorganisms that endophytically proliferate on the “Hass” avocado stem-end allowed the isolation of *Phomopsis viticola*, *Diaporthe phaseolorum* and *Pseudofusicoccum stromaticum* fungi. To understand the plant-fungal relationship, we used *Arabidopsis thaliana* as heterologous host plant and explored the influence of each fungal isolate on root growth and patterning, acidification capacity, and expression of genes for cell division, differentiation and auxin response.

We found variable plant growth and developmental responses that are specific for each fungus. In co-culture *P. viticola* and *D. phaseolorum* strongly repressed root growth, while *P. stromaticum* induced prolific root growth and branching, and enhanced shoot biomass production. Additionally, the *D. phaseolorum* and *P. stromaticum* volatiles enhance plant growth. Detailed microscopy and structural analyses revealed that all three fungi did not affect cell division in root meristems but rather influenced cell elongation and differentiation, and these responses were related to changes in auxin and cytokinin responsiveness. Otherwise, all three fungi induced the jasmonic acid responsive gene construct *LOX2:GUS* in leaves, indicating the activation of plant immunity.

When plants exposed to volatiles from *P. stromaticum* and *D. phaseolorum* volatiles were transferred to soil, an increase in stem length was evident. Taken together, our results show that fungal isolates from the stem-end of avocado fruits interact with *Arabidopsis* plants in highly diverse and contrasting manners influencing growth, patterning and defense.

## 1. Introducción

Las plantas poseen gran capacidad fenotípica para modificar sus programas de crecimiento y desarrollo ante los estímulos ambientales. Además, pueden establecer asociaciones con diversos organismos, tanto en la raíz como en la parte aérea. Estas asociaciones pueden ser: 1) neutrales, sin ningún efecto aparente; 2) benéficas, ayudando a la nutrición o en la tolerancia al agobio, o 3) negativas, las cuales causan daño. En el caso de estas últimas, en respuesta a los ataques de los patógenos, se inducen respuestas estructurales, químicas y moleculares para defenderse, como el reforzamiento de las paredes celulares, la producción de fitoalexinas y metabolitos secundarios tóxicos para los patógenos, los cuales activan la reacción de hipersensibilidad, dicha reacción consiste en la aparición de pequeños parches necróticos alrededor del sitio de infección que ayuda a restringir la propagación del patógeno (Lam et al., 2001). Además, hay un incremento en la expresión de las proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y de defensinas para reforzar la inmunidad (Narasimhan et al., 2001).

Las fitohormonas, ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno, son los reguladores de la defensa que controlan las rutas de transducción que involucran la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y óxido nítrico (NO), los cuales actúan como segundos mensajeros en la regulación de genes que codifican para proteínas de defensa (Bolwell, 1999; Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Los hongos son organismos metabólicamente diversos y esto les permite adaptarse a diferentes hábitats y nichos ecológicos. El éxito de los patógenos al colonizar algún tejido depende de la liberación de proteínas efectoras que directamente crean un desbalance en las rutas de señalización (Kazan y Lyons, 2014; Chanclud y Morel, 2016; Patkar y Naqvi, 2017). Además, gran cantidad de hongos modifican el pH como consecuencia de su metabolismo o al producir auxinas y citocininas. Estos estímulos pueden ser percibidos e influyen en el crecimiento y desarrollo a través de la modulación de las rutas de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Contreras-Cornejo et al. 2009; Contreras-Cornejo et al. 2016; Pelagio-Flores et al. 2017; Spallek et al. 2018). Así, los metabolitos fúngicos extracelulares, además de las proteínas efectoras son componentes clave en las

relaciones inter-específicas que se establecen entre organismos de diferentes reinos.

La enfermedad de la pudrición peduncular en frutos de aguacate la causan diversas especies de hongos y una característica es un halo de coloración marrón oscuro a negro, que posteriormente se necrosa con daño en los tejidos de conducción de agua, daños en el mesocarpio comestible y reduce la calidad y el valor económico pos cosecha (Espinoza Madrigal et al., 2018). Géneros fúngicos como *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Diaporthe* y *Colletotrichum* se relacionan con la pudrición peduncular (Twizeyimana et al., 2013). Estos hongos pueden estar presentes en las ramas del árbol de aguacate y crecen hacia el pedúnculo del fruto antes de la cosecha. La pudrición peduncular es resultado de la interacción con el patógeno, que prolifera al tomar nutrientes del fruto y causa la aparición de síntomas de enfermedad como la necrosis y la coloración negra del mesocarpio, lo cual reduce la aceptación de los consumidores (Everett y Pak, 2001; Hartill y Everett, 2002).

En el presente trabajo se evaluó el efecto que inducen tres hongos aislados de frutos de aguacate con pudrición peduncular: *Phomopsis viticola* 5480, *Diaporthe phaseolorum* 5185 y *Pseudofusicoccum stromaticum* sobre la morfología de la raíz y la expresión de genes relacionados con las vías de señalización de fitohormonas de crecimiento, desarrollo y defensa en *Arabidopsis*. Los datos muestran una interacción compleja, en la cual, cada hongo modifica el sistema radicular de *Arabidopsis* de manera diferencial y específica, dependiente de la señalización de auxinas y citocininas. Además, la inducción del gen *LOX2:GUS* inducible por AJ se demostró una vez que las plantas se expusieron a los metabolitos secundarios de los tres hongos, un indicio de que se estimula una respuesta de defensa durante la interacción.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. *Arabidopsis thaliana***

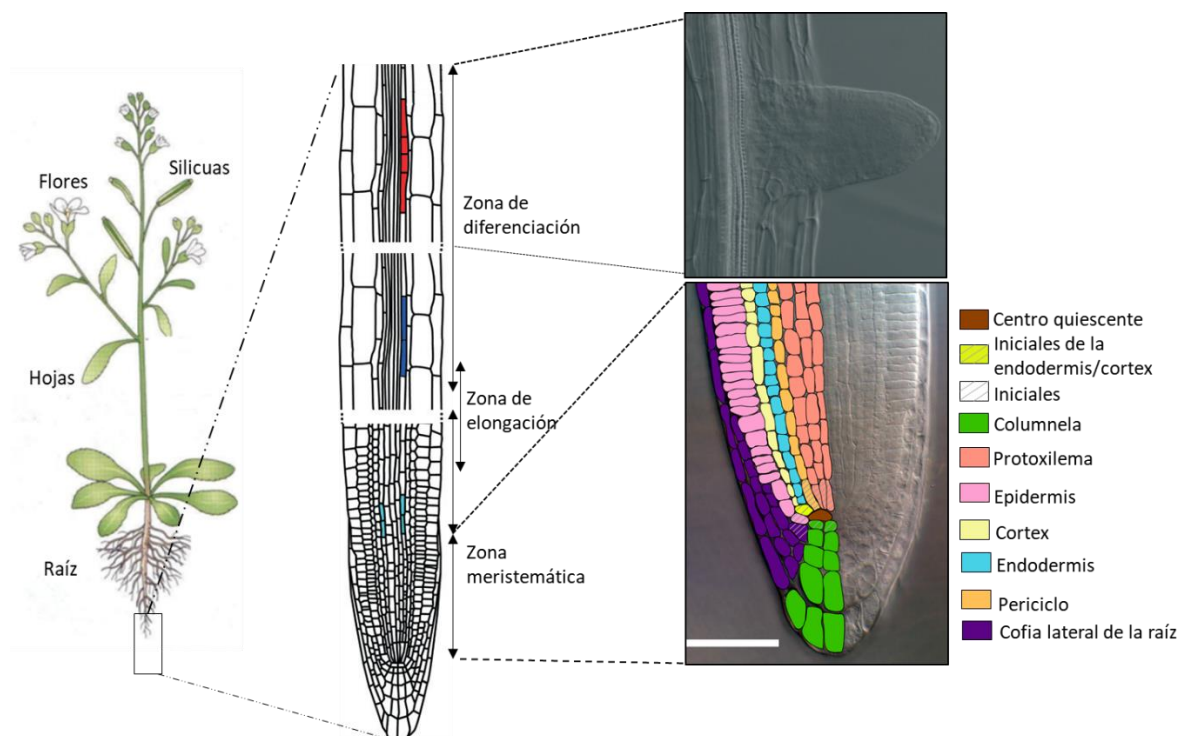
*Arabidopsis thaliana* es una planta pequeña, dicotiledónea, miembro de la familia Brassicaceae con una amplia distribución natural a través de Europa, Asia y Norteamérica. *Arabidopsis* se ha convertido en una planta modelo para los investigadores en genética, bioquímica y fisiología vegetal en las últimas décadas. El ciclo completo de vida de *Arabidopsis*, desde la germinación de la semilla hasta la floración y maduración de las primeras semillas se completa en 6 a 8 semanas. En *Arabidopsis* se han desarrollado procedimientos simples de mutagénesis química e insercional, métodos eficientes para llevar a cabo cruza e introducir ADN a través de la transformación de plantas, que han permitido disponer de colecciones extensas de mutantes con fenotipos diversos y una variedad de mapas cromosómicos de genes mutados y marcadores moleculares (Meinke et al., 1998).

### **2.2. La raíz de *Arabidopsis***

La raíz de las plantas desempeña múltiples funciones como la toma de agua y de nutrientes, anclaje al suelo y el establecimiento de interacciones bióticas en la rizosfera. Los procesos que afectan la morfología radicular son la división celular en el meristemo de la raíz primaria, la formación de raíces laterales y de pelos radiculares (López-Bucio et al., 2003).

El ápice de la raíz primaria de *Arabidopsis* está formado por cuatro zonas distintas de crecimiento, que incluyen la zona meristemática (ZM), en donde ocurre división celular activa; la zona de transición (ZT) del meristemo, donde las células detienen la división y crecen lentamente en longitud; la zona de elongación (ZE), cuyas células presentan una elongación rápida. Por último, en la zona de diferenciación (ZD) se detiene la elongación y aparecen estructuras diferenciadas como los pelos radiculares y las raíces laterales. La raíz de *Arabidopsis* está organizada en capas arregladas concéntricamente del exterior al interior por la epidermis, el córtex y endodermis, el periciclo y los tejidos vasculares. En el ápice también se localiza la columela y la cofia lateral, dos tejidos de protección contra la abrasión provocada por el suelo (Fig. 1) (Ubeda-Tomás et al., 2012; Huerta-Venegas, 2018).

Un número pequeño de células iniciales rodea el centro quiescente (CQ) y forman un nicho de células fuente que permite generación de todos los tejidos a través de divisiones mitóticas seguidas por una expansión celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, este proceso es continuo y se presenta en todo el tiempo de vida de la planta (Fig. 1) (Scheres et al., 2002). Para mantener la integridad de la raíz, se requiere un crecimiento coordinado de los diferentes grupos de células que la constituyen (Ubeda-Tomás et al., 2012). Los cambios en la morfología del sistema radicular afecta la capacidad de las plantas para captar agua y nutrimentos minerales (López-Bucio et al., 2003). Debido a la disponibilidad de herramientas genéticas, *Arabidopsis* es un sistema adecuado para estudiar la dinámica y los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del sistema radicular (Ubeda-Tomás et al., 2012).

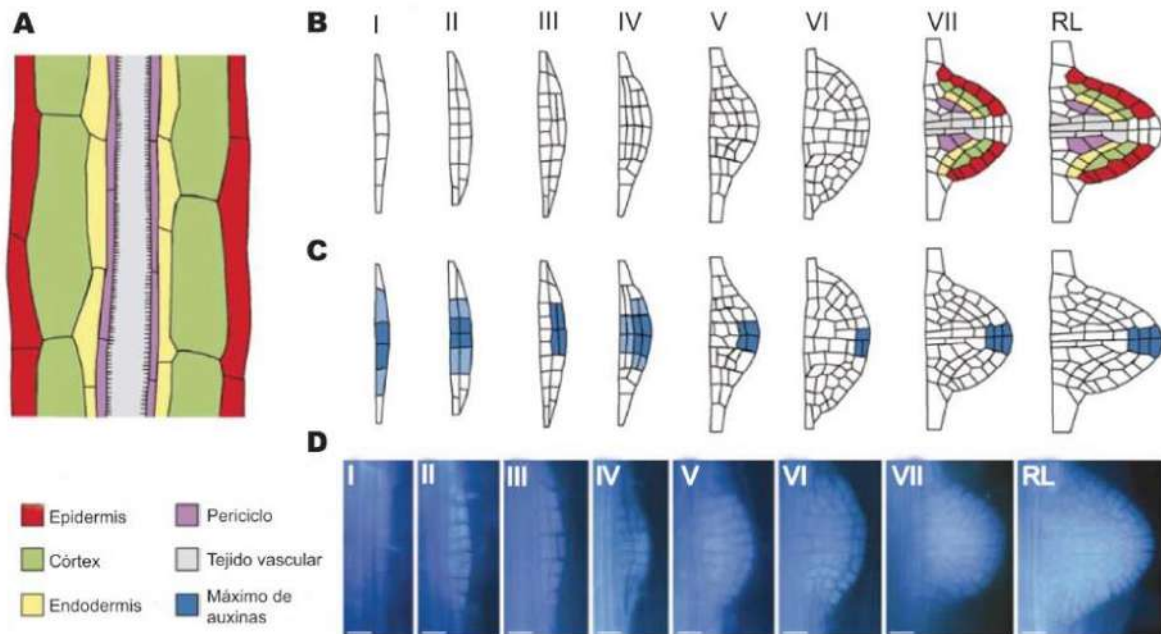


**Figura 1. Estructura del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*.** En el esquema se presentan el corte longitudinal de la raíz primaria y los diferentes tejido que la conforman. Modificado de Ive-De-Smet et al., (2011); Barrada et al., (2015).

El sistema radicular, conformado por la raíz primaria, las raíces laterales y los pelos radiculares, cumple las funciones de anclaje y toma de nutrientes y agua, además secreta diversas clases de compuestos al medio circundante. Esta área, llamada rizosfera, puede dividirse en tres zonas: endorizosfera (tejido radicular, que incluye la endodermis y las capas corticales), rizoplano (superficie radicular de la epidermis y el mucílago) y ectorizosfera (comprende el suelo alrededor de la raíz). Durante su desarrollo las raíces liberan aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides, ligninas, cumarinas, glucosilatos, compuestos indólicos, proteínas y enzimas que aportan nutrientes a los microorganismos (Badri y Vivanco, 2009).

### **2.3. Raíces laterales**

Las raíces laterales (RL) se forman a partir de las células del periciclo opuestas a los polos de xilema a una cierta distancia del meristemo de la raíz primaria (Scheres et al., 2002). El proceso del desarrollo de la raíz lateral presenta siete etapas definidas por las características anatómicas y de división celular, donde los puntos clave son: primero, la estimulación y la desdiferenciación de las células de periciclo, seguido por una división celular ordenada y una diferenciación celular para generar un primordio. Posteriormente, desarrollan su propio meristemo apical y emergen de la raíz parental (Fig. 2) (Malamy y Benfey, 1997).



**Figura 2. Cambios morfológicos durante el proceso de formación de raíces laterales de *Arabidopsis*.** a) Las raíces laterales se originan de la raíz primaria a partir de células del periciclo; b) Estados de desarrollo de primordios de raíces laterales reportados por Malamy y Benfey, 1997; c) Con la línea marcadora *DR5:GUS* se puede observar de color azul el establecimiento de los máximos de auxinas; d) Fotos representativas de la formación del primordio. Las líneas de escala representan 20  $\mu\text{m}$ . Modificado de Péret et al., (2009).

## 2.4. Pelos radiculares

Los pelos radiculares son extensiones de células de la epidermis de forma tubular que están posicionadas entre dos células corticales subyacentes (Cho y Cosgrove, 2002). Dichas extensiones incrementan el área de la superficie de la raíz y ayudan a las plantas a adquirir nutrientes y agua e incrementan el área de interacción con microorganismos (Grierson et al., 2014). La superficie de los pelos radiculares puede representar el 70 % del área total de absorción, por lo cual crean una ventaja competitiva en situaciones de agobio ambiental (López-Bucio et al., 2003).

En *Arabidopsis*, las células epidérmicas incluyen a los tricoblastos, los cuales rápidamente se diferencian en un pelo radicular y a los atricoblastos, carentes de pelos. La diferenciación del pelo radicular es dependiente de la posición de la célula y está bajo el control del intercambio de señales entre las células de la epidermis de la raíz y células corticales vecinas. La comunicación extensiva entre las células

epidérmicas y corticales resulta en la expresión específica del factor de transcripción *GLABRA2* (*GL2*), el cual remodela la cromatina a través de la acetilación de histonas. Después de la diferenciación de células epidérmicas y el establecimiento de la polaridad de la célula (emergencia de un bulto), la elongación del futuro pelo radicular comienza. El crecimiento de la punta comprende un proceso continuo de migración de vesículas hacia la membrana plasmática y de compuestos de la pared celular en el ápice. Además, ocurre un reacomodo de componentes del citoesqueleto, incluyendo fibras de actina, miosina y tubulina, la concentración de calcio en el citosol [ $\text{Ca}^{2+}$ ] aumenta en el ápice del pelo radicular y se presentan oscilaciones del pH extracelular e intracelular, así como, la producción de EROS y la señalización por fosfolípidos que posibilita la elongación del pelo radicular. Además, hay una señalización molecular de auxinas (Beemster et al., 1998; Libault et al., 2010).

## **2.5. Reguladores del crecimiento vegetal**

El crecimiento y desarrollo vegetal involucra la integración de múltiples señales ambientales y endógenas, que en conjunto con un programa genético, determina la forma de la planta. Los reguladores implicados en este proceso incluyen a las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, ácido jasmónico y ácido salicílico (Gray, 2004).

### **2.5.1. Auxinas**

El ácido indolacético (IAA) es la auxina principal de las plantas, que regula la división y elongación celular y desencadena eventos de diferenciación específicos permitiendo numerosos y diversos procesos de desarrollo, ejemplo de ello es el establecimiento de la polaridad del embrión, la diferenciación vascular, la dominancia apical y las respuestas trópicas a la luz y a la gravedad. Las respuestas a las auxinas están reguladas a diferentes niveles, como la biosíntesis, la conjugación y la degradación; el transporte direccional para generar un gradiente en los tejidos y la señalización. La distribución de las auxinas ocurre coordinadamente a través de su almacenamiento como precursores inactivos,

degradación y mediante los transportadores de entrada (influjo) y salida (eflujo) y su percepción y señalización a través de la regulación transcripcional (Fig. 3) (Robert y Friml, 2009; Hayashi, 2012; Schaller et al., 2015).

El IAA se sintetiza principalmente por los precursores generados vía la ruta del ácido shikímico. Esta ruta produce precursores para la biosíntesis de diferentes compuestos indólicos, aminoácidos aromáticos, alcaloides y otros metabolitos. El L-triptófano, el cual es el precursor del IAA, se sintetiza del corismato, producto final de la ruta del ácido shikímico (Ljung, 2013). La ruta más importante de biosíntesis de auxinas incluye dos pasos que modifican al L-triptófano e involucra a las enzimas TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED (TAA1/TAR) y YUCCA. Además, el ácido indol-3-butírico funciona como un precursor endógeno de IAA, el cual se convierte a IAA por  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas. La regulación de los niveles de auxinas a través de la síntesis *de novo* es uno de los mecanismos homeostáticos más importantes. Sin embargo, los niveles de IAA varían debido a una conjugación (mayormente a aminoácidos y azúcares) y regulada por la familia de proteínas amido sintasas y amido hidrolasas GH3 formando los conjugados de IAA que son compuestos de almacenamiento reversibles o irreversibles.

La inactivación y degradación de auxinas se genera por su oxidación a ácido 2-oxindol-3-acético (oxIAA) o a 2-oxindol-3-acético-glucosa (oxIAA-Glc), el cual es catalizado por DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION1 (DAO1) (Ljung, 2013; Vernoux y Robert, 2017).



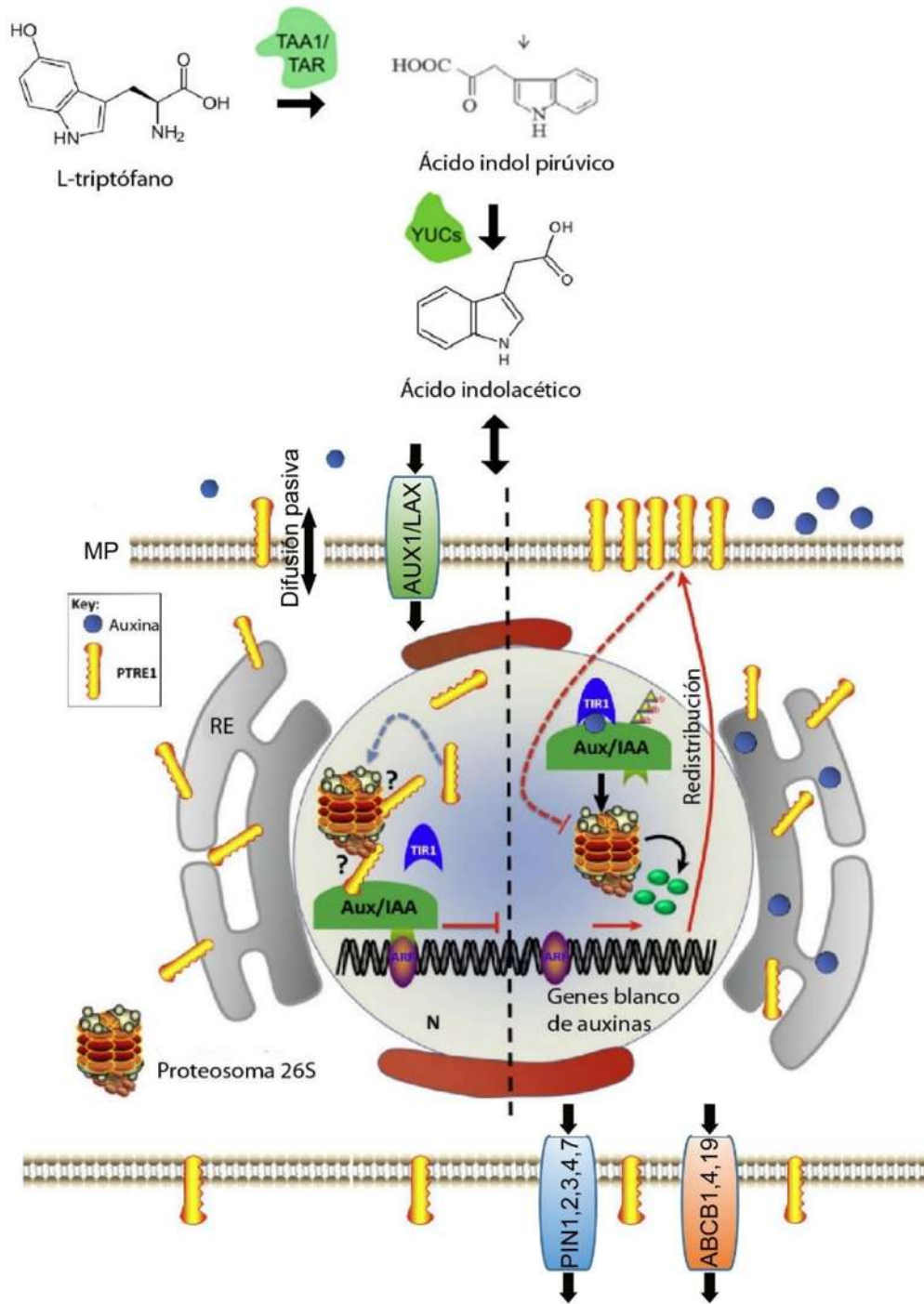
**Figura 3. Niveles de regulación de las auxinas.** Elementos moleculares involucrados en la biosíntesis, degradación, transporte y señalización. Modificado de Schaller et al., (2015).

Las auxinas se sintetizan en diferentes partes de la planta, pero la mayor cantidad se produce en tejidos jóvenes como el meristemo aéreo, las hojas y en menor cantidad en la raíz primaria y en las raíces laterales. Desde los sitios de síntesis, las auxinas son redistribuidas hacia toda la planta donde son requeridas para la división y elongación celular, la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo vegetativo y reproductivo y las respuestas trópicas (Muñoz-Parra, 2014). El transporte y distribución de las auxinas permite establecer un gradiente mediante la ubicación específica de los transportadores de entrada (influjo) y salida (eflujo) en las membranas celulares. Las auxinas recién sintetizadas se transportan a los órganos mediante dos tipos de sistemas de transporte: a través del floema,

denominado transporte no polar o pasivo y entre célula y célula, denominado transporte polar de auxina (TPA) o transporte activo. En el transporte no polar, las auxinas y otros compuestos indólicos se mueven a larga distancia relativamente rápido a través del floema junto con los fotosintatos a diversos tejidos blanco (Magaña-Dueñas, 2015). El TPA que ocurre de célula a célula requiere energía, es relativamente lento, saturable y específico para auxinas libres activas. Las auxinas son transportadas entre células a través de diversas familias de transportadores: de influjo que pertenecen a la familia AUXIN RESISTANT1/LIKE-AUX1 (AUX1/LAX) y los de eflujo, los cuales se agrupan en la familia PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia ATP-binding cassette B/resistente a multidroga/P-glicoproteínas (ABCB/MDR/PGP). Ambos tipos de transportadores establecen los gradientes de auxinas, los cuales son regulados por la expresión y localización subcelular de las proteínas transportadoras en respuesta a señales ambientales y durante el desarrollo (Michniewicz et al., 2007; Magaña-Dueñas, 2015).

Las auxinas son percibidas por un receptor de auxinas nuclear denominado TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 y por las proteínas AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFBs). En presencia de bajas concentraciones de auxinas las proteínas represoras transcripcionales Aux/IAA se encuentran unidas a los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) y bloquean su función. En presencia de un exceso de auxinas, las proteínas represoras Aux/IAA forman un complejo con las proteínas TIR1/AFBs, lo que promueve la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA y su subsecuente degradación por el protosoma 26S, liberando así a los ARFs. Los ARFs modulan la expresión de diversos genes inducibles por auxinas en cuestión de minutos, de los cuales destacan tres familias de genes: *SAUR*, *GH3* y *Aux/IAA*. Además del sistema de percepción de auxinas controlado transcripcionalmente, se conoce otro sistema de percepción de auxinas independiente, no transcripcional, controlado por la proteína AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1), la cual se localiza en el retículo endoplásmico y actúa principalmente en el alargamiento y la división celular (Hayashi, 2012; Schaller et al., 2015; Strader y Zhao, 2016). El PROTEASOME REGULATOR1 (PTRE1) se le ha propuesto como un regulador positivo de la actividad del proteosoma 26S.

PTRE1 se localiza en el núcleo, membrana plasmática y en el retículo endoplásmico ya que contiene una región transmembranal en su extremo N-terminal. En niveles bajos de auxinas, la actividad del proteosoma 26S se mantiene por la distribución apropiada de PTRE1 en la membrana plasmática y compartimentos intracelulares. En respuesta a las auxinas, cuando se asocia TIR1/AFBs y Aux/IAA y se degradan estos últimos, las auxinas reprimen a PTRE1 para inhibir la actividad del proteosoma posiblemente al estimular la acumulación de PTRE1 en la membrana plasmática, lo que genera un descenso de su localización nuclear e intracelular y por lo tanto reprime la degradación de las proteínas Aux/IAA para coordinar la regulación de la respuesta a auxinas (Fig. 4) (Weijers y Wagner, 2016; Kong et al., 2016; Yang et al., 2016).



**Figura 4. Biosíntesis, percepción y señalización de auxinas.** a) Cuando los niveles de las auxinas son ínfimos el represor AUX/IAA se une a los factores ARF impidiendo la transcripción de genes. b) Incrementos en los niveles de auxinas promueven la transcripción al permitir que el correceptor TIR1/AFB reclute al represor AUX/IAA hacia el complejo ubiquitin ligasa SCFTIR1/AFB, el cual a la vez promueve su degradación mediante el proteosoma 26S, liberando así a los factores ARF. Modificado de Kong et al., (2016); Vernoux y Robert, (2017).

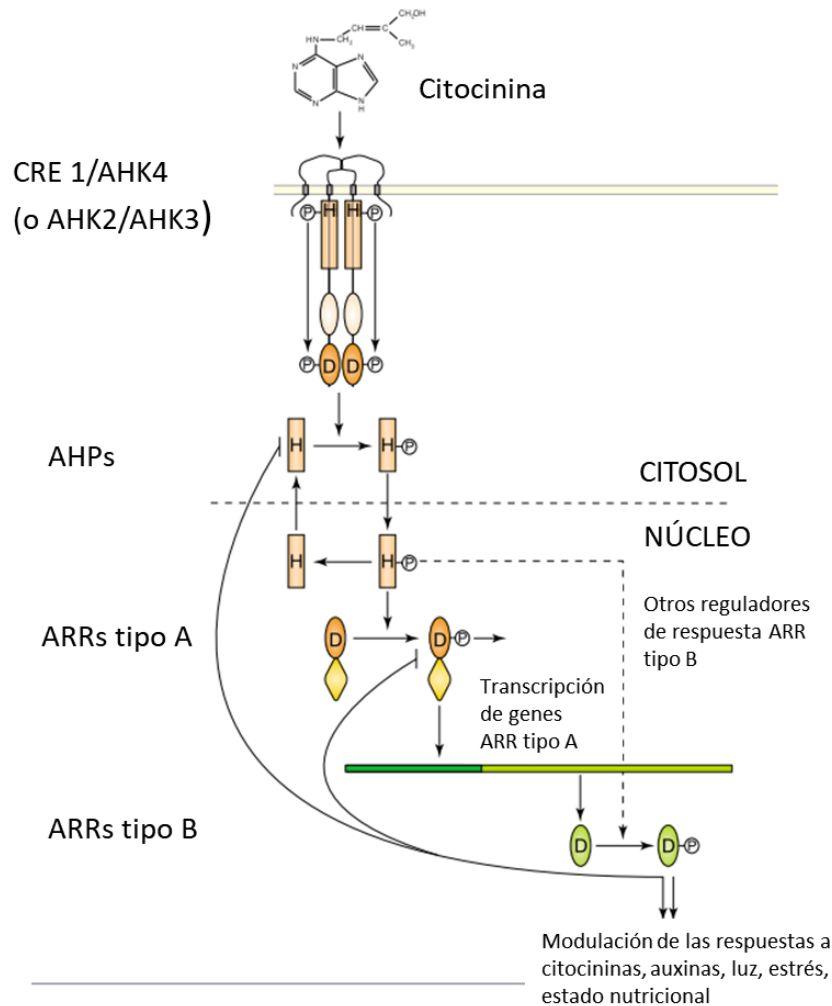
### 2.5.2. Citocininas

Las citocininas regulan múltiples procesos de crecimiento y desarrollo, división celular, germinación, actividad meristemática, inmunidad, metabolismo primario y secundario, diferenciación del xilema, desarrollo de vasculatura, de los gametofitos y de los cloroplastos. Además, controlan el desarrollo del meristemo del brote, la dominancia apical, la movilización de nutrientes, las relaciones entre nutrientes y la fuente de éstos y el retraso de la senescencia. Los síntomas de enfermedad en las plantas como agallas, tumores, manchas y nudos se asocian con altos niveles de citocininas (Spallek et al., 2018). Son uno de los determinantes del estatus energético y la fotosíntesis, ya que modulan la acumulación de antocianinas inducida por azúcares y promueven la acumulación del almidón en las hojas, a través de la expresión de genes relacionados con el metabolismo del almidón y/o aumentando la fijación de CO<sub>2</sub> (Sánchez-López et al., 2016).

Las citocininas son abundantes en la punta de la raíz primaria, en el meristemo apical del brote, y en las semillas inmaduras (Kakimoto, 2003). El primer paso en su biosíntesis está catalizado por la isopentiltransferasa (IPT) y consiste en la adición de un prenilo de un dimetilalil difosfato al ATP/ADP para producir el ribotido N<sup>6</sup>-isopentiladenina (iP). Los iP pueden convertirse en CK tipo *trans*-zeatina (*tZ*) mediante la hidroxilación de la cadena isoprenoide por la citocromo P<sub>450</sub>. Las formas activas de CK son los ribotidos de citocininas, los cuales se obtienen a través de un solo paso catalizado por una familia de nucleósido 5'-monofosfato fosforibohidrolasas LONELY GUY (LOG). Los niveles de citocininas pueden ser reducidos a través de su conjugación con la glucosa, dichas moléculas son inactivas y no pueden unirse con los receptores, o por enzimas amino oxidasas dependientes de cobre que rompen la cadena lateral N<sup>6</sup>, inactivándolas irreversiblemente (Schaller et al., 2015).

Las citocininas se translocan a células blanco por la difusión en el floema y/o a través del transporte activo. Desde el brote se transportan a la raíz a través del floema, donde tienen funciones importantes en la regulación del TPA y en el mantenimiento de los patrones vasculares, así como en la nodulación de la raíz de leguminosas. Recientemente, se propuso que el transportador ATP-BINDING

CASSETTE (ABC) TRANSPORTER (ABCG14) exporta citocininas desde su sitio de biosíntesis en la raíz hacia el xilema y la PURINE PERMEASE (PUPs) importa las CKs dentro de la célula para iniciar las cascadas de señalización (Kang et al., 2017). Las plantas perciben y responden a las citocininas a través de dos pasos de fosfotransferencia. En *A. thaliana* se han identificado proteínas histidin cinasas transmembranales que actúan como receptores de las citocininas, ARABIDOPSIS HIS KINASE 2 (AHK2), AHK3 y AHK4/WOL1 (WOODENLEG 1)/CRE1 (CYTOKININ RESPONSE 1). Una vez que las citocininas se unen, los receptores se autofosforilan y transfieren la señal vía fosforilación, a los miembros de la familia de ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEIN (AHPs), los cuales se translocan en el núcleo para transferir el fosfato a miembros de la familia de proteínas ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs) tipo B y tipo A. Al mismo tiempo, las AHPs regulan la acumulación de los CYTOKININ RESPONSE FACTORS (CRFs), miembros de la familia de factores de transcripción *Arabidopsis* AP2. Los ARRs tipo B activados actúan como factores de transcripción (Fig. 5) (Perilli et al., 2010).



**Figura 5. Señalización de citocininas.** Los receptores transmembranales del núcleo AHK y CRE perciben a las citocininas, Una vez que las citocininas se unen, los receptores se autofosforilan y transfieren el fósforo a las AHPs, luego se translocan al núcleo para fosforilar a los ARRs tipo B que inducen la transcripción de genes, mientras que los tipo A regulan negativamente la señalización de las citocininas. Modificado de Heyl y Schmölling, (2003).

Una acumulación excesiva de citocininas en la punta de la raíz provoca una represión en la elongación, se sabe que algunos patógenos utilizan esta vía de señalización para aumentar su virulencia. La aplicación de las CK reduce el tamaño del meristemo radicular y promueve la diferenciación celular en la zona de transición (ZT) (Dello Iorio et al., 2007).

Aunque, tanto las auxinas como las citocininas pueden ser sintetizadas en las raíces y en los brotes. La producción de estas señales no ocurre aleatoriamente sino que es regulada por la localización de los tejidos que las producen, el estadio de

desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales prevalentes como la luz y la temperatura (Ortíz-Castro et al., 2009).

### 2.5.3. Ácido jasmónico (AJ)

El ácido jasmónico (AJ) y sus derivados, comúnmente denominados jasmonatos, son reguladores hormonales involucrados en la respuesta vegetal al estrés biótico y abiótico. Durante el desarrollo, participan en la formación de raíces laterales y adventicias, la germinación de la semilla, la senescencia de las hojas, la formación de tricomas y el desarrollo del embrión y del polen (Hause et al., 2002; Wasternack y Strnad, 2016).

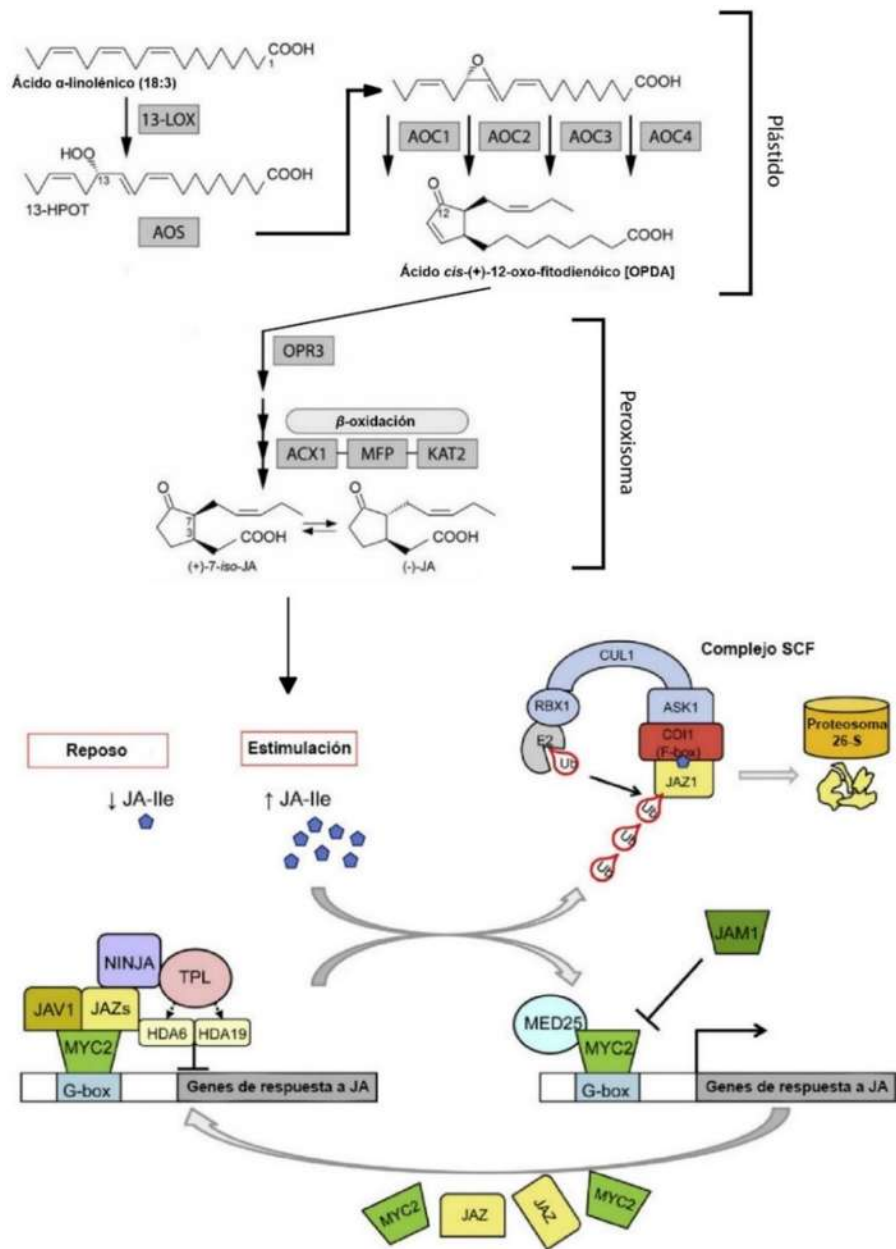
El sustrato para la biosíntesis de ácido jasmónico es el ácido graso ácido  $\alpha$ -linolénico ( $\alpha$ -LeA) que se libera de los galactolípidos de las membranas de los cloroplastos. La biosíntesis comienza con la inserción de un oxígeno en la posición 13 del  $\alpha$ -LeA catalizado por una LIPOXIGENASE (13-LOX), se forma ácido (13S)-hidroperoxioctadecatrienóico (13-HPOT). *Arabidopsis thaliana* presenta seis genes LOX, el 13-LOX codificado por *LOX2*, el cual es el único con función demostrada en la biosíntesis. El producto de la 13-LOX se convierte por un ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS) a un compuesto inestable que rápidamente se transforma en cetol y ácido oxo-fitodienóico (OPDA) racémico o puede ser convertido en *cis*-(+)-OPDA por una ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC). Cuatro genes codifican para AOCs en *Arabidopsis*: *AOC1-AOC4*, los cuales son expresados local y sistémicamente en respuesta a una herida, con mayor preferencia de *AOC2*. El paso catalizado por las AOS es de especial importancia en la regulación de la biosíntesis, ya que establece la última estructura enantiomérica.

La segunda parte de la biosíntesis se lleva a cabo en los peroxisomas; los mecanismos por los cuales el OPDA se exporta de los cloroplastos a los peroxisomas no está completamente entendido, pero depende del acarreador COMATOSE1/PEROXIMAL 1/ PEROXISOME ABC TRANSPORTER (ABC/CTS1/PXA1/PED3). La conversión del OPDA a ciclopentanonas es catalizado por la OPDA REDUCTASE (OPR) que se codifica por una familia pequeña de genes en *Arabidopsis*. En el paso final, la cadena lateral del ácido carboxílico se acorta en

tres rondas de  $\beta$ -oxidación. Tres mecanismos están involucrados en la regulación de la biosíntesis del AJ en *Arabidopsis*: la disponibilidad del sustrato, retroalimentación positiva y especificidad del tejido (Ren y Dai, 2012; Wasternack y Hause, 2013).

El AJ no es el único compuesto ciclopentanona que se encuentra en las plantas. Aunque su acumulación es el primer indicador por su función en cualquier proceso, hay numerosas conversiones metabólicas como metilación, glicosilación, descarboxilación a *cis*-jasmonato, hidroxilación a 12-OH-JA, sulfatación, conjugación con aminoácidos preferentemente a la isoleucina, formando al JA-Ile, metilación a JA-Me-Ile, hidroxilación a JA-Ile y la formación de JA-Ile glucosil éster. Estos metabolitos pueden clasificarse como activos, inactivos o parcialmente activos. Los últimos participan en reacciones específicas e independientes del receptor COI1 (Delker et al., 2006; Wasternack y Strnad, 2016).

La molécula bioactiva de AJ es el conjugado con isoleucina (JA-Ile). El primer proceso de transducción de señales después de su percepción radica en los factores de transcripción basic-helix-loop-helix (bHLH), de éstos, el mejor caracterizado es MYC2. En condiciones de estrés, la respuesta al AJ la controla un grupo de proteínas nucleares, los represores JASMONATE-ZIM-DOMAIN (JAZ). Estos últimos interactúan con la proteína F-box COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1), parte integral del complejo SCF involucrado en la co-recepción del AJ biológicamente activo (JA-Ile). Para reprimir la actividad transcripcional río abajo de los factores de transcripción, las proteínas JAZ bloquean la actividad de MYC2 en ausencia de AJ bioactivos, al reclutar a los co-represores TOPLESS (TPL) a través de la interacción con la proteína adaptadora NOVEL INTERACTOR OF JAZ (NINJA). El bloqueo de MYC2 puede ser liberado por la degradación de las proteínas JAZ a través de SCF<sup>COI1</sup> inducido por JA-Ile (Fig. 6) (Santino et al., 2013).



**Figura 6. Biosíntesis y señalización del ácido jasmónico.** La biosíntesis comienza con la oxigenación del ácido  $\alpha$ -linolénico por 13-LOX, formando al ácido (13S)-hidroperoxioctadecatrienóico (13-HPOT), el cual se convierte por una ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS) en un compuesto inestable que rápidamente se transforma a OPDA racémico, dicho producto se transporta al peroxisoma donde se llevan a cabo tres rondas de  $\beta$ -oxidación. La percepción del JA/JA-Ile por el complejo SCF<sup>COI1</sup>-JAZ permite la expresión de los genes *MYC2*. *MYC2* se une a la caja G de los genes de respuesta a JA/JA-Ile, es reprimido por reguladores negativos como JAZs. NINJA y TOPLESS (TPL), actúan vía HISTONE DEACETYLASE6 (HDA6) y HDA19 y funcionan como co-represores. JASMONATE-ASSOCIATED VQ MOTIF GEN 1 (JAV1) actúa con el represor JAZ (lado izquierdo), mientras que JAMs (JASMONATE ASSOCIATED MYC2-LIKE1, JAM2, JAM3)

(lado derecho) son antagonistas de MYC2 con respecto a la unión de la G-box. JAZs y JAV1 son ubiquitinizados y enviados a degradación en el proteosoma. MYC2 puede entonces cambiar en la transcripción de genes de respuesta a JA/JA-Ile, que incluye genes de respuesta temprana como JAZs y MYC2. Modificado de Delker et al., (2006); Claus et al., (2016).

## **2.6. Hongos**

Los hongos pertenecen al clado Fungi, son organismos eucariotas, heterotróficos, que se desarrollan a partir de células tubulares, llamadas hifas con crecimiento apical, que se ramifican y difunden. La reproducción de los hongos se lleva a cabo por esporas (Shenoy et al., 2007; Kohli et al., 2008).

Los hongos cumplen diversas funciones ecológicas y biotecnológicas basadas en su versatilidad nutricional y en su variedad de interacciones con las plantas. Estos organismos son importantes en la descomposición y reciclaje de materia orgánica; al interactuar positivamente o negativamente con las raíces o con la parte aérea (Zeilinger et al., 2016).

Las interacciones planta-hongo benéficas promueven el crecimiento y desarrollo de la planta, al actuar el hongo como un simbiote que mejora la adquisición de nutrientes del suelo y la tolerancia al estrés. A cambio, las plantas liberan carbohidratos y otras moléculas útiles para el hongo. Otras especies fúngicas desarrollan estrategias diferentes, al romper el balance de beneficio mutuo se convierten en patógenos clasificados como biotrofos, hemibiotrofos y necrotrofos. Las heridas y los estomas de las hojas son la ruta usual por la que los patógenos ingresan, los hongos necrotrofos, presentan un amplio número de hospederos, donde causan rápidamente daños en los tejidos lo que conduce a la destrucción de la membrana del hospedero y a la liberación de sus nutrientes, seguido de la colonización y descomposición del tejido. Los biotrofos, en contraste, son parásitos obligados que no producen toxinas pero secretan efectores para reprimir el sistema inmune. Dichos organismos, pueden completar su ciclo de vida únicamente en células vivas del hospedero lo que permite que los síntomas de enfermedad se expresen después de un tiempo relativamente largo después de la infección. Los patógenos hemibiotrofos son intermediarios entre las formas necrotrofas y biotrofas, inicialmente crecen como biotrofos y después cambian a una forma de vida

necrotrofica. Varios hemibiotrofos requieren periodos largos desde la colonización hasta el establecimiento de una infección, mientras que otros cambian a necrotrofos rápidamente (Zeilinger et al., 2016).

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son habitantes comunes de la rizosfera, ampliamente estudiados por su producción de antibióticos, por parasitar otros hongos y por competir con microorganismos deletéreos, además de promover el crecimiento (Contreras-Cornejo et al., 2011).

### **2.6.1. Acidificación del medio**

Los hongos prosperan en un amplio intervalo de pH ambiental. La habilidad de los patógenos para modificar su ambiente y activar rutas de señalización les permite controlar no solo su crecimiento y desarrollo sino también la colonización de sus hospederos (Prusky et al., 2016). Este último proceso incluye la alcalinización de los hospederos como *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. coccodes* y *C. higginsianum*; así como la acidificación por *Penicillium expansum* y *P. digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis magnifera*, etc. La transición de estado quiescente a una colonización necrotrofica por los patógenos poscosecha involucra la acumulación de moléculas pequeñas secretadas como el amoníaco, el ácido glucónico y oxálico. Estos compuestos se presentan en varios estadios del ataque fúngico como la germinación, formación de apresorios, penetración y colonización (Alkan et al., 2013; Prusky et al., 2016)

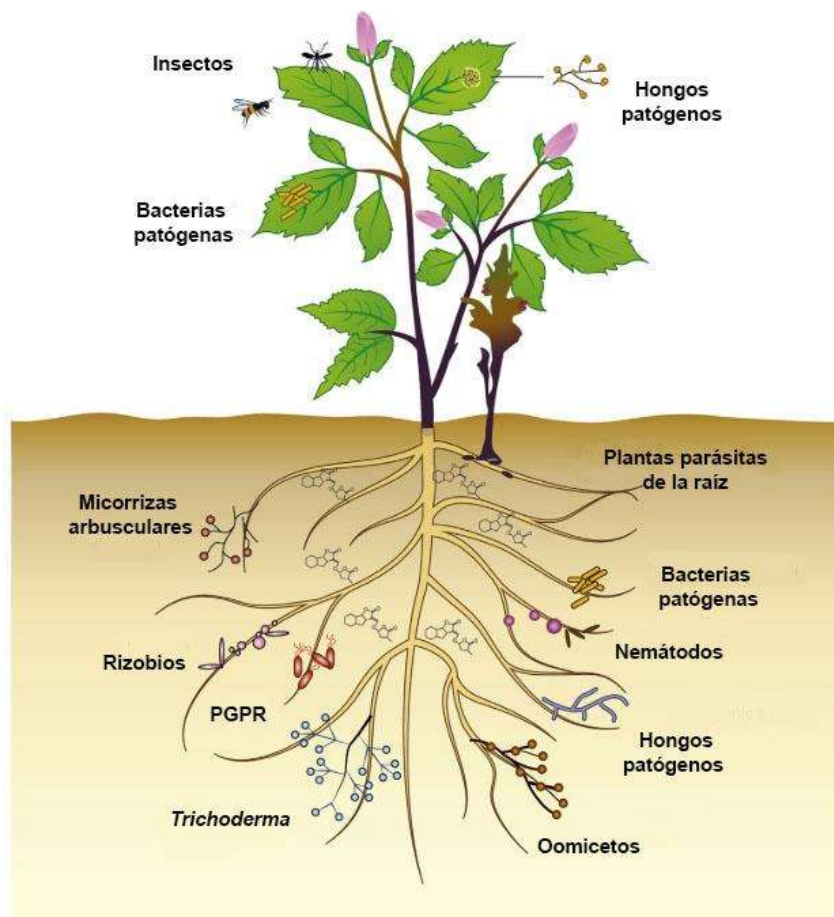
Un primer contacto de las células de las raíces con los solutos externos es la rizosfera, donde las condiciones fisicoquímicas son el factor más importante para la proliferación vegetal y microbiana, entre las cuales la más significativa es el pH. Un pH óptimo para el crecimiento varía considerablemente entre las diferentes especies vegetales, pero la mayoría de las especies cultivadas crecen en medios neutros o ligeramente ácidos, ya que las células de la raíz necesitan mantener un pH citoplásmico entre 7 y 7.5 para su función normal. Las células al secretar protones acidifican el suelo circundante de la punta de raíz, lo cual permite la solubilización y disponibilidad de algunos nutrientes. Sin embargo, cuando disminuye el pH del suelo (menor a 5.5), el crecimiento de la raíz se reprime y el rendimiento de la planta

disminuye. Un pH ácido inhibe la división celular y alargamiento de la raíz, por tanto afecta la viabilidad del meristemo (López-Bucio et al., 2015; Shavrukov y Hirai, 2016). Por ejemplo, la acidificación del medio por *T. atroviride* tiene una función importante en la morfogénesis de la raíz como respuesta temprana, al inhibir el crecimiento de la raíz primaria y estimular la formación de raíces laterales (Pelagio-Flores et al., 2017).

### **2.6.2. Interacción planta- hongo**

Uno de los hábitats que soportan el crecimiento de los hongos y bacterias es el suelo, donde pueden encontrarse como organismos de vida libre tanto en la superficie como en asociación con la raíz (Effmert et al., 2012). Las plantas han evolucionado para formar alianzas con hongos benéficos para asegurar su sano desarrollo (Evangelisti et al., 2014). Los hongos pueden promover el crecimiento vegetal al estimular la germinación de las semillas, proveer resistencia al estrés y mejorar la toma de nutrientes (Casarrubia et al., 2016). Los microorganismos pueden encontrarse tanto en la filósfera, sobre el suelo, en la rizosfera (bajo el suelo) y/o en la endosfera dentro del sistema vascular de transporte y los espacios apoplásticos (Fig. 7).

La exudación radicular es parte del proceso de rizodeposición, donde la cantidad y calidad de los exudados radiculares son determinados por la especie, la edad del individuo y por factores externos, tanto bióticos como abióticos. Los exudados radiculares contienen desde iones (como H<sup>+</sup>), ácidos inorgánicos, oxígeno y agua, aunque mayormente presentan compuestos a base de carbono, los cuales son atractivos y de utilidad para los microorganismos (Badri y Vivanco, 2009). Los microorganismos sintetizan múltiples sustancias, que incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, aminoácidos y hormonas, los cuales actúan directa o indirectamente para activar la inmunidad de la planta y regular su crecimiento y morfogénesis. En la interacción planta-hongo, las moléculas de señalización pueden tener un efecto tanto positivo como negativo. Las interacciones exitosas dependen de las señales que inician el proceso y después de las que mantienen y controlan la interacción (Contreras-Cornejo et al., 2016).



**Figura 7. Interacción planta-microorganismo.** Las asociaciones de las plantas pueden ser neutrales: sin ningún daño aparente a la planta. La interacción puede ser benéfica: ayudar a la nutrición o en la tolerancia y /o resistencia a diferentes estrés, como en el caso de micorrizas arbusculares, rizobios, *Trichoderma* y PGPR. También, las interacciones de las plantas pueden ser negativas, que causan daño o enfermedades en la planta hospedera, como en las interacciones con bacterias y hongos patógenos, oomicetos, nematodos o insectos. En todas las interacciones, la comunicación química entre la planta y los otros organismos es esencial. Modificado de López-Ráez, et al., (2017).

Uno de los hongos mejor estudiados por su interacción con plantas es *Trichoderma*. Sin embargo, el intercambio de moléculas de señalización es complejo y no han sido bien caracterizadas. Contreras-Cornejo et al., (2016) mostraron que en etapas tempranas de la interacción, las auxinas y compuestos proteicos liberados por *Trichoderma* son percibidos en las raíces y de esta forma alteran los mecanismos

hormonales, de las auxinas, citocininas y AJ, los cuales regulan el crecimiento y desarrollo vegetal bajo condiciones normales o de estrés. En consecuencia, cuando el sistema radicular es colonizado, la asociación se potencializa y proporciona protección en esta zona contra patógenos. Además, un sistema radicular robusto se desarrolla para mejorar la toma de agua y nutrientes.

## **2.7. Metabolismo secundario**

En contraste con el metabolismo básico que se refiere a los procesos anabólicos y catabólicos requeridos para el mantenimiento y proliferación de la célula, como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos y la diferenciación de tejidos, el metabolismo secundario incluye los compuestos en células especializadas que no son esenciales para el metabolismo primario básico, sin embargo, son necesarios para la supervivencia de los organismos en el ambiente (Lattanzio et al., 2006).

Los metabolitos secundarios como pigmentos, fitotoxinas, factores de virulencia, antibióticos, etc. son compuestos de bajo peso molecular, producidos diferencialmente en el ciclo de vida y en relación con un estadio específico de la diferenciación morfológica (Yu y Keller, 2005).

La diversidad tan amplia de los hongos es paralela a la heterogeneidad de hábitats que estos organismos ocupan, ya que están distribuidos alrededor del mundo, colonizan exitosamente diversos nichos ecológicos y microhábitats (Effmert et al., 2012). Los hongos que interactúan con plantas han desarrollado estrategias de supervivencia que involucran la emisión de moléculas de señalización para la comunicación. La liberación de compuestos de carbono a la rizosfera incrementa la actividad y biomasa microbiana. Los microorganismos de vida libre que incluyen a los hongos filamentosos y una variedad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son capaces de suprimir a los fitopatógenos y estimular el crecimiento por mecanismos directos como la producción de fitohormonas; o indirectos, que comprenden el micoparasitismo y la competencia, así como la descomposición y mineralización de materia orgánica que aumenta la

biodisponibilidad de nutrientes minerales como fósforo y hierro (Pérez-Flores et al., 2017; Ortíz-Castro et al., 2009).

### **2.7.1. Compuestos difusibles microbianos**

Gran cantidad de metabolitos secundarios fúngicos tienen funciones desconocidas en el organismo que las produce, pero son valiosos para los humanos por el hecho que tienen un amplio intervalo de actividades antibióticas, farmacológicas e inmunosupresoras (Yu y Keller, 2005). Diversos metabolitos producidos por hongos se usan como agentes de biocontrol e incluyen enzimas líticas, oligosacáridos y el ácido cianhídrico (Schalchli et al., 2014).

En microorganismos biotrofos obligados como los hongos formadores de micorrizas (AMFs, por sus siglas en inglés) es importante maximizar las oportunidades de colonizar a su hospedero. La liberación de señales solubles en la rizosfera es importante para que las dos partes estén “informadas” de presencia de las AMFs, incluso antes del contacto físico. Por lo cual, las moléculas difusibles de micorrizas llamados factores Myc, son reconocidos positivamente por la planta y permite el establecimiento de la simbiosis (Bonfante y Requena, 2011). *Gigaspora margarita* y *Gigaspora rosea* liberan factores Myc para colonizar las raíces y ayudan a las bacterias durante la nodulación (Sun et al., 2015; Oláh et al., 2005). De hecho se cree que los factores Myc fúngicos son los antecesores de los factores Nod en bacterias (Maillet et al., 2011).

*Glomus intraradices* secreta señales de simbiosis que son una mezcla de lipooligosacáridos simples sulfatados y no sulfatados (LOCs), los cuales estimulan la formación de micorrizas arbusculares en diferentes familias vegetales (Fabaceae, Asteraceae y Umbelliferae), además, estos compuestos estimulan el crecimiento radicular de *Medicago truncatula* (Fusconi, 2014).

Una gran cantidad de microorganismos asociados a plantas son por si mismos capaces de sintetizar fitohormonas, las cuales funcionan como mediadores en la comunicación entre ellos. Esta habilidad microbiana es percibida primero, como un signo de patogenicidad, debido a que un gran número de patógenos producen reguladores del crecimiento en cantidades excedentes a los niveles necesarios por

los vegetales. Por ejemplo, *Pseudomonas solanacearum* incrementa 100 veces más el contenido de auxinas en plantas infectadas, esta concentración de fitohormonas interrumpe el balance vegetal y causa la aparición de una variedad de enfermedades, que incluyen la formación de agallas, hernias y marchitez vascular (Tsavkelova et al., 2006; Hughes y Sperandio, 2008). *T. virens* y *T. atroviride* producen moléculas con actividad auxínica como parte de su metabolismo que incluye al IAA, al indol-2-etanol, al indol-3-acetaldehído y al indol-3-carboxaldehído (Contreras-Cornejo et al., 2011, 2009). *Pythium oligandrum*, un oomiceto antagonista que interacciona con la raíz libera triptamina (TNH<sub>2</sub>), un compuesto con actividad auxínica con el que promueve el crecimiento del tomate (Le Floch et al., 2003). La síntesis de fitohormonas es una de las principales propiedades de microorganismos rizosféricos, epífitos y simbioses que estimulan y facilitan el crecimiento vegetal (entre ellas las llamadas cepas PGPR) (Tsavkelova et al., 2006; Fu et al., 2015; Hung et al., 2015).

Los patógenos por su parte liberan una combinación de enzimas degradadoras de pared celular (CWDEs, por sus siglas en inglés), EROs y/o toxinas que desestabilizan la pared celular de los tejidos vegetales (Zeilinger et al., 2016).

### **2.7.2. Compuestos orgánicos volátiles fúngicos**

Las plantas emiten compuestos orgánicos volátiles (COVs) desde la raíz, las hojas, los frutos y las flores, utilizados tanto externamente como internamente, ya que pueden actuar como un sistema de señalización de defensa y para modular la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) a plagas, enfermedades y para aliviar estrés oxidativo y por calor. Dentro de los COVs los isoprenoides producidos por las plantas son los compuestos mejor estudiados, en particular los monoterpenos que proveen olores como el limoneno (cítrico), mentol (mentolado) y el pineno (resinoso) (Bennett et al., 2012). Los COVs vegetales incluyen el etileno, el metil salicilato y los jasmonatos, los cuales son importantes en la comunicación de herbívoros con plantas vecinas. Los volátiles vegetales están involucrados en las interacciones tritróficas (involucran a tres organismos), donde la acción de insectos alimentándose de plantas permite la liberación de volátiles que

atraen a predadores de los insectos. La producción de COVs en sistemas vivos muestra interacciones complejas y dinámicas con el ambiente como las respuestas en lapsos de tiempo cortos y largos a la luz, al estrés, a la polinización o la depredación (Rowan, 2011).

Para los microorganismos los COVs están involucrados en el antagonismo, el mutualismo, la regulación de procesos celulares y el desarrollo intra e interespecies y para la modificación del ambiente que los rodea (Vespermann et al., 2007; Bitas et al., 2013; Werner et al., 2016). Los hongos emiten COVs, el estudio de éstos surgió por la similitud en la estructura y función con el de las bacterias. Actualmente, aproximadamente 300 COVs fúngicos se conocen, que en general incluyen en orden descendente por abundancia a: alcoholes, benzenoides, aldehídos, alcanos, ácidos, ésteres terpenoides y cetonas. Sin embargo, son pocos considerando que en las flores se han identificado alrededor de 1700 compuestos (Li et al., 2016).

Hongos como *Pleurotus ostreatus*, además de su importancia alimentaria poseen actividad antimicrobiana debido a la mezcla de los COVs que emite (Beltran-Garcia et al., 1997). La actividad bactericida de los COVs se ha observado en *Muscodor* spp. y *Trichoderma* spp, además de presentar acción antifúngica y antinemátida (Mitchell et al., 2010; Singh et al., 2011; Zhang et al., 2014).

Una característica interesante de los COVs es el aroma que le confiere a las trufas (*Tuber* spp.) de las cuales los cuerpos fructíferos son comestibles, de gran valor económico, mayor que cualquier otro cultivo, como en *Tuber magnatum* y *Tuber melanosporum*. El aroma de las trufas es único y complejo en la composición de sus volátiles (Vita et al., 2015). Por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles azufrados (S-COVs) como; dimetil mono-, di- y tri-sulfuro o más complejos como el 2-metil-4,5-dihidrotiofeno (Splivallo et al., 2011). Los COVs de varias especies de *Tuber* presentan un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* y en algunos casos inducen el blanqueamiento de las semillas, lo que indica toxicidad (Splivallo et al., 2007).

La producción de biocombustibles a partir de COVs de diferentes microorganismos se ha desarrollado con el fin de reducir la emisión de contaminantes al medio. *Phomopsis* sp. es una especie que produce sabineno, 3-metil-1-butanol (Fig. 3), 2

metil-1-propanol y benzenetanol. Por lo cual este microorganismo y sus compuestos pueden tener un uso biotecnológico alternativo e.g. sabineno es saborizante, odorizante y antioxidante (Singh et al., 2011).

Uno de los compuestos volátiles comúnmente reportados en los hongos, tanto macroscópicos como microscópicos es el 1-octen-3-ol (Fig. 3), el cual le confiere el olor característico (Bennett et al., 2012). Estos COVs afectan la formación de esporas (Li et al., 2016) e inhiben patógenos como *B. cinerea* y *Fusarium oxysporum*, e incluso cuentan con actividad insecticida contra *Tribolium castaneum*, plaga en la industria alimenticia (Minerdi et al., 2009; Zhao et al., 2011) y *Sitophilus zeamais*, insecto que causa daños importantes durante el almacenaje del maíz (Herrera et al., 2015).

En estudios de proteómica y transcriptómica con *Serratia plymuthica*, respecto a la respuesta a los COVs emitidos por *Fusarium culmorum*, se observó que la bacteria responde con cambios en la expresión de genes relacionados con la motilidad, transducción de señales, metabolismo energético, la biogénesis de la envoltura celular y producción de metabolitos secundarios. Además, la bacteria en respuesta a los COVs produce un terpeno inusual llamado sudorifeno, lo que implica que dichos compuestos no son solo un desecho metabólico, sino que representan moléculas importantes en la comunicación a larga distancia entre los hongos y las bacterias y este efecto se puede extrapolar a otros organismos (Kanchiswamy et al., 2015; Schmidt et al., 2017).

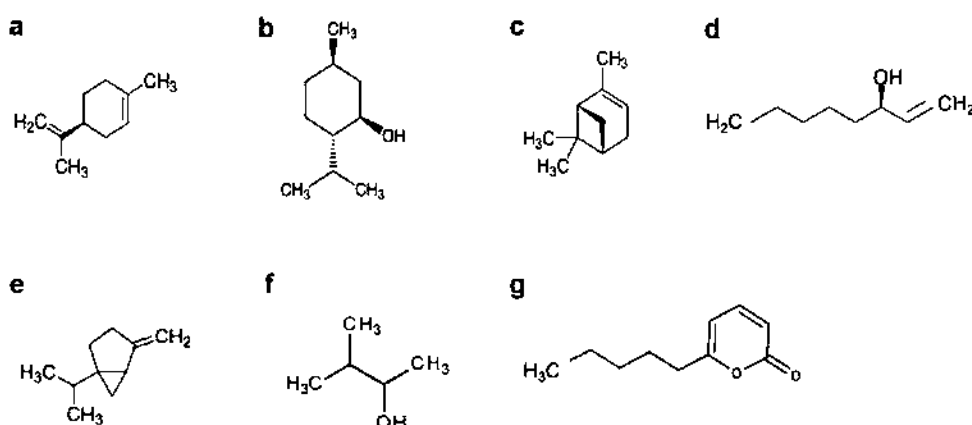
### **2.7.3. Efecto de los metabolitos secundarios fúngicos en plantas**

*Cladosporium cladosporioides*, un hongo comúnmente utilizado para biocontrol y *Phoma* sp. ambos producen una mezcla de compuestos que promueven el crecimiento del tabaco (Paul y Park, 2013). Los compuestos responsables de la promoción del crecimiento vegetal de la mezcla de compuestos de diversos hongos ya se han identificado. Por ejemplo, el  $\beta$ -cariofileno de *F. oxysporum* estimula el crecimiento de la lechuga, el (-)-thujopseno de *Laccaria bicolor* o la 6-pentil- $\alpha$ -pirona (Fig. 8) de *Trichoderma atroviride* mejoran el crecimiento de *Arabidopsis* (Minerdi et al., 2011; Ditengou et al., 2015; Garnica-Vergara et al., 2015).

Por otra parte, los hongos pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los vegetales. Las mezclas de volátiles de *Cochliobolus sativus*, *Fusarium culmorum* y *Muscodor yucatanensis* inhiben el crecimiento de amaranto y tomate. Algunas de las moléculas responsables de la inhibición del crecimiento vegetal se han identificado, e.g. el 2-etilhexanal de *T. viride*, 1-octen-3-ona de *Tuber* spp., 3-metilbutanal y 1-octen-3-ol de diversos hongos (Fig. 8) (Kishimoto et al., 2007; Brakhage y Schroeckh, 2011; Li et al., 2016).

Las plantas son capaces de influenciar la composición y activación de su microbioma rizosférico a través de la exudación de compuestos que estimulan o inhiben el crecimiento de otros organismos. Viceversa, una amplia diversidad de microorganismos son capaces de afectar a su hospedero tanto por compuestos volátiles como por exudados difusibles (Fig. 7) (Berendsen et al., 2012; Fiers et al., 2013). Los COVs fúngicos inducen la formación de raíces laterales mediante el aumento del área de absorción y anclaje.

La producción y redistribución de las fitohormonas inducidas por los COVs fúngicos potencian el crecimiento y desarrollo vegetal. La 6-pentil- $\alpha$ -pirona de *Trichoderma atroviride* modula la expresión de los transportadores de auxinas de manera dosis dependiente, lo que permite una redistribución y mayor concentración de la hormona en el meristemo radicular, lo cual explica los cambios en la raíz (Garnica-Vergara et al., 2015).



**Figura 8. Estructura química de algunos compuestos orgánicos volátiles vegetales y fúngicos representativos.** a) Limoneno, b) mentol, c) pineno, d) 1-octen-3-ol, e) sabineno, f) 3-metil-butanol y g) 6-pentil- $\alpha$ -pirona.

## 2.8. Pudrición peduncular

Las enfermedades que afectan frutos en el periodo de poscosecha causan importantes pérdidas cualitativas y cuantitativas, particularmente en regiones tropicales. Los hongos son importantes agentes de enfermedades, responsables en un 80 a 90 % aproximadamente del total de pérdidas del fruto. La colonización fúngica puede producir diversos efectos o desordenes fisiológicos que alteran la calidad, como manchas que afectan su aspecto visual y podredumbres que provocan alteraciones en la consistencia y sabor. Estos desordenes reducen la calidad, limitan su comercialización y los productos se tornan inviables para el consumo humano. Además, su pudrición favorece la producción de una gran cantidad de etileno, lo que causa una madurez prematura (Silveira et al., 2001; Sandoval-Sánchez et al., 2013).

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es nativo de México, pero es cultivado alrededor del mundo en regiones tropicales y subtropicales, como Nueva Zelanda, Chile, Perú, Israel, Australia, Italia, España y Sudáfrica (Twizeyimana et al., 2013; Guarnaccia et al., 2016) . La pudrición peduncular es una de las enfermedades más importantes que ocurren en todas las áreas de producción alrededor del mundo y que afectan el aguacate y otros frutos como el mango. Esta enfermedad comienza por una coloración de marrón a negro en el mesocarpio (Fig. 9) (Espinoza Madrigal et al., 2018) y progresa hasta un decaimiento, decoloración y ablandamiento de la pulpa (Guarnaccia et al., 2016). Los desórdenes que comprenden síntomas como el tizón, cancro, gomosis y muerte descendente de ramas comparten etiologías similares con la pudrición peduncular (Sandoval-Sánchez et al., 2013).



**Figura 9. Pudrición peduncular del aguacate.** Frutos de aguacate con síntomas de la enfermedad durante la pudrición. Notar que la pudrición comienza en la zona de unión al pedúnculo y se extiende en todo el pericarpio.

Varias especies causan dicha pudrición, en su mayoría pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, como *Botryosphaeria lutea*, *B. dothidea*, *B. parva*, *B. ribis*; varias especies de *Glomerella*, *Nectria pseudotrichia* y otras especies de *Albonectria*, *Alternaria*, *Gibberella*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Dothiorella* y *Phomopsis* (Willingham et al., 2001; Twizeyimana et al., 2013). Algunas de ellas causan también el cancro del tallo. *Colletotrichum*, *Botryosphaeria* y *Phomopsis* que provocan la pudrición poscosecha del fruto de aguacate están presentes en la leña y ramas vivas y muertas de los árboles, pedúnculos vivos, hojas y algunas veces en el suelo. Recientemente, se demostró que los patógenos que causan el cancro del tallo pueden ser la fuente del inóculo para la pudrición peduncular. Por el contrario, las especies asociadas a la pudrición peduncular pueden causar el cancro (Twizeyimana et al., 2013).

La infección de los frutos susceptibles a la pudrición peduncular puede ocurrir vía la colonización de la cicatriz que deja el pedicelo después de la cosecha o por la colonización del tejido floral remanente durante la floración (Johnson et al., 1992). El inóculo se produce en alta humedad y se disemina por la lluvia, viento o por el movimiento de las ramas cuando los frutos se cosechan. Aunque algunas infecciones se originan de la colonización endofítica que queda latente hasta después de la cosecha, la mayoría de las infecciones probablemente ocurren cuando las esporas contaminantes en la superficie del tallo se distribuyen por las herramientas de corte. Después, el fruto es colonizado gradualmente. Algunos patógenos como *Colletotrichum* y *Botryosphaeria*, causan una infección latente que se activa cuando hay cambios fisiológicos y bioquímicos que se asocian con la reducción de la concentración de inhibidores fúngicos durante la maduración del fruto (Hartill y Everett, 2002; Eskalen et al., 2013; Twizeyimana et al., 2013).

La infección y colonización por patógenos de poscosecha y la resistencia a la infección de los frutos no maduros son considerados como un proceso dinámico que es activado durante la maduración, donde el patógeno se transforma de hongo biotrófico quiescente a un organismo necrotrofico activo que manipula la respuesta del hospedero (Prusky et al., 2016).

## 2.9. Hongos de estudio

### 2.9.1. *Diaporthe phaseolorum*

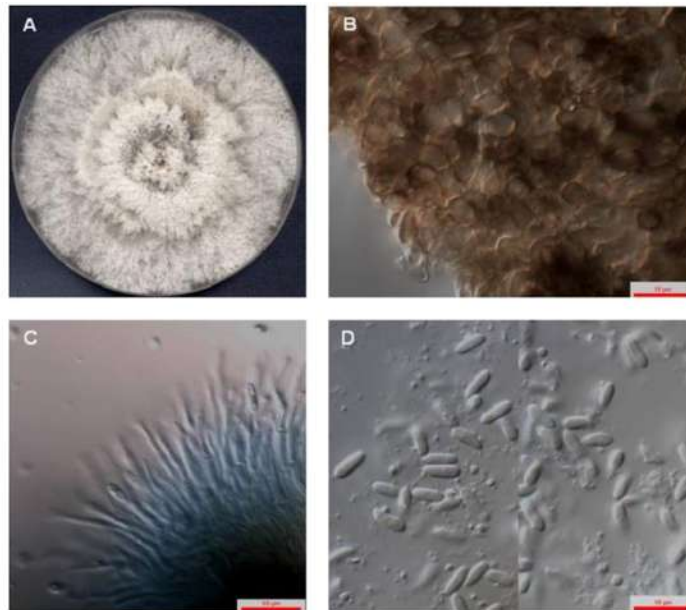
Las especies del género *Diaporthe* y su anamorfo *Phomopsis* (Diaporthaceae) (Fig. 10) comprenden las especies fúngicas fitopatógenas más comunes de esta familia, donde el género *Diaporthe* tiene más de 800 especies, mientras que su género anamórfico *Phomopsis* tiene más de 900. Sin embargo, la taxonomía de la familia Diaporthaceae y todo el orden Diaporthales está en constante revisión (Kaliterna et al., 2012).

Las especies del género *Diaporthe/Phomopsis* tienen un extenso número de hospederos y se distribuyen ampliamente, pueden ser patógenos de plantas, endófitos o saprofitos, pero también pueden aparecer como patógenos de humanos y otros mamíferos (Mattei et al., 2013). Las especies de *Diaporthe* son responsables por enfermedades en diversas especies vegetales, algunas de ellas de importancia económica alrededor del mundo, causan la pudrición de raíces y frutos, muerte descendente, cancro, manchas en las hojas, plagas, decaimiento y marchitez. El género también es reconocido por la producción de enzimas y metabolitos secundarios con actividad antibiótica o anticancerígena. Además, otras especies de *Diaporthe* ayudan a detener la herbivoría, tienen actividad lignocelulolítica y son aplicadas como herbicidas (Gomes et al., 2013).

*Diaporthe phaseolorum* se encuentra dentro de un complejo fúngico patógeno de la soya, con una amplia diversidad genética, el cual está constituido por tres variedades de *D. phaseolorum*: *D. phaseolorum* var. *meridionalis*, *D. phaseolorum* var. *caulivora*, los dos agentes causales del cancro del tallo de la soya y *D. phaseolorum* var. *sojae*, agente causal de la podredumbre de la vaina y tallo (Pioli et al., 2003).

Además de ser un patógeno común para la soya, especies de la familia Diaporthaceae se les reporta como agentes causales del cancro en tallos de varias especies vegetales. *Diaporthe* spp. provocan síntomas de cancro en troncos de plantas de uva y en los brotes, ramas y el tronco de árboles de aguacate. Además,

están asociados a la pudrición peduncular de los frutos de kiwi, pimienta y aguacate (Danggomen et al., 2013; Dissanayake et al., 2015; Guarnaccia et al., 2016). Algunas especies de *Diaporthe* pueden ser patógenas o endófitos dependiendo de del hospedero y de la salud de la planta, por ejemplo, *D. phaseolorum* es patógeno para la soya pero endófito para el mangle (*Laguncularia racemosa*) (Gomes et al., 2013).



**Figura 10. *Diaporthe phaseolorum*.** (A) Colonia en PDA después de 7 días a 25 °C. (B) Picnidios fuera de la pared de textura globosa. (C) Conidióforos y (D) conidios. Tomado de Mattei et al., 2013.

### 2.9.2. *Phomopsis viticola*

Las especies de *Phomopsis* son patógenos comunes que afectan la calidad y germinación de las semillas. El nivel de daño depende de las condiciones ambientales y comúnmente las semillas infectadas son la fuente principal de la infección primaria de esta enfermedad (Pioli et al., 2003).

*P. viticola* (Fig. 11) causa enfermedades importantes en la uva en múltiples regiones viníferas del mundo, es el agente causal de la excoriosis de la vid, cual se caracteriza por presentar manchas en las hojas y el tallo que se extienden a los frutos. Las pérdidas de los cultivos por este patógeno se estima que es del 30 % aproximadamente. *P. viticola* puede infectar el tallo, las hojas, el raquis (en la zona más cercana al tallo) y los frutos. Aunque las infecciones del tallo pueden resultar en un daño leve, éstos pueden ser la fuente de inóculo para infectar el raquis de las

hojas y los frutos, lo que resulta en una reducción del rendimiento del cultivo y produce importantes pérdidas económicas (Erincik et al., 2001).



**Figura 11. Síntomas en la uva asociados a *Phomopsis viticola* en California.** a) Inhibición del crecimiento en un espolón. b) Cancro en forma de cuña en rama. c) Picnidios negros de *P. viticola* en rama en decline. d y e) Síntomas de *Phomopsis* de la caña y manchas en las hojas. d) Flechas blancas apuntan a los puntos verdes pálidos a amarillos con un centro necrótico en las hojas. e) Flechas negras apuntan a lesiones necróticas marrón oscuro a negro de forma irregular en los brotes. f) Decoloración del tejido vascular causado por *P. viticola*. g) Lesión en forma de cuña en una sección transversal. Tomada de Úrbez-Torres et al., 2013.

### **2.9.3. *Pseudofusicoccum stromaticum***

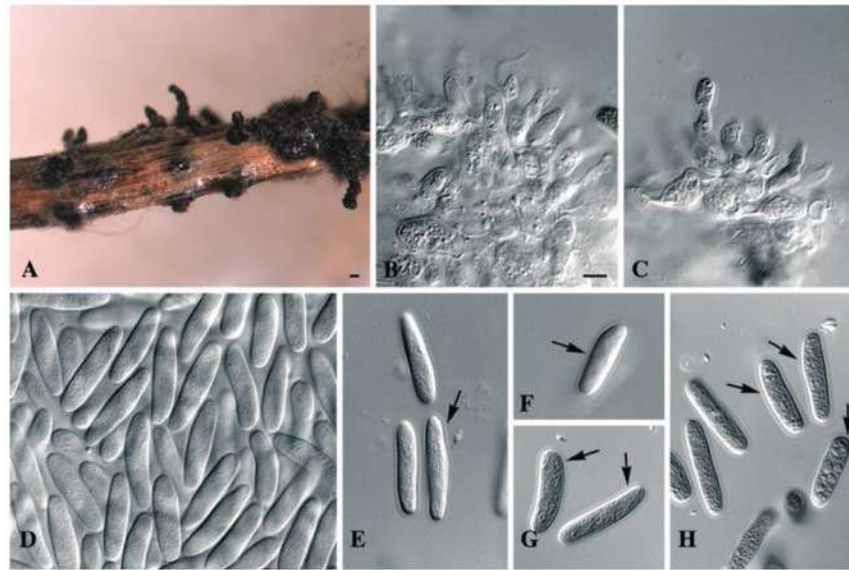
*Pseudofusicoccum stromaticum* es un hongo filamentosamente recientemente descrito, pertenece a la familia Botryosphaeriaceae, la cual presenta una distribución cosmopolita, sus especies infectan hospederos de diferentes géneros de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, y gimnospermas. Las especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae infectan principalmente a los tallos, ramas y hojas de plantas leñosas. Estos hongos incluyen patógenos oportunistas que dan lugar a

síntomas tales como necrosis de tallo y raíz. Diferentes especies de Botryosphaeriaceae han sido aisladas de tejidos vegetales sanos y con signos de enfermedad. En ambos casos y a partir de los mismos hospederos se demostró que los endófitos aislados de tejido sano también causan signos de enfermedad. Muchas de estas especies se conocen como patógenos oportunistas, los cuales presentan una etapa latente como endófitos. La actividad patogénica de las especies de Botryosphaeriaceae aumenta debido a la variación en los factores ambientales, por ejemplo cuando las condiciones climáticas son extremadamente secas (Landa-Zavaleta, 2011).

Crous et al., (2006) llevaron a cabo un estudio de clasificación taxonómica de distintas especies de la familia Botryosphaeriaceae. El objetivo principal de ese estudio fue emplear los datos obtenidos a partir de secuencias de ADN ribosomal 28S de distintas especies de la familia para resolver los problemas relacionados con los linajes filogenéticos. A partir de este análisis se generaron 12 clados y nuevas especies fueron reclasificadas. En uno de los clados analizados se encuentra presente una de las especies de estudio, *P. stromaticum* que pertenece al clado siete donde se encuentran especies de *Fusicoccum*. Los organismos que conforman este clado fueron aislados y descritos por primera vez en Venezuela, de los árboles de *Acacia* y *Eucalyptus* spp. El taxón se distingue de otras especies de *Fusicoccum* en función de la forma y los escasos conidiomas de gran tamaño que presenta y que muestran la capacidad de crecer a 35 °C, presenta pared gruesa cubierta de mucosa, ausente en otras especies de *Fusicoccum*. La morfología reportada por Crous et al., (2006) para esta especie se presenta en la Fig. 12.

Escasamente existen reportes donde describan características de este hongo y sus efectos en los hospederos. Landa-Zavaleta (2011) realizó un escrutinio para la obtención de hongos productores de celulasas aislados de cultivos de importancia comercial en el Estado de Michoacán que presentaban signos de enfermedad como el aguacate, arándano, mango, limón persa y nuez de macadamia. *P. stromaticum* se aisló de frutos de aguacate y fue el aislado con mayor producción de celulasas. Otras especies de la familia Botryosphaeriaceae se han reportado como patógenos importantes de frutos comerciales como *Neofusicoccum parvum* y *Neofusicoccum*

*magiferae* aisladas de frutos de mango con síntomas de pudrición peduncular en los estados de Michoacán, Nayarit y Jalisco en México. En mangos de los cultivares Kent y Tommy Atkins infectados con *Neofusicoccum* spp. se apreciaron manchas radiales, alargadas, delgadas y oscuras originadas en el pedúnculo que se tornaron oscuras, hundidas y húmedas con el paso del tiempo. *N. parvum* además provoca la muerte descendente de ramas (Sandoval-Sánchez et al., 2013).



**Figura 12.** *Pseudofusicoccum stromaticum* (CBS 117448). A) Picnidios en rama. B-C) Células conidiógenas. D-H) Conidios (las flechas indican las cubiertas mucosas). Barras de escala = A=90 $\mu$ m, B=6 $\mu$ m. Tomada de Crous et al., 2006.

### **3. Justificación**

El entendimiento de los mecanismos hormonales por los cuales los compuestos extracelulares fúngicos modifican el crecimiento vegetal nos permitirá diseñar estrategias para el manejo de cultivos de interés comercial y de sus patógenos fúngicos.

### **4. Hipótesis**

Los compuestos extracelulares de hongos aislados de frutos de aguacate con pudrición peduncular modifican el crecimiento vegetal de *Arabidopsis thaliana* al activar rutas de señalización hormonal implicadas en crecimiento y defensa.

### **5. Objetivo general**

Determinar el efecto de los compuestos extracelulares de hongos aislados de frutos de aguacate en la morfogénesis de *Arabidopsis thaliana*.

### **6. Objetivos específicos**

- 6.1. Evaluar el efecto de los compuestos extracelulares de aislados fúngicos sobre el crecimiento de la raíz y el follaje de *A. thaliana*
- 6.2. Identificar las rutas de señalización hormonal implicadas en la respuesta de *A. thaliana* a compuestos extracelulares fúngicos
- 6.3. Determinar el perfil de los compuestos extracelulares de aislados fúngicos promotores del crecimiento de *A. thaliana*.

### **7. Materiales y métodos**

#### **7.1. Material vegetal**

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Col-0) y las líneas transgénicas inducibles por auxinas *DR5:GUS* (Jefferson et al., 1987) y *DR5:GFP* (Ottenschlager et al., 2003), el marcador de actividad mitótica que se expresa en la fase G2/M del ciclo celular *CYCB1:GFP* (Weimer et al., 2016), las líneas inducibles por citocininas *ARR5:GUS* (D'Agostino et al., 2000) y *TCS:GFP* (Müller y Sheen,

2008), la línea marcadora de elongación y diferenciación *EXP7:GUS* (Cho y Cosgrove, 2002) y la línea inducible por ácido jasmónico *LOX2:GUS* (Jensen et al., 2002). Las semillas se desinfectaron con etanol al 95% (v/v) durante 5 min, después hipoclorito de sodio al 20% (v/v) por 7 min, 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 Sigma (4.3 g/L se usan para obtener una concentración 1X de medio) y 6 g/L de sacarosa, pH 7 y fitogar 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.

## **7.2. Material fúngico**

Los hongos fitopatógenos *Phomopsis viticola* 5480, *Diaporthe phaseolorum* 5185 y *Pseudofusicoccum stromaticum* se aislaron y caracterizaron del pericarpio de frutos de aguacate cv. "Hass" con síntomas de pudrición peduncular, los cuales se colectaron de las regiones productoras de aguacate en el estado de Michoacán, México. Los aislados se crecieron y propagaron en el mismo medio que las plantas, medio MS 0.2X, pH 7. Un inóculo de 5 mm de diámetro se colocó en el centro de cajas Petri y colonias de 6 días de crecimiento se utilizaron para los ensayos de co-cultivo.

## **7.3. Ensayo de co-inoculación planta-hongo**

Dos sistemas de interacción planta-hongo se establecieron. El primer sistema consistió en un co-cultivo, el cual se efectuó en cajas Petri completas, donde se crecieron 5 plantas de *Arabidopsis* en un extremo de la caja y 4 días después de la germinación se colocó un inóculo de micelio de 5 mm de diámetro de cada uno de los hongos en el otro extremo de la caja a 5 cm de la raíz, de esta manera, se permitió la interacción de los metabolitos difusibles con la planta, los cuales se analizaron antes del contacto físico entre las hifas con las raíces. El segundo sistema consistió en la interacción por volátiles, para esto se utilizó medio MS en

cajas Petri bipartitas, de un lado de la caja se sembraron las semillas de *A. thaliana* y 4 días después de la germinación, se colocó un inóculo de micelio de 5 mm de diámetro de los tres hongos del otro lado de la caja, en este experimento se permitió únicamente la interacción a través de compuestos orgánicos volátiles. Después de 6 días de interacción el peso fresco del follaje se determinó en una balanza analítica, la longitud de la raíz primaria se midió con una regla, el número de raíces laterales se cuantificaron y se tomaron fotos de las puntas de la raíz primaria para medir la longitud de los pelos radiculares con el programa ImageJ. Para las líneas reporteras *GFP* y *GUS* la interacción en los dos sistemas se permitió por 4 días.

#### **7.4. Ensayos de acidificación del medio**

Un inóculo de 5 mm de diámetro de micelio de cada uno de los hongos fitopatógenos se colocó en el centro de cajas Petri con medio MS suplementado con azul de bromofenol (0.006%, p/v), un indicador de pH, el cual se analizó cada 24 horas durante 4 días.  $1 \times 10^6$  esporas de *Trichoderma atroviride* se usaron como control. La acidificación del medio por parte de los hongos en interacción directa con las plantas se evitó al agregar ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) (0.012%, p/v) al medio de crecimiento MS y el pH se ajustó a 7, se crecieron y analizaron bajo las condiciones ya mencionadas.

#### **7.5. Análisis de la actividad de GUS y GFP**

Las plantas transgénicas *ARR5:GUS*, *EXP7:GUS* y *LOX2:GUS* se incubaron en cajas de micro-título con una solución de X-Gluc al 0.1% [(5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 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 50 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 *DR5:GFP*, *CYCB1:GFP* y *TCS:GFP* se transfirieron desde el medio de crecimiento a una solución de yoduro de propidio al 0.1% (10 mg mL<sup>-1</sup>) posteriormente se montaron en un portaobjetos y se analizaron con un microscopio confocal (Olympus FV1000). Las imágenes representativas de cada tratamiento se seleccionaron para la construcción de figuras.

### **7.6. Análisis de crecimiento en suelo post contacto con los hongos**

El sustrato utilizado para los análisis del crecimiento durante el ciclo de vida de la planta, consistió en una mezcla de suelo orgánico (Sunshine), vermiculita y perlita en proporción 3:1:1 (p/p/p). Previamente a su uso la mezcla se esterilizó en autoclave por 40 min. Plantas de 4 días de interacción con los compuestos difusibles o los compuestos orgánicos volátiles de los hongos pero sin haber tenido contacto físico se trasplantaron en el suelo. Las macetas se cubrieron con tapa plástica para mantener la humedad adecuada y se transfirieron a la cámara de crecimiento. Las plantas se regaron con agua destilada. A partir del tercer día en suelo se realizaron las mediciones de las siguientes variables: diámetro de roseta, número hojas, altura del tallo principal y número de silicuas.

### **7.7. Identificación de compuestos orgánicos volátiles**

Los compuestos orgánicos volátiles de las plantas, los hongos y los co-cultivos en cajas Petri perforadas se analizaron después de 6 días de crecimiento e interacción. Los volátiles se colectaron con una fibra de SPME azul (PDMS/DVB) (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, EUA) y se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973). El cromatógrafo se operó con helio como gas acarreador con un flujo sin división (splitless) de 1 ml/min a una temperatura de 180 °C , en una columna capilar HP-FFAP (30 m x 0.25 mm x 25 µm). Este equipo se usó con el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 40 °C por 3 min , seguida de una rampa de 5 °C/min para

llegar a una temperatura final de 180 °C durante 14 min, una poscorrida de 200 °C durante 3 min y una temperatura del detector de 250 °C. El espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1 ml/min, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interface de 280 °C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 40-750 *m/z*. Los datos se compararon con la base de datos NIST 11.

### **7.8. Análisis de datos**

Los resultados de los experimentos de diferentes bioensayos se analizaron estadísticamente con el programa STATISTICA 7. 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 ( $p < 0.05$ ).

## **8. Resultados**

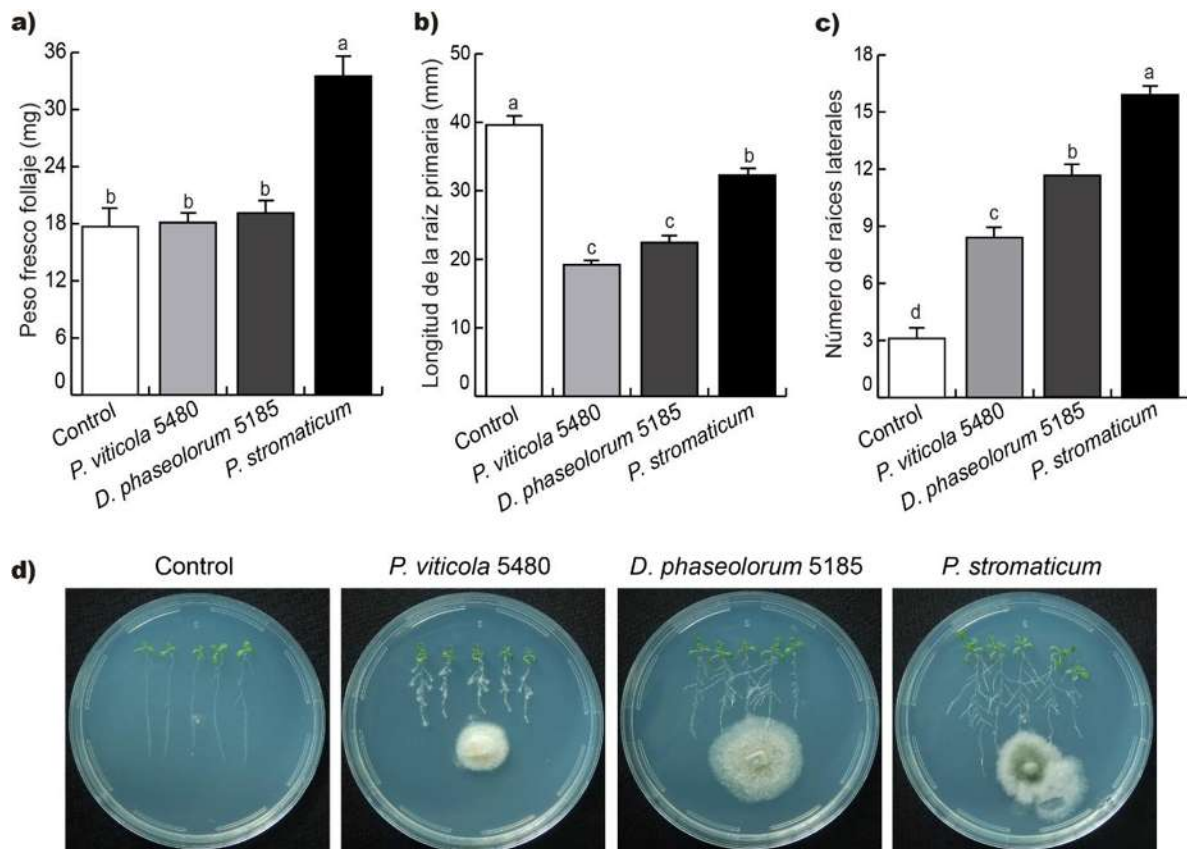
### **8.1. Los hongos aislados de frutos de aguacate producen pudrición peduncular**

En nuestro grupo de trabajo se aislaron hongos de frutos de aguacate de la variedad Hass de diferentes regiones del estado de Michoacán con síntomas de pudrición peduncular. Se encontraron formando consorcios de diversas especies fúngicas en frutos dañados y se evaluó el efecto de cada uno de los aislados en la maduración de frutos aguacate. Para lo cual, los frutos inmaduros se lavaron y secaron, se retiró el pedúnculo y en la zona de la cicatriz se colocó un propágulo de micelio de cada uno de los hongos y se selló con cinta micropore. Los frutos se colocaron en recipientes con agua caliente para permitir una humedad relativa de 100 % y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 22 °C en oscuridad. Siete días después se evaluó la incidencia de la enfermedad, donde los diferentes hongos mostraron pudrición peduncular en frutos.

## 8.2. Los hongos que causan pudrición peduncular modifican el crecimiento foliar y la morfología radicular

El crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado por la interacción con otros organismos, benéficos y patógenos. Los compuestos emitidos por bacterias y hongos con estrategias ecológicas diferentes modifican la estructura radicular vegetal: como se indicó en la introducción. Para evaluar el efecto de los compuestos difusibles de los hongos fitopatógenos sobre el crecimiento, plántulas de 4 días después de la germinación se colocaron en interacción con los metabolitos secundarios de los tres hongos fitopatógenos. El ensayo consistió en crecer plantas de *Arabidopsis* en cajas Petri completas por 4 días e inocular el hongo a 5 cm de la punta de la raíz, de esta manera los compuestos difusibles de los hongos se propagan en el medio e interactúan con la planta, sin contacto físico entre hongo y raíz. La morfología de la planta se analizó después de 6 días de interacción.

Las plantas en co-cultivo en cajas completas con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 no mostraron cambios significativos en el peso fresco del follaje, mientras que *P. stromaticum* promovió el aumento de éste en un 40% (Fig. 13a, c). En contraste, *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 inhibieron el crecimiento de la raíz primaria respecto a las plantas control (Fig. 13b). Los tres hongos estimularon la formación de raíces laterales, especialmente *P. stromaticum* (Fig. 13c). La elongación de las raíces laterales se inhibió en presencia de *P. viticola* 5480 y se estimuló con *D. phaseolorum* 5185 (Fig. 13d). Estos datos muestran la respuesta dinámica de *Arabidopsis* a los hongos causantes de pudrición peduncular y el efecto opuesto de *P. viticola* y *P. stromaticum* en el crecimiento y desarrollo de la planta.



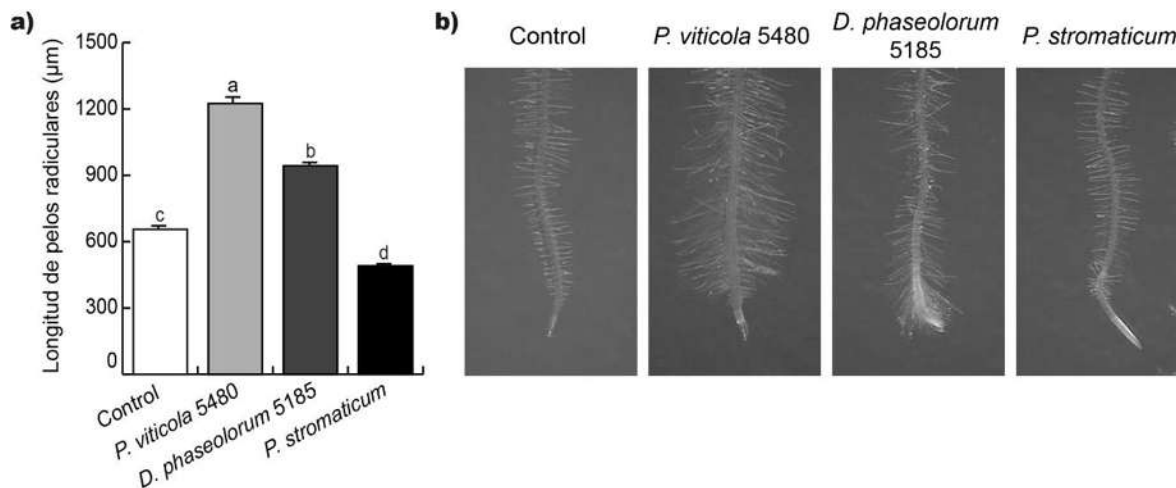
**Figura 13. Efecto del co-cultivo de hongos de la pudrición peduncular sobre el crecimiento foliar y la morfología radicular.** a) Peso fresco del follaje; b) Longitud de la raíz principal; c) Número de raíces laterales; d) Fotos representativas de plantas de *Arabidopsis* en co-cultivo con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en cajas Petri con medio MS 0.2X por 4 días, después se inocularon con micelio de cada uno de los hongos a 3 cm de la punta de la raíz y crecieron por 6 días. Las diferentes letras indican diferencias significativas de las medias ( $p < 0.05$ ),  $n = 5$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

### 8.3. Los hongos que causan la pudrición peduncular en aguacate promueven la elongación de pelos radiculares

Los pelos radiculares son células epidérmicas de la raíz que son importantes para la obtención de agua y nutrientes. Al respecto, el conocimiento actual es que los compuestos difusibles, como los factores de virulencia de cepas patógenas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas syringae*, promueven la formación y elongación de pelos radiculares de *Arabidopsis*. Debido a que *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 reprimieron el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 13b), se

evaluó si estos hongos pueden alterar la diferenciación de las células de la epidermis. La longitud de 100 pelos radiculares de 15 plantas de *Arabidopsis* en co-cultivo durante 6 días con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* se midieron.

La longitud de los pelos radiculares aumentó en las plantas en interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185, mientras que en *P. stromaticum* disminuyó ligeramente el crecimiento de los pelos radiculares (Fig. 14a, b). Además, se observó que los pelos que emergen en interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 se desarrollaron más cerca del meristemo, mientras que en interacción con *P. stromaticum* aparecieron más lejos del meristemo, incluso más lejanos respecto al control (Fig. 14b). Estos datos sugieren que en presencia de los hongos fitopatógenos se activan mecanismos de crecimiento compensatorios en la planta, en los que los pelos radiculares y las raíces laterales se desarrollan al tiempo que el crecimiento de la raíz primaria disminuye y esto ocurre como una respuesta específica para cada uno de los hongos de pudrición peduncular.



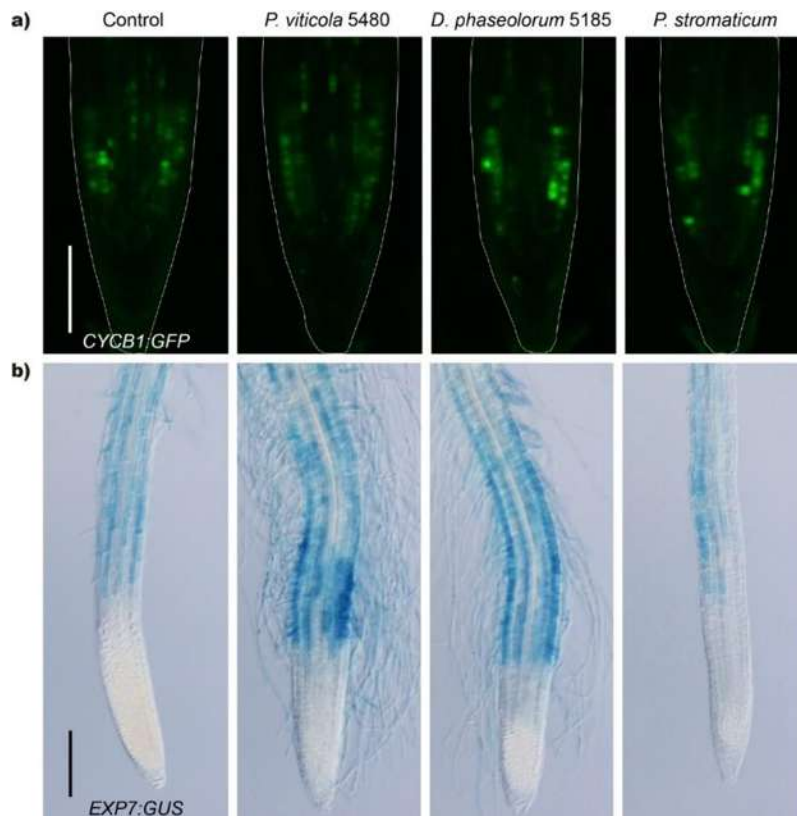
**Figura 14. Efecto de la diferenciación de pelos radiculares en co-cultivo con los hongos de la pudrición peduncular.** a) Longitud de los pelos radiculares; b) Fotos representativas del desarrollo de pelos radiculares en la punta de la raíz primaria de *Arabidopsis* en co-cultivo con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en cajas Petri con medio MS 0.2X por 4 días, después se inocularon con micelio de cada uno de los hongos a 3 cm de la punta de la raíz y se crecieron por 6 días adicionales. Las diferentes letras indican diferencias significativas de las medias ( $p < 0.05$ ),  $n = 5$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

#### 8.4. *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 inducen la expresión del gen *EXP7:GUS*

Para correlacionar el crecimiento de la raíz primaria y el fenotipo de pelos radiculares de las plantas de *Arabidopsis* en respuesta al co-cultivo con los hongos de la pudrición peduncular, las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la construcción génica *CYCB1:GFP* y *EXP7:GUS* se evaluaron en interacción con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. La expresión de los genes se analizó 4 días después.

No se observaron cambios en la expresión de *CYCB1:GFP* en el meristemo de la raíz primaria de las plantas que interactuaron con cada uno de los tres hongos, respecto al control (Fig. 15a). En las plantas control el marcador de *EXP7:GUS* se expresa en la zona de diferenciación de los pelos radiculares de la raíz primaria, específicamente en las células de los tricoblastos. Cuando las plantas estuvieron en interacción con los compuestos difusibles de *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185

se observó una mayor expresión del marcador en la zona de formación de pelos y dicha expresión se observa más cerca del meristemo, lo cual se correlaciona con el mayor crecimiento de estas células epidérmicas, mientras que en las plantas expuestas a los compuestos de *P. stromaticum* se observa menor expresión que el control. Lo que sugiere un programa acelerado en la diferenciación celular, que no interfiere con la actividad mitótica ni daña al meristemo (Fig. 15b).

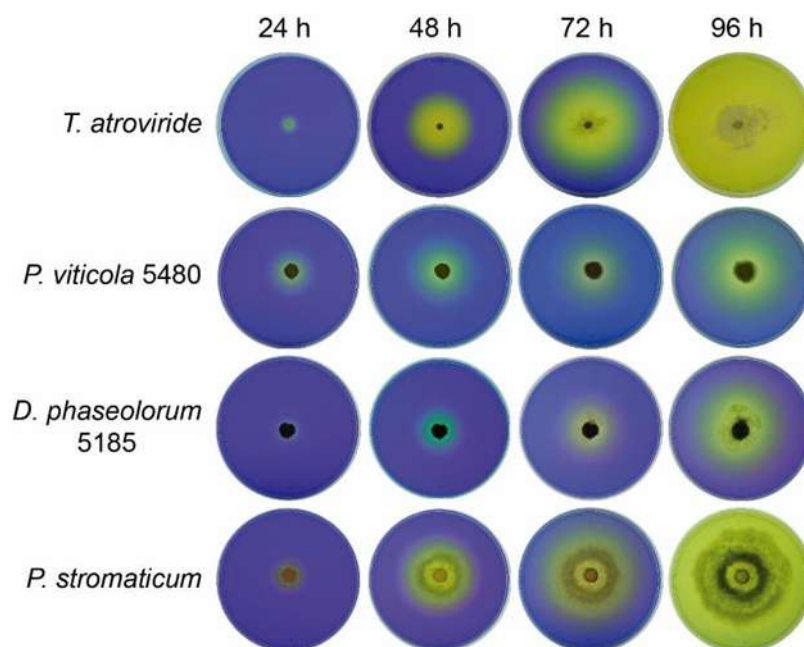


**Figura 15. Efectos en la división y diferenciación celular del meristemo de la raíz primaria en co-cultivo con hongos de la pudrición peduncular.** a) Imágenes de microscopía confocal de la expresión del marcador de división celular *CYCB1:GFP*; b) Expresión del marcador de diferenciación celular *EXP7:GUS*. Plántulas de *Arabidopsis* de 4 días de crecimiento que expresan las diferentes construcciones génicas se co-cultivaron con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos muestran imágenes representativas de al menos 10 plántulas. Barras de escalas para *CYCB1:GUS*=100  $\mu$ m y *EXP7:GUS*=200  $\mu$ m. El experimento se realizó dos veces con resultados similares.

### **8.5. Los hongos de la pudrición peduncular acidifican diferencialmente el medio de crecimiento**

En los hongos el pH es un factor crítico para sus estrategias de ataque, los patógenos no pueden simplemente adaptarse al pH que determina el hospedero, por lo tanto, el patógeno ha desarrollado mecanismos de percepción ambiental que le permiten modificar las condiciones ambientales para mejorar su ataque y al mismo tiempo comprometer la defensa del hospedero. Los hongos fitopatógenos inician su desarrollo al secretar ácidos orgánicos o amoníaco, para acidificar o alcalinizar, respectivamente, el ambiente del hospedero. Además, recientemente se demostró que el hongo benéfico *T. atroviride* induce la acidificación, lo que reconfigura la morfología radicular de *Arabidopsis* y determina la fitoestimulación fúngica. Para evaluar la capacidad de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* para modificar el pH del medio de cultivo, propágulos de 5 mm de diámetro se inocularon en medio MS 0.2X que se suplementó con azul de bromofenol (0.006 %, p/v), el cual funciona como un indicador de pH y se analizó cada 24 horas por 4 días.

Recientemente, en el grupo de investigación se reportó que *T. atroviride* acidifica fuertemente el medio, una propiedad que comparte *P. stromaticum* (Fig. 16), el cual se comporta como un hongo promotor del crecimiento vegetal (Fig. 13). *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185, los cuales reprimen el crecimiento vegetal, mostraron una capacidad de acidificación mucho más reducida (Fig. 16). Así, la capacidad de acidificación de los hongos que causan pudrición peduncular es específica para cada especie, la cual también depende de su tasa de crecimiento.



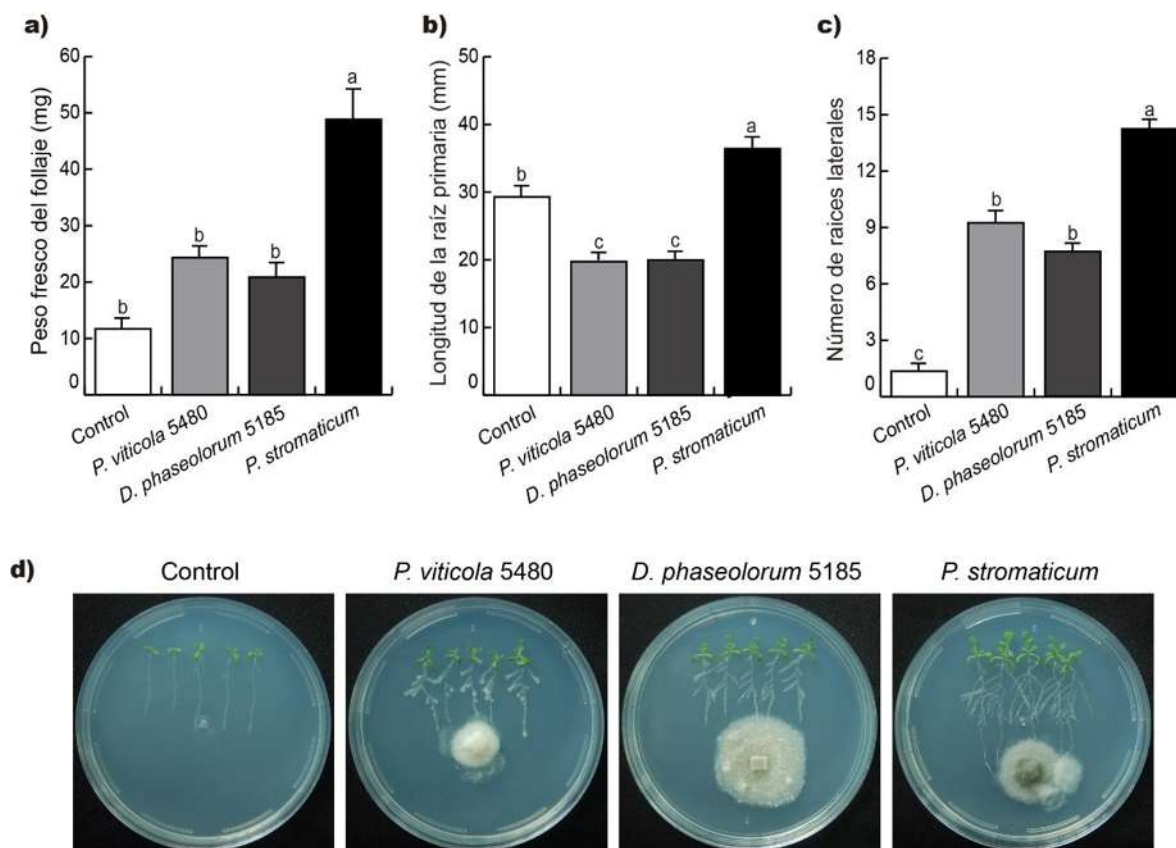
**Figura 16. Capacidad de acidificación del medio de cultivo por hongos fitopatógenos y *T. atroviride*.** *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185, *P. stromaticum* y el hongo simbionte de plantas *T. atroviride* se crecieron en medio MS 0.2X suplementado con el indicador de pH azul de bromofenol. Las fotografías muestran imágenes representativas del medio de cultivo cada 24 h, en las que el color amarillo indica el grado de acidificación del sustrato. *T. atroviride* y *P. stromaticum* presentan efectos de acidificación similar.

### 8.6. La inhibición del crecimiento de *Arabidopsis* en interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 no está asociada a la acidificación

Para determinar si los efectos negativos de *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 en el crecimiento de *Arabidopsis* están relacionados con la acidificación, se evaluó el crecimiento de la planta después de 6 días en co-cultivo con el hongo en medio MS 0.2X suplementado con el amortiguador ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico (MES) (0.012%, p/v).

Bajo estas condiciones, *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5180 incrementaron ligeramente la producción de la biomasa foliar, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 17a). La represión en el crecimiento de la raíz primaria en interacción con estos dos hongos se mantiene, por lo que el efecto no puede ser atribuido a la acidificación, ya que los dos hongos reprimen el crecimiento aún en medio amortiguado. *P. stromaticum* promueve la elongación de la raíz

primaria y el crecimiento foliar en el medio amortiguado, un efecto parecido al que se observa con *T. atroviride*, sin embargo, los efectos no pueden ser atribuidos completamente a la acidificación (Fig. 17a, b).

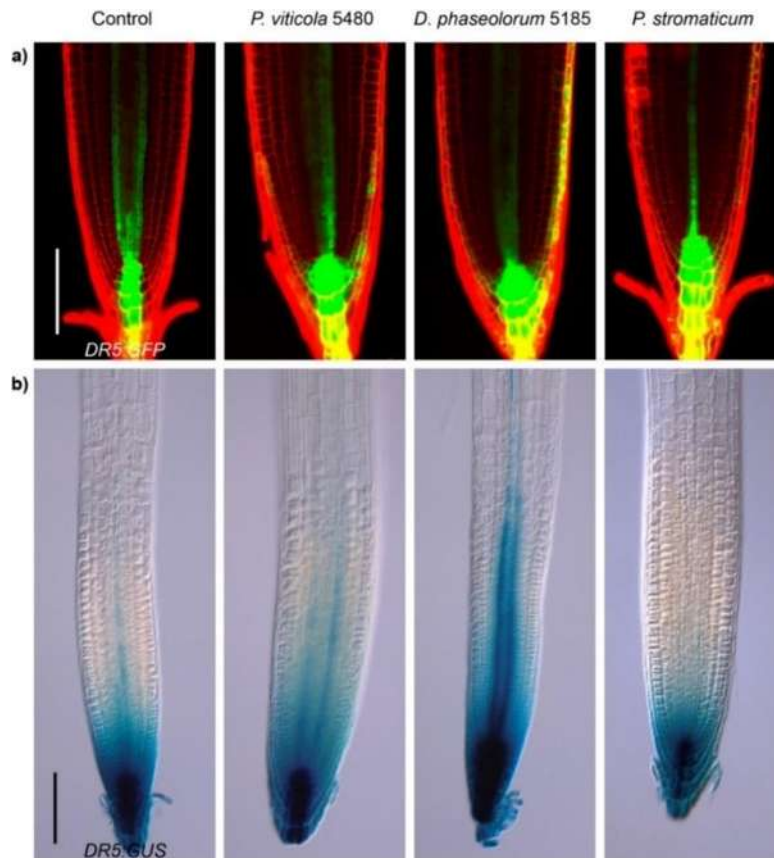


**Figura 17. Efecto del crecimiento foliar y el desarrollo radicular de *Arabidopsis* en co-cultivo con hongos de la pudrición peduncular en medio de cultivo amortiguado.** a) Peso fresco del follaje. b) Longitud de la raíz principal. c) Número de raíces laterales. d) Fotos representativas del crecimiento de *Arabidopsis* con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Las semillas se germinaron y crecieron en medio MS 0.2X amortiguado con MES 0.012%, 4 días después un propágulo de micelio de cada uno de los hongos se colocó a 3 cm de distancia de la punta de la raíz y se crecieron por 6 días adicionales. Las diferentes letras indican diferencias significativas de las medias ( $p < 0.05$ ),  $n = 5$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

### **8.7. *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 inducen una respuesta auxínica local en las raíz primaria**

*P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 reprimen el crecimiento de la raíz primaria mientras promueven la formación de pelos radiculares y de raíces laterales, lo cual sugiere que un metabolito en común se libera en el medio y desencadena la respuesta observada. La señalización de las auxinas tiene una función en casi todos los aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas, desde la embriogénesis hasta la reproducción. Evidencias recientes de que los compuestos fúngicos extracelulares, entre ellos compuestos auxínicos, modifican la estructura radicular de diferentes especies vegetales al activar la ruta de señalización de las auxinas, sin embargo, el rol de los patógenos de la pudrición aun no es clara la función del metaboloma extracelular en la raíz. Por lo cual, se analizó la expresión de los marcadores inducibles por auxinas *DR5:GFP* y *DR5:GUS* en la punta de la raíz primaria en co-cultivo en cajas completas con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*.

En condiciones control, la expresión de *DR5:GFP* se localiza en el nicho de células iniciales, la columela y el tejido vascular de la raíz, formando un estrecho dominio. La expresión en la punta de las plantas que estuvieron en interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 aumentó (Fig. 18a, b). El incremento de la respuesta auxínica puede explicar, al menos en parte, la reducción del crecimiento de la raíz primaria y la inducción de pelos radiculares que causan los hongos de pudrición peduncular.



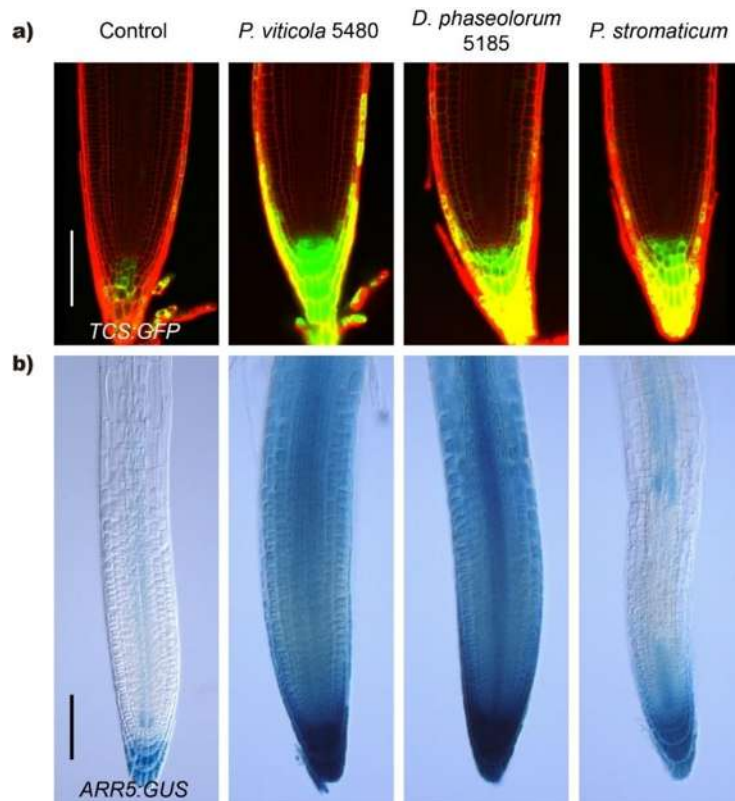
**Figura 18. Efecto en la expresión de *DR5:GUS* y *DR5:GFP* en la punta de la raíz por los hongos de la pudrición peduncular.** a) Imágenes de microscopía confocal de la expresión de la construcción con el gen inducible por auxinas *DR5:GFP*; b) expresión de *DR5:GUS*. Plantas de 4 días de crecimiento se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos son imágenes representativas de al menos 10 plantas. Barra de escala para *DR5:GFP*=100  $\mu\text{m}$  y para *DR5:GUS*=200  $\mu\text{m}$ . El experimento se realizó dos veces con resultados similares. Note el incremento en la expresión de las dos construcciones genéticas en la región del meristemo de la raíz primaria de plantas en cultivo con los tres hongos, especialmente con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185.

### 8.8. Los hongos de la pudrición peduncular modifican las concentraciones de citocininas en la raíz

Los patógenos pueden secretar diversos factores de virulencia que comprenden pequeñas proteínas efectoras, ARNs y toxinas. Diversos fitopatógenos pueden producir además, hormonas vegetales, como las citocininas, las cuales pueden contribuir a su virulencia y por lo tanto ser clasificados como factores de virulencia. La observación es que la aplicación exógena de citocininas inhibe la elongación de

la raíz principal. Por lo cual se investigó si la acumulación de citocininas se ve afectada por la presencia de los compuestos difusibles fúngicos. Para lo cual, las líneas marcadoras inducibles por citocininas *Arabidopsis* *ARR5:GUS* y *TCS:GFP* se crecieron en co-cultivo en caja completa con los hongos fitopatógenos y se analizaron después de 4 días de interacción.

En condiciones control, las citocininas se acumulan en las áreas mitóticamente activas, como los meristemas del brote y la raíz. La expresión de los dos marcadores en las plantas que estuvieron en interacción con los tres hongos se incrementó, lo que sugiere una acumulación de estas hormonas, especialmente en aquellas que estuvieron en interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 (Fig. 19a, b), lo cual explica en parte porque las plantas en interacción con *P. viticola* 5480 tienen una fuerte represión en la elongación de la raíz principal (Fig. 1).

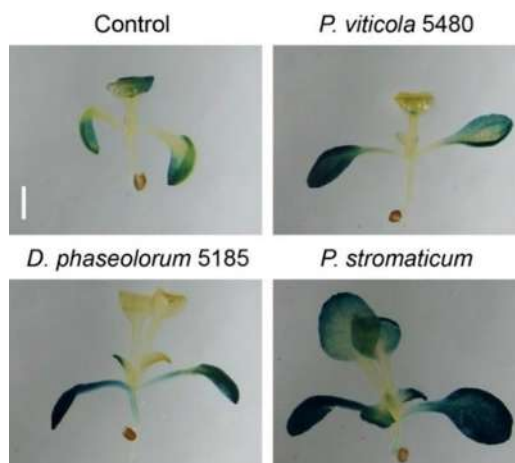


**Figura 19. Efecto en la expresión de *TCS:GFP* y *ARR5:GUS* en la punta de la raíz en *Arabidopsis* por los hongos de la pudrición peduncular.** a) Imágenes de microscopía confocal de la expresión de la construcción con el gen inducible por citocininas *TCS:GFP*; b) Expresión de *ARR5:GUS*. Plantas de 4 días de crecimiento se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos son imágenes representativas de al menos 10 plantas. Barra de escala para *TCS:GFP*=100  $\mu\text{m}$  y para *ARR5:GUS*=200  $\mu\text{m}$ . El experimento se realizó dos veces con resultados similares. Note el incremento en la expresión de las dos construcciones genéticas en la región de la epidermis y la cofia en la punta de la raíz de plantas en co-cultivo con los tres hongos, especialmente con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185.

### 8.9. Los hongos de la pudrición peduncular activan rutas de defensa

El AJ es una fitohormona natural que induce proteínas inhibidoras de proteasas en respuesta a heridas, ataque y desarrollo de patógenos. La ruta de señalización dependiente de AJ causa un incremento en la síntesis de ácido jasmónico e inicia la expresión de genes de defensa. Por lo cual, se evaluó si los hongos que causan pudrición peduncular modulan la expresión del gen marcador *LOX2:GUS* inducible por ácido jasmónico con la línea marcadora de respuesta a ácido jasmónico

*Arabidopsis LOX2:GUS* en interacción con los hongos. Plantas de *Arabidopsis* se crecieron en co-cultivo en caja completa con los hongos fitopatógenos, después 4 días y se analizó la actividad de GUS en el follaje de las plantas. Los tres hongos indujeron la expresión del gen *LOX2*, lo cual indica que los hongos fitopatógenos activan las rutas de defensa a través de la señalización del ácido jasmónico (Fig. 20).



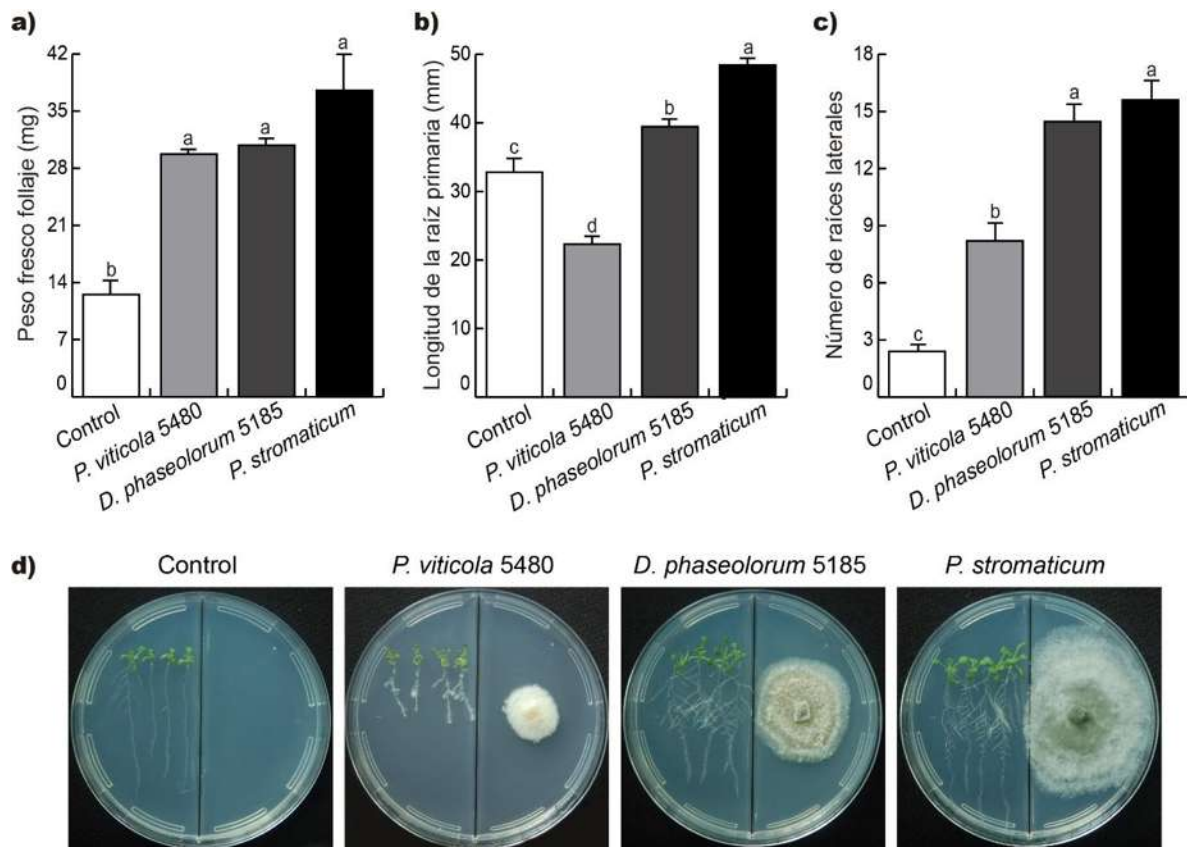
**Figura 20. Efecto en la expresión de *LOX2:GUS* inducible por el ácido jasmónico en el follaje durante la interacción con hongos de la pudrición peduncular.** Fotos representativas de la expresión del gen marcador inducible por ácido jasmónico *LOX2:GUS* en el follaje de *Arabidopsis*. Las plantas de 4 días de crecimiento se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos son imágenes representativas de al menos 10 plantas. El ensayo se realizó dos veces con resultados similares. Barra de escala=1 mm. Note en crecimiento diferencial de las hojas y el incremento de la expresión en el follaje de plantas que interactuaron con los tres hongos, especialmente con *P. stromaticum*.

#### **8.10. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular inducen el crecimiento foliar y modifican diferencialmente la estructura radicular**

Las bacterias y hongos benéficos del suelo producen COVs que promueven el crecimiento vegetal, se ha reportado que la mezcla de compuestos volátiles de *T. viride* y *T. atroviride* promueve el crecimiento de *Arabidopsis*, los de *Cladosporium cladosporioides* promueven el crecimiento de plantas de tabaco y los de *Fusarium oxysporum* promueven el crecimiento de lechuga.

Hasta la fecha la mayoría de los estudios de los efectos estimulatorios de los COVs microbianos en el crecimiento vegetal se han centrado en bacterias y hongos benéficos de la rizosfera y pocos en el efecto de hongos fitopatógenos. Los COVs del hongo patógeno oportunista *A. alternata*, promueven el crecimiento y floración de *Arabidopsis*. Debido a esto y a las observaciones de la modificación en la morfología de las plantas en co-cultivo en cajas completas con los hongos que causan pudrición peduncular. Por ello, el efecto de los compuestos orgánicos volátiles de dichos hongos se evaluó en el crecimiento de *Arabidopsis*. Semillas de *Arabidopsis* se sembraron en medio MS 0.2X en un lado de cajas Petri divididas y cuatro días después de la germinación se inoculó un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* del otro lado de la caja, de manera que existiera una barrera física entre la planta y el hongo y permitiera la comunicación por compuestos volátiles únicamente durante 6 días.

Los compuestos orgánicos volátiles de los tres hongos indujeron el crecimiento de la biomasa foliar y el número de raíces laterales de *Arabidopsis*, especialmente *P. stromaticum* (Fig. 21a). Los compuestos volátiles de *P. viticola* 5480 inhibieron el crecimiento de la raíz principal, un efecto como el observado en co-cultivo en cajas Petri completas, mientras que los compuestos volátiles de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* promovieron la elongación de la raíz principal más de un 30 % (Fig. 21b). Estos datos sugieren que la mezcla de los COVs es específica para cada especie fúngica y que además, induce fenotipos diferenciales en *Arabidopsis*.



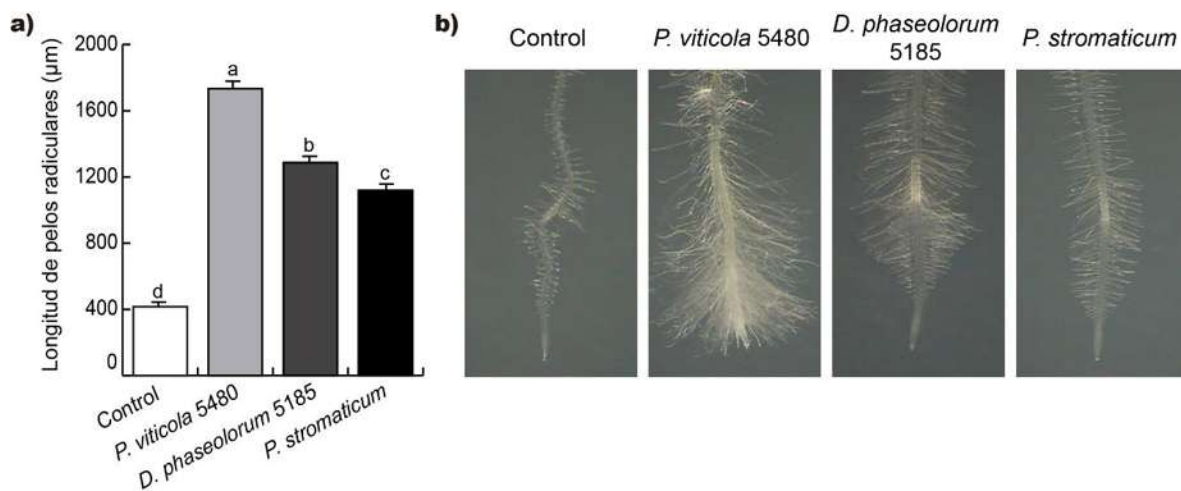
**Figura 21. Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular en el crecimiento foliar y la morfología radicular.** a) Peso fresco del follaje; b) Longitud de la raíz principal; c) Número de raíces laterales; d) Fotos representativas de plantas de *Arabidopsis* en interacción con los COVs de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Las plántulas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en un lado de cajas Petri divididas con medio MS 0.2X por 4 días, después se inocularon con micelio de cada uno de los hongos del otro lado de la caja y se crecieron por 6 días adicionales. Las diferentes letras indican diferencias significativas de las medias ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

### 8.11. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular promueven la formación y elongación de pelos radiculares en *Arabidopsis*

Los COVs de diversos microorganismos se han reportado que promueven la formación de pelos radiculares, entre ellos hongos y bacterias del suelo. *L. bicolor* promueve la formación y elongación de pelos radiculares a través de un mecanismo dependiente de la formación de especies reactivas de oxígeno. El compuesto volátil 6-PP de *T. atroviride* a bajas concentraciones promueve el crecimiento del follaje y de las raíces, pero se reportó que a concentraciones altas inhibe la elongación de

la raíz, promueve la formación de raíces laterales y se acompaña de la formación y elongación de pelos radiculares. Ya que los COVs de hongos que producen pudrición peduncular modifican la morfología radicular y la biomasa foliar, se evaluó si también tienen efecto en la formación y elongación de pelos radiculares en *Arabidopsis* como en el ensayo de co-cultivo en caja completa. La formación de pelos en las plantas que interactuaron por 6 días con los COVs de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* se evaluó.

Los COVs de los tres hongos promueven la formación y elongación de pelos radiculares en *Arabidopsis*, especialmente *P. viticola* 5480, el cual aumenta la longitud de los pelos más de cuatro veces comparado con el control, un efecto parecido al observado en co-cultivo en caja completa y se comprueba que los COVs de este hongo son los responsables de la inhibición del crecimiento vegetal (Fig. 22a).

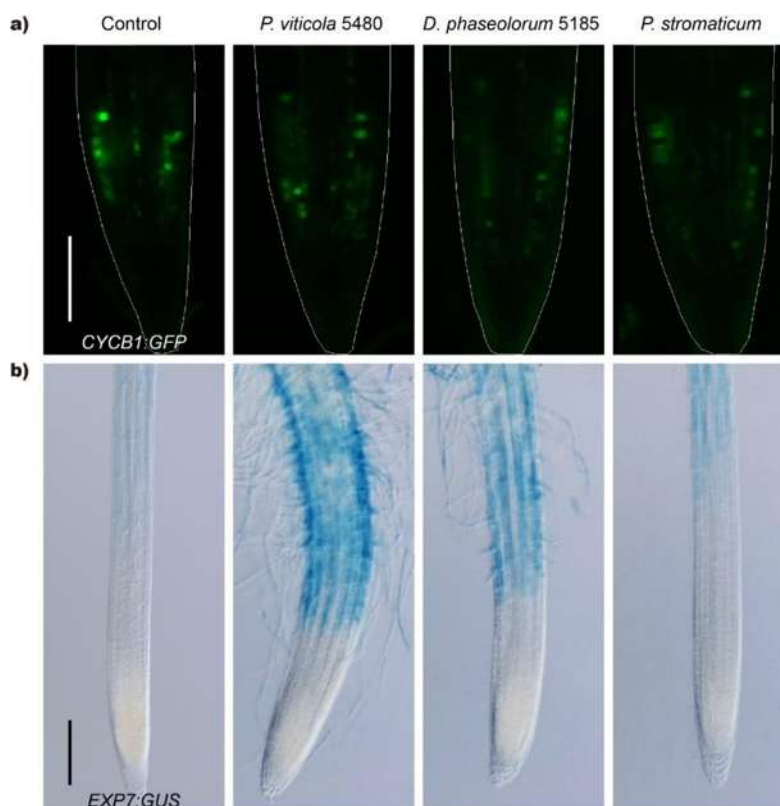


**Figura 22. Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la longitud de pelos radiculares.** a) Longitud de los pelos radiculares; b) Fotos representativas del desarrollo de pelos radiculares en la punta de la raíz primaria de *Arabidopsis* en interacción con los COVs de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Las plántulas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en un lado de cajas Petri divididas con medio MS 0.2X por 4 días, después, se inocularon con micelio de cada uno de los hongos del otro lado de la caja y se crecieron por 6 días adicionales. Las diferentes letras indican diferencias significativas de las medias ( $p < 0.05$ ),  $n=5$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 3 veces con resultados similares.

### **8.12. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular modifican la longitud de la raíz primaria a través de la alteración en la elongación y diferenciación celular**

Ya que los COVs de *P. viticola* 5480 inhiben el crecimiento de *Arabidopsis*, mientras que los COVs de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* promueven el crecimiento, se evaluaron el marcador de división celular *CYCB1:GFP* y el marcador de elongación y diferenciación celular *EXP7:GUS* de *Arabidopsis* en interacción con la mezcla de volátiles de los hongos fitopatógenos. Plantas de *Arabidopsis* *CYCB1:GFP* y *EXP7:GUS* que se crecieron en cajas Petri divididas, se pusieron en interacción por los volátiles de los hongos fitopatógenos y la actividad del marcador se analizó después de 4 días de interacción.

Las plantas que interactuaron con los COVs de los hongos fitopatógenos no modificaron la expresión del marcador *CYCB1:GFP* (Fig. 23a), lo que sugiere que la integridad del meristemo no se compromete y la actividad mitótica no se afecta al interactuar con los COVs de éstos hongos. Cuando las plantas estuvieron en interacción con los compuestos difusibles de *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 se observó una mayor expresión del marcador *EXP7:GUS*, además de que la expresión se observa más cerca del meristemo, un efecto parecido al que se observa cuando se encuentran en co-cultivo en caja completa, mientras que en las plantas expuestas a los compuestos de *P. stromaticum* se observa menor expresión que el control y la expresión comienza más lejos del meristemo (Fig. 23b). Estos datos sugieren que la promoción del crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* por los COVs de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* está acompañada de la formación y elongación de pelos radiculares, mientras que los COVs de *P. viticola* 5480 reprimen la elongación de la raíz primaria también son lo que se inducen mayor elongación de pelos radiculares, un efecto parecido al observado en co-cultivo en cajas completas de este hongo con *Arabidopsis*, como un mecanismo compensatorio.



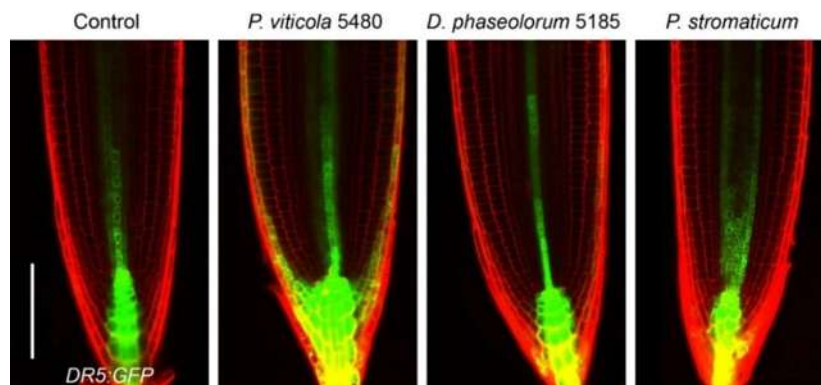
**Figura 23. Efecto en la división y diferenciación celular del meristemo de la raíz primaria de los COVs de hongos de la pudrición peduncular.** a) Imágenes de microscopía confocal de la expresión del marcador de división celular *CYCB1:GFP*; b) Expresión del marcador de diferenciación celular *EXP7:GUS*. Plántulas de *Arabidopsis* de 4 días de crecimiento que expresan las diferentes construcciones génicas se cultivaron en cajas divididas con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos muestran imágenes representativas de al menos 10 plántulas. Barras de escalas para *CYCB1:GUS*=100  $\mu$ m y *EXP7:GUS*=200  $\mu$ m. El experimento se realizó dos veces con resultados similares.

### 8.13. Los COVs de los hongos fitopatógenos modifican la ruta de señalización de las auxinas

Los hongos emiten diferentes conjuntos de COVs, que tienen un efecto en el crecimiento de los organismos a su alrededor. El crecimiento de la raíz principal y la formación de raíces laterales están relacionados directamente con la señalización de auxinas y los volátiles de hongos benéficos como *T. atroviride* y cepas de *F. oxysporum*, por ejemplo, promueven el crecimiento de plantas de tabaco y de *Arabidopsis* y este efecto es dependiente de la señalización de auxinas. En la determinación de evidencia de si los hongos test provocan el mismo efecto en

*Arabidopsis* se evaluó la señalización de las auxinas en la interacción con los COVs de los hongos fitopatógenos. Semillas de *Arabidopsis thaliana DR5:GFP* se crecieron en medio MS en el sistema de interacción por volátiles y se analizaron 3 días después.

Los COVs de los tres hongos aumentan la expresión del marcador inducible por auxinas *DR5:GFP* en la punta de la raíz y en algunas células de la epidermis, especialmente *P. viticola* 5480 (Fig. 24). La mayor concentración de auxinas en la raíz en presencia de los volátiles de *P. viticola* 5480 concuerda con la que se observa en co-cultivo en caja completa, lo que sugiere que los volátiles son los responsables del desbalance de la señalización de las auxinas, además, se ha reportado que una sobreacumulación de auxinas provoca la represión de la longitud de la raíz principal y de la formación de raíces laterales y pelos radiculares.



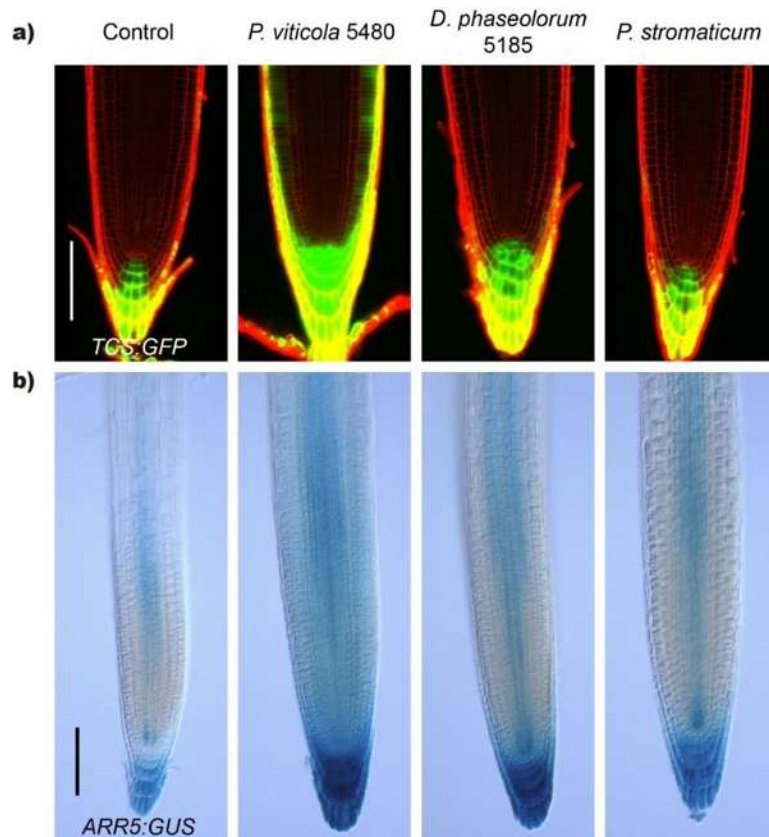
**Figura 24. Efecto en la expresión de *DR5:GFP* en la punta de la raíz por los COVs de hongos de la pudrición peduncular.** Imágenes de microscopía confocal de la expresión de la construcción con el gen inducible por auxinas *DR5:GFP*. Plantas de 4 días de crecimiento se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos son imágenes representativas de al menos 10 plantas. Barra de escala=1 mm. El experimento se realizó dos veces con resultados similares.

#### **8.14. Los COVs de hongos de la pudrición peduncular activan la señalización de las citocininas**

Los COVs de microorganismos de la rizosfera y no rizosféricos filogenéticamente diversos promueven el crecimiento y la floración de varias especies vegetales. *A. alternata* produce una mezcla de COVs que promueven el crecimiento de

*Arabidopsis* y esto está acompañado de un aumento en los niveles de citocininas y azúcares. Ya que hay una activación de la ruta de las auxinas durante la promoción del crecimiento y a que las citocininas están involucradas en los procesos de crecimiento y desarrollo se evaluó si la promoción o inhibición del crecimiento de *Arabidopsis* por los COVs de los hongos que causan pudrición peduncular involucra una modificación en la expresión de los genes inducibles por CK. La expresión de las construcciones génicas inducibles por CK, *TCS:GFP* y *ARR5:GUS* en *Arabidopsis* se evaluó en interacción con los COVs de los hongos que causan pudrición peduncular. Plantas de *Arabidopsis* *ARR5:GUS* y *TCS:GFP* se pusieron a interactuar con los COVs de los hongos fitopatógenos en cajas Petri divididas, la expresión se evaluó por microscopia Nomarsky y microscopia confocal 4 días después.

*P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 aumentan significativamente la expresión de los genes de las líneas reporteras, donde una mayor acumulación de esta hormona se observa en presencia de los volátiles de *P. viticola* 5480, mientras que los niveles de citocininas en plantas *TCS:GFP* expuestas a los COVs de *P. stromaticum* no hay diferencias con las plantas control, en las plantas *ARR5:GUS* se aprecia un aumento de la expresión en la punta de la raíz (Fig. 25).



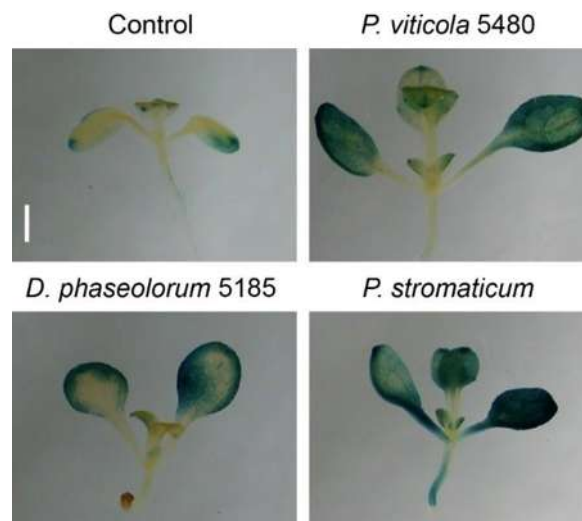
**Figura 25. Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la expresión de *TCS:GFP* y *ARR5:GUS* en la punta de la raíz.** a) Imágenes de microscopía confocal de la expresión de la construcción con el gen inducible por citocininas *TCS:GFP*; b) Expresión de *ARR5:GUS*. Plantas de 4 días de crecimiento en caja dividida se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* y se analizaron 4 días después. Las fotos son imágenes representativas de al menos 10 plantas. Barra de escala para *TCS:GFP*=100  $\mu$ m y para *ARR5:GUS*=200  $\mu$ m. El experimento se realizó dos veces con resultados similares. Note el incremento en la expresión de las dos construcciones genéticas en la región de la epidermis y la cofia en la punta de la raíz de plantas en co-cultivo con los tres hongos, especialmente con *P. viticola* 5480.

### 8.15. Los COVs de hongos fitopatógenos activan la ruta de defensa dependiente de ácido jasmónico

Ante la observación de que los compuestos volátiles de hongos promueven el crecimiento vegetal y encienden rutas de defensa dependientes de ácido jasmónico, como el 1-octen-3-ol, el volátil mayoritario de hongos que causan moho. Asimismo, se observó que las plantas en co-cultivo con los hongos que causan pudrición

peduncular activan la ruta defensa dependiente de ácido jasmónico, por lo cual se evaluó el efecto de los COVs emitidos por estos hongos en la expresión del gen marcador inducible por ácido jasmónico *LOX2:GUS*. Plantas de *Arabidopsis LOX2:GUS* interactuaron con los COVs de los hongos fitopatógenos en cajas Petri divididas, 4 días después se analizó la actividad de GUS en el follaje.

Los tres hongos activan la expresión de los genes de defensa inducibles por ácido jasmónico (Fig. 26). Se conoce que la ISR se activa por microorganismos benéficos, como los PGPF y PGPR a través de ácido jasmónico por lo cual se sugiere que la planta este percibiendo los volátiles de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* como compuestos benéficos por los cual aumenta su crecimiento, mientras que los volátiles de *P. viticola* 5480 los percibe como señales de patogénesis, por lo cual reprime el crecimiento (Pieterse et al., 2014).



**Figura 26. Efecto de los COVs de hongos de la pudrición peduncular sobre la expresión de *LOX2:GUS* inducible por ácido jasmónico.** Fotos representativas de la expresión del marcador *LOX2:GUS* inducible por ácido jasmónico. Plantas de *Arabidopsis LOX2:GUS* de 4 días de crecimiento en un lado de cajas Petri divididas se inocularon con un propágulo de micelio de *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* del otro lado de la caja y se analizaron 4 días después. Las fotos muestran imágenes representativas de al menos 10 plantas. El ensayo se repitió dos veces con resultados similares. Barra de escala=1 mm. Note el crecimiento diferencial de las hojas y el aumento en la expresión en la parte foliar de las plantas que interactuaron con los COVs de hongos que producen pudrición peduncular.

### 8.16. Identificación de los COVs producidos por hongos que causan pudrición peduncular

Para identificar los COVs responsables de la modificación del crecimiento vegetal en *Arabidopsis* que emiten los hongos que producen pudrición peduncular, se realizó un análisis de SPME-GC-MS de los COVs producidos por *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*, *A. thaliana* y el co-cultivo en caja dividida de cada uno de los hongos con *A. thaliana*, los cuales se crecieron en medio MS 0.2X durante 6 días. Los compuestos identificados por el espectro de masas se enlistan en la Tabla 1.

Los COVs más abundantes que se lograron identificar en *Arabidopsis* fueron el limoneno (17.38 %) y el isopropil laurato (28.33 %). Los hongos por su parte, producen mezclas de COVs diversos. Los compuestos mayoritarios para *P. viticola* 5480 son el  $\gamma$ -terpineno (42.35 %), 2-careno (20.74 %) y el *o*-cimeno (9.08 %); los de *D. phaseolorum* 5185 son  $\beta$ -felandreno (22 %),  $\beta$ -terpineol (14.57 %) y octadecano (14.76); mientras que los de *P. stromaticum* son la 2-nonanona (78.96 %), 2-decanona (5.62 %) y el (*E*)-1-metoxi-4-hexeno (9.83 %). Los compuestos mayoritarios de los hongos pueden ser los responsables de la modificación del crecimiento en la planta.

De manera interesante, cuando las plantas se encontraron en co-cultivo con *P. viticola* 5480 se encontró que hay una reducción de los compuestos mayoritarios de la planta y una reducción en la abundancia del 2-careno y el  $\gamma$ -terpineno, pero se observó la formación del terpinen-4-ol y de un compuesto desconocido, aunque en poca abundancia. Cuando la planta se co-cultivó con *P. stromaticum* la abundancia de la 2-nonanona se reduce drásticamente, pero distingue la misma abundancia de isopropil laurato en la planta.

El  $\gamma$ -terpineno es un terpeno que se encuentra en diversas especies vegetales y en hongos como *Penicillium clavigerum* y *T. atroviride*, tiene funciones antioxidantes y antimicrobianas. La mezcla de volátiles de *L. bicolor* incluye al monoterpeno 2-careno, el cual promueve la formación de raíces laterales y de pelos radiculares de *Arabidopsis*, un efecto parecido al que se observa con *P. viticola* 5480. El  $\beta$ -felandreno común en aceites esenciales del eucalipto, lavándula y menta, pero

también se ha identificado en otros hongos patógenos, como *Cochliobolus sativus* y *F. colmonum*. La 2-nonanona es un compuesto común entre varias especies de hongos, que incluyen *Penicillium* spp., *T. atroviride*, *Ulocladium chartarum*, algunas bacterias y múltiples especies vegetales. Este compuesto se usa como componente de fragancias y se reporta su actividad larvívica contra *Bradysia procera*. Aunque estos compuestos se reportan en especies vegetales, no son privativos al reino Plantae, así como se encuentran en especies fúngicas, es probable que se sintetizan en especies de otros reinos (PubChem).

El hecho de que la abundancia de los compuestos fúngicos mayoritarios disminuya cuando la planta y el hongo crecen juntos puede indicarnos varios escenarios, por un lado, la planta está absorbiendo y metabolizando los compuestos y éstas son las moléculas bioactivas que inducen la modificación en el crecimiento, por lo cual se reduce su abundancia cuando se encuentran juntos; que la planta produzca un metabolito que inhibe la síntesis de los compuestos en los hongos; que el hongo por sí solo disminuya su metabolismo; o en el caso de la 2-nonanona, que al ser una molécula hidrófoba, se integre a la membrana plasmática de las células de la planta.

**Tabla 1. Abundancia (%) de compuestos orgánicos volátiles producidos por hongos de la pudrición peduncular**

Compuestos	<i>A. thaliana</i>	<i>P. viticola</i>	<i>D. phaseolorum</i>	<i>P. stromaticum</i>	<i>A. thaliana</i> y <i>P. viticola</i>	<i>A. thaliana</i> y <i>P. stromaticum</i>
$\beta$ -Thujeno	nd	0,73	nd	nd	0,98	nd
<i>p</i> -Ment-3-eno	nd	0,26	nd	nd	nd	nd
Ácido 2- Bromopropanoico, hexil éster	nd	nd	0,59	nd	nd	nd
Benceno	nd	nd	nd	nd	nd	0,61
Metil 2,3-dimetil butanoato	nd	nd	nd	nd	nd	1,12
1-Metoxi-1,3- cyclohexadieno	nd	nd	nd	nd	0,11	0,55
Canfeno	2,59	nd	nd	nd	0,02	nd
$\alpha$ -Felandreno	0,45	1,77	22,00	nd	5,8	nd
Sabineno	nd	nd	nd	nd	0,33	nd
$\beta$ -Felandrene	nd	nd	nd	nd	0,15	nd
$\beta$ -Mirceño	1,57	nd	nd	nd	0,06	nd
2-Careno	nd	20,74	nd	nd	12,74	nd
Limoneno	17,38	5,24	3,46	nd	3,17	0,93
Eucaliptol	2,59	nd	nd	nd	nd	nd
$\beta$ -Felandreno	nd	7,58	nd	nd	3,63	nd
$\gamma$ -Terpineno	2,62	42,35	nd	nd	25,75	0,21
3-Metil-3-buten-1-ol	nd	nd	nd	nd	1,26	nd
<i>o</i> -Cimeno	2,74	9,08	nd	nd	3,57	nd
4-Careno	nd	7,78	nd	nd	3,76	nd
Terpinoleno	nd	1,35	nd	nd	nd	nd
<i>p</i> -Mentan-3-ona	nd	nd	nd	nd	1,06	nd
$\beta$ -Terpineol	nd	nd	14,57	nd	2,38	nd
Ácido acético	4,61	nd	nd	nd	nd	2,04
3,9-Epox- <i>p</i> -ment-1-eno	nd	nd	nd	nd	0,31	nd
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	nd	nd	nd	nd	1,99	nd
Estragol	nd	1,1	nd	nd	nd	nd
Terpinen-4-ol	nd	nd	nd	nd	23,85	nd
6-Metil-2-heptanol	3,49	nd	nd	nd	nd	nd
Acetofenona	9,24	nd	nd	nd	0,52	nd
$\gamma$ -Gurjuneno	nd	nd	nd	nd	0,48	nd
$\alpha$ -Muroleno	nd	1,23	nd	nd	0,5	nd
Isopropil laurato	28,33	nd	nd	nd	3,27	22,94
Desconocido	nd	nd	nd	nd	1,79	nd
Desconocido	nd	nd	nd	nd	nd	12,88

Fenil etil alcohol	nd	nd	nd	nd	0,11	nd
Difenil éter	nd	0,77	nd	nd	nd	nd
Benzotiazol	nd	nd	nd	nd	0,42	nd
Ácido decanoico	2,1	nd	nd	nd	nd	nd
Fenol	3,34	nd	nd	nd	0,46	nd
Dimetilpalmitamina	nd	nd	nd	nd	0,42	nd
3-Metil-1,1'-bifenilo	nd	nd	nd	nd	0,15	nd
2-Fenoxietanol	6,67	nd	nd	nd	0,21	nd
Ceteno	nd	nd	nd	nd	0,36	3,02
Ácido benzoico	2,11	nd	nd	nd	0,15	1,07
Ácido dodecanoico	10,28	nd	nd	nd	0,28	5,05
Ácido decanoico	nd	nd	nd	nd	nd	2,7
Fenol	nd	nd	nd	nd	nd	0,95
3-Metil-1,1'-bifenilo	nd	nd	nd	nd	nd	1,1
2-Fenoxietanol	nd	nd	nd	nd	nd	1,45
Desconocido	nd	nd	nd	nd	nd	9,75
$\alpha$ -Bisabolol	nd	nd	nd	nd	nd	4,2
(-)-Mellein	nd	nd	nd	nd	nd	0,79
Ácido hexadecanoico	nd	nd	nd	0,83	nd	nd
2-Heptanona	nd	nd	nd	2,05	nd	0,54
Metil-2-etil hexanoato	nd	nd	nd	nd	nd	7,85
2-Octanona	nd	nd	nd	1,53	nd	0,25
2-Nonanona	nd	nd	nd	78,96	nd	12,66
(E)-1-Metoxi-4-hexeno	nd	nd	nd	9,83	nd	2,1
2-Decanona	nd	nd	nd	5,62	nd	nd
2-Nonanol	nd	nd	nd	1,18	nd	0,71
6-Metil-2-heptanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetofenona	nd	nd	nd	nd	nd	2,75
Acetamida	nd	nd	nd	nd	nd	1,76
Eicosano	nd	nd	1,62	nd	nd	nd
Tetratriacontano	nd	nd	1,93	nd	nd	nd
Heneicosano	nd	nd	2,84	nd	nd	nd
Heptacosano	nd	nd	2,73	nd	nd	nd
Octacosano	nd	nd	14,76	nd	nd	nd

nd: no determinado

### **8.17. La estimulación del crecimiento de *Arabidopsis* por los compuestos difusibles y los COVs de hongos fitopatógenos se conserva durante el ciclo de vida**

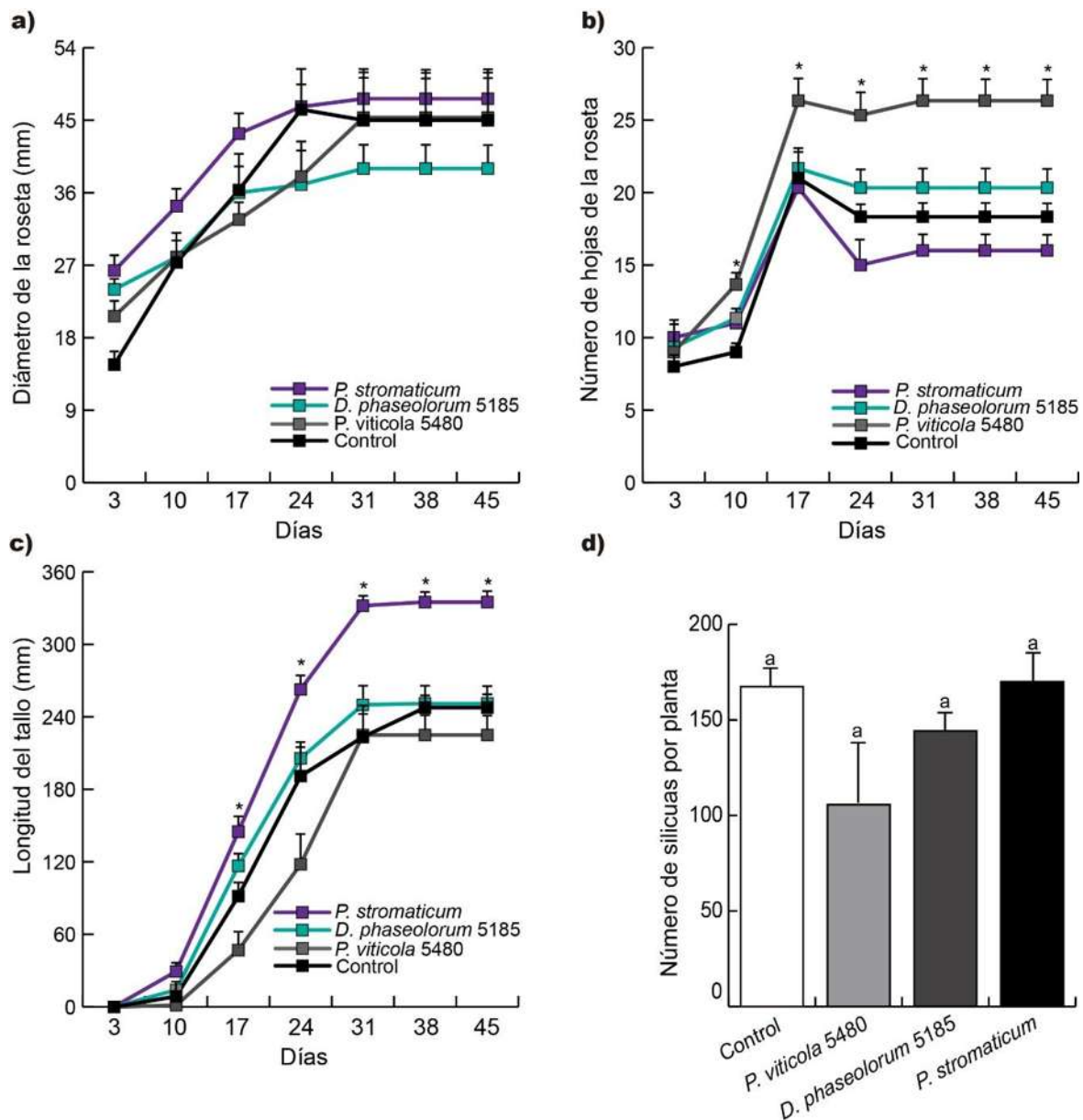
Estudios recientes demuestran que las plantas además de percibir estímulos del ambiente pueden “recordar” eventos ambientales del pasado y pueden usar esta “memoria” para ayudar a su respuesta cuando estos eventos vuelven a ocurrir. La activación de los mecanismos de defensa por microorganismos patógenos e insectos se puede mantener durante su ciclo de vida y heredarse a las siguientes generaciones. Por lo cual, se decidió evaluar si el fenotipo en presencia de los hongos se mantiene una vez que se les retira el estímulo de los compuestos tanto difusibles como volátiles. Plantas que estuvieron en co-cultivo en caja completa y con los volátiles de los hongos fitopatógenos durante 5 días se trasplantaron en suelo, antes de que el micelio tuviera contacto físico con algún tejido de la planta. Las plantas en suelo se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones de luz y temperatura y se evaluó el diámetro de la roseta, número de hojas en la roseta y la longitud del tallo cada siete días después del trasplante y el número de silicuas desarrolladas por plantas al final del ciclo de vida.

Las plantas que previamente estuvieron en co-cultivo en cajas completas con los hongos que causan pudrición peduncular no tuvieron diferencias en el diámetro de la roseta (Fig. 27a). Las plantas que interactuaron previamente con *P. viticola* 5480 tuvieron mayor número de hojas, sin embargo éstas eran más pequeñas que el control (Fig. 27b). Durante la interacción con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 se inhibió el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*, pero en suelo lograron reestablecer el crecimiento del tallo, el cual fue como una planta control. Lo que implica que las plantas al ya no recibir el estímulo de los metabolitos secundarios de este hongo se restituye el crecimiento normal de *Arabidopsis*. De manera interesante la longitud del tallo en interacción con *P. stromaticum* fue mayor que el control, manteniendo la promoción de crecimiento que se observó en co-cultivo en cajas completas (Fig. 27c). Sin embargo, el número de silicuas que produjeron al final del ciclo de vida no registró diferencias significativas con el control, aunque hay una tendencia a la mayor producción en exposición a *P. stromaticum* (Fig. 27d).

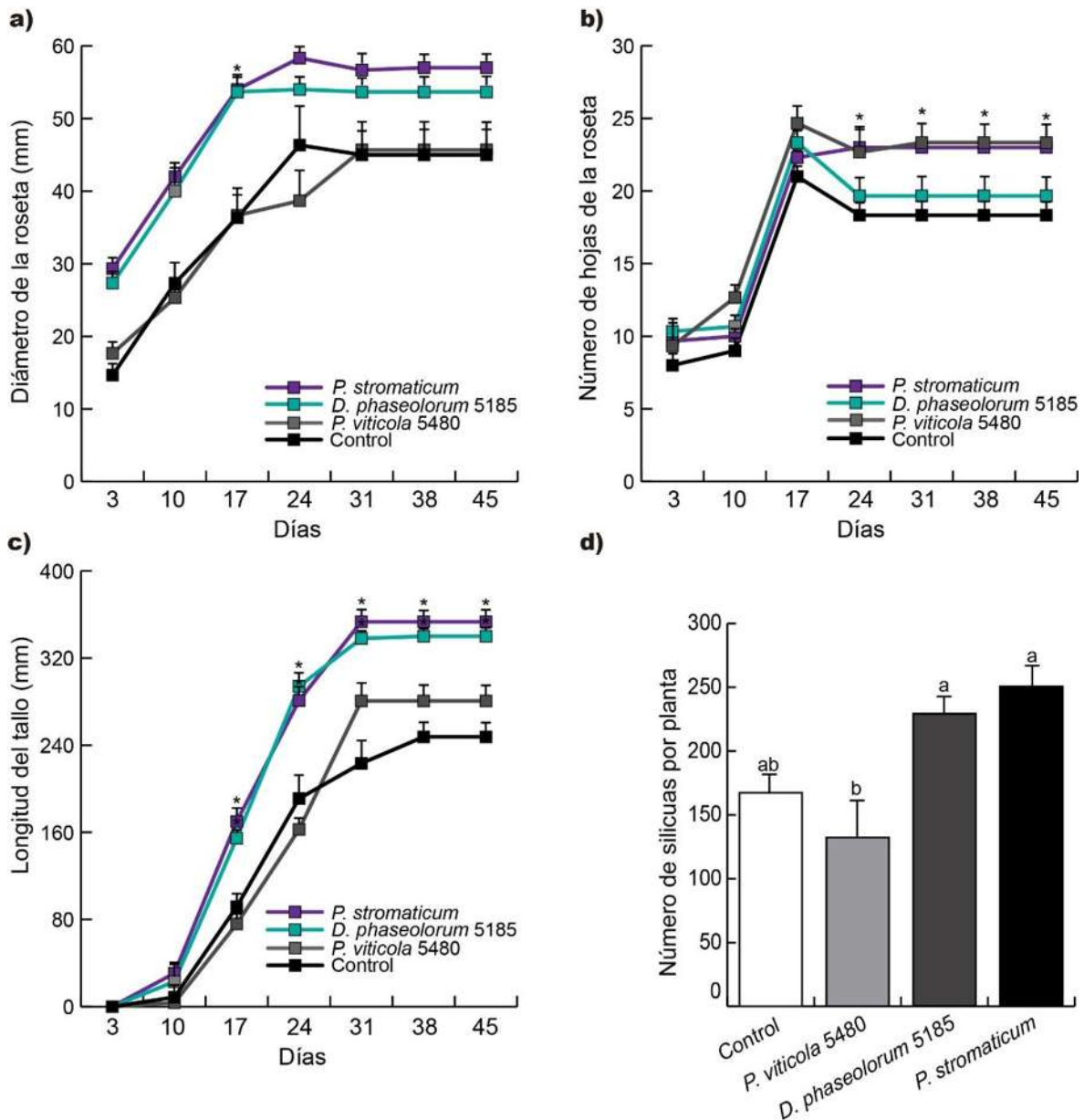
Por otro lado, las plantas que interactuaron con los volátiles de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*, una vez que se trasplantaron a suelo, solo durante en las primeras tres semanas de crecimiento se observaron rosetas más grandes que con el control (Fig. 28a), no se presentaron diferencias significativas en cuanto al número de hojas de la roseta (Fig. 28b), A pesar de esto, la longitud de los tallos de las plantas que interactuaron con los COVs de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* fue mayor que el control desde la tercer semana de crecimiento y se mantuvo hasta el final de su ciclo de vida, de igual manera se observó una mayor producción final de silicuas por planta (Fig. 28c,d).

Además, las plantas que estuvieron en interacción con los volátiles de *D. phaseolorum* 5185 ya no presentan flores como las control, únicamente silicuas, lo que sugiere que el crecimiento y desarrollo está acelerado, llegando más rápido a etapas de maduración (datos no mostrados).

Las plantas que estuvieron con *P. viticola* 5480 las cuales tienen un alargamiento de la raíz principal reprimida cuando están en interacción, una vez que se retira el estímulo se recuperan, ya que alcanzan un crecimiento similar al de los controles. El fenotipo que se observa con los metabolitos secundarios de *P. viticola* 5480 no se mantienen post interacción, mientras que los compuestos de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* son percibidos y dejan una memoria en la planta durante su ciclo de vida.



**Figura 27. Cinética del crecimiento de *Arabidopsis* en suelo después de la interacción en co-cultivo en caja completa con los hongos de la pudrición peduncular.** a) Diámetro de la roseta. b) Número de hojas de la roseta. c) Longitud del tallo. d) Producción de silicuas por planta al final de su ciclo de vida. Plantas de *Arabidopsis* que interactuaron durante 5 días con los hongos *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* se trasplantaron a suelo estéril y se evaluó el crecimiento cada 7 días durante 7 semanas. Los asteriscos indican diferencias significativas de las medias comparadas con el control ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.



**Figura 28. Cinética del crecimiento de *Arabidopsis* en suelo después de la interacción con los COVs de los hongos de la pudrición peduncular.** a) Diámetro de la roseta. b) Número de hojas de la roseta. c) Longitud del tallo. d) Producción de silicuas por planta al final de su ciclo de vida. Plantas de *Arabidopsis* que interactuaron durante 5 días con los volátiles de los hongos *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum* se trasplantaron a suelo estéril y se evaluó el crecimiento cada 7 días durante 7 semanas. Los asteriscos indican diferencias significativas de las medias comparadas con el control ( $p < 0.05$ ),  $n = 3$ . Las barras representan las medias  $\pm$  EE. El experimento se repitió 2 veces con resultados similares.

## 9. Discusión

La pudrición peduncular en frutos climatéricos como el aguacate, el mango y los cítricos la causan diversas especies de hongos. En muchos países las pérdidas de aguacate post cosecha son atribuidas especialmente a un consorcio de hongos (Twizeyimana et al., 2013; Guarnaccia et al., 2016). Muchos de estos hongos son endófitos naturales de los tejidos de las ramas y se encuentran ahí incluso antes de que se desarrolle la inflorescencia (Johnson et al., 1992).

Incluso cuando esto es un problema mundial, no se conocen los mecanismos precisos por los cuales los hongos causan la enfermedad o si sus efectos son diferentes cuando los hongos actúan aislados o en consorcio y en general se conocen escasamente las respuestas tempranas de la planta hospedera en términos de desarrollo y defensa durante la infección.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto que provocan los patógenos involucrados en la sintomatología de la pudrición y su posible relación con el desarrollo y la defensa en *Arabidopsis*. Del consorcio fúngico tres aislados se caracterizaron, *Phomopsis viticola* 5480, *Diaporthe phaseolorum* y *Pseudofusicoccum stromaticum* provenientes del pericarpio de frutos de aguacate cv. "Hass" colectados de las regiones productoras de aguacate en Michoacán, México. Los síntomas de enfermedad se demostraron al infectar los frutos con cada uno de los hongos.

El primer ensayo consistió en mantener en co-cultivo a *Arabidopsis* con cada uno de los tres hongos de manera que interactuaran a través de los metabolitos tanto volátiles como los que pueden difundir en el medio, pero sin permitir un contacto físico entre la planta y el hongo. Lo que se observó fue un comportamiento diferencial de la planta dependiendo de la especie fúngica con la que interactuó. *P. viticola* 5480 reprimió fuertemente el crecimiento de la raíz; aunque promovió la formación de raíces laterales, estas fueron cortas y acompañadas de una mayor formación de pelos radiculares y más largos, esto probablemente para compensar la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. *D. phaseolorum* 5185 también tuvo un efecto represor en el crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis*, aunque no tan marcado como con *P. viticola* 5480 (Fig. 13). El fenotipo de *Arabidopsis* al

interactuar con estos dos hongos es similar al que se observa cuando la planta se expone a situaciones de estrés ambiental, privación de nutrientes, así como la interacción con algunas cepas de bacterias y hongos patógenos, como *Pseudomonas* spp. o *Cladosporium herbarum* (Ortiz-Castro et al., 2014; Ruiz Herrera et al., 2015; Casarrubia et al., 2016; Pečenková et al., 2017). Esto sugiere que evidentemente la planta está percibiendo la presencia de los hongos y sus metabolitos, los cuales se acumulan en el medio al mismo tiempo que el hongo crece y probablemente tienen la capacidad de actuar como factores de virulencia que alertan a la planta e inhiben su crecimiento ante una amenaza.

Por otro lado, cuando *Arabidopsis* interactúa únicamente con los COVs de *P. viticola* 5480 se observó un efecto similar al que presentó en co-cultivo en caja completa (Fig. 21), lo que sugiere que es la mezcla de volátiles o uno de éstos son los compuestos responsables de inhibir el crecimiento de *Arabidopsis*. Al respecto, se reportó que los COVs del hongo patógeno *Rhizoctonia solani* inhiben el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* de manera similar al que se observa por *P. viticola* 5480, también los COVs de *Tuber* spp. tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *Arabidopsis*; aunque las trufas son hongos micorrícicos presentan un efecto parecido a los patógenos en *Arabidopsis* (Splivallo et al., 2007; Cordovez et al., 2017). Una posible explicación es que los metabolitos fúngicos se perciben en las células de la capa lateral de la raíz, una estructura sensorial especializada, la cual transmite la información a las zonas de elongación y división celular, cambia los patrones de crecimiento y lo redirecciona a sitios más alejados de la zona de influencia con el hongo.

Ya que hay una reducción de la longitud de raíz principal y mayor formación de raíces laterales en plantas que se expusieron a los compuestos difusibles en co-cultivo en caja completa con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 y también a los COVs de *P. viticola* 5480, surge la pregunta si es debido a que el meristemo radicular sufre un daño al interactuar con los metabolitos secundarios, la expresión del marcador mitótico *CYCB1:GFP* en las plantas que interactuaron con los hongos no cambia comparada con las del control, lo que nos sugiere que la viabilidad del meristemo no está comprometida y los patrones de división celular se mantienen

(Fig. 15a). En cuanto a la diferenciación de células epidérmicas a través de la expresión del marcador de *EXP7:GUS* (Fig. 15b), la mayor expresión del marcador y el hecho de que comience más cerca al meristemo en las plantas que interactuaron con los hongos indica que la raíz primaria se inhibe por la alteración del programa de diferenciación, el cual se acelera y reduce la zona de elongación, además de que se promueve la formación de tricoblastos en la zona de diferenciación, algo parecido a lo que sucede con volátiles de hongos y bacterias (Garnica-Vergara et al., 2015; Raya-González et al., 2017).

Las plantas que interactuaron en co-cultivo en caja completa con el hongo *P. stromaticum*, inesperadamente presentaron una biomasa mayor y se promovió la formación de raíces laterales (Fig. 13), un efecto similar al reportado por el hongo simbionte *T. atroviride* (Contreras-Cornejo et al., 2009). Cuando las plantas estuvieron en interacción únicamente con los COVs de éste se aumentaron los efectos de promoción: la biomasa foliar de las plantas fue más vigorosas, la raíz primaria más larga y con mayor número de raíces laterales, un efecto parecido al de las PGPRs (Gutiérrez-Luna et al., 2010; Lee et al., 2016; Hernández-Calderón et al., 2018). Lo que esto nos puede sugerir que, por un lado, este hongo no es patógeno, sino un endófito que se encontraba en conjunto con los hongos que causan pudrición o un oportunista y que la mezcla de sus volátiles tienen un efecto bioactivo positivo.

De manera interesante, el fenotipo de las plantas que estuvieron en interacción con los COVs de *D. phaseolorum* 5185 fue contrario que en co-cultivo en caja completa: se promovió el crecimiento de la raíz principal y aumentó la biomasa foliar, un efecto de promoción de crecimiento y desarrollo que se ha reportado antes para otros hongos benéficos y patógenos y muy parecido al de los COVs de *P. stromaticum* (Farag et al., 2006; Bitas et al., 2015; Casarrubia et al., 2016; Sánchez-López et al., 2016). Al evaluar la expresión del marcador *CYCB1:GFP* de las plantas que interactuaron tanto en co-cultivo en caja completa como únicamente con los COVs de *P. stromaticum* (Fig. 15a y 23a) y con los COVs de *D. phaseolorum* 5185 (Fig. 23a) tampoco se encontraron diferencias en la expresión del marcador, esto sugiere que la elongación de la raíz no es debido a una mayor actividad mitótica. Sin

embargo, en el caso de las plantas que interactuaron con los volátiles de *D. phaseolorum* 5185 la expresión del marcador *EXP7:GUS* permitió ver que la zona de elongación es más grande, pero hay una diferenciación a tricoblastos de las células de la epidermis. Mientras que la expresión de este marcador en las plantas con *P. stromaticum* fue igual o menor que el control, y comienza más lejos del meristemo, lo cual corresponde a la escasa formación de pelos radiculares en interacción con el hongo (Fig. 23, b).

La diversidad metabólica de los hongos que causan pudrición peduncular también se comprobó cuando se comparó la capacidad de acidificación de cada uno. *P. stromaticum* y el hongo benéfico *T. atroviride* acidifican fuertemente el medio donde crecen, mientras que *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 mostraron una capacidad reducida. Además de su tasa de crecimiento, esto se puede explicar por la expresión de H<sup>+</sup>-ATPasas, ya que la adición de ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), un inhibidor de ATPasas reduce la acidificación de manera concentración dependiente (Pelagio-Flores et al., 2017). La capacidad de acidificación tan contrastante de los tres hongos, indica que disminuir el pH no está relacionado con los efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta y probablemente tampoco en el fruto. Por otra parte, la acidificación causada por los hongos y las plantas ayuda a la solubilización de algunos minerales que no están disponibles en suelos alcalinos, como el hierro y el fosfato, pero pH bajos tienen efectos negativos.

Asimismo, la acumulación de auxinas y de citocininas, hormonas de crecimiento, en la punta de la raíz provoca un acortamiento de la raíz principal. Cuando la expresión de los marcadores inducibles por auxinas *DR5:GUS* y *DR5:GFP* y los inducibles por citocininas *TCS:GFP* y *ARR5:GFP* se midió, una mayor acumulación de auxinas y citocininas en la punta de la raíz de las plantas que interactuaron con los tres hongos se encontró. La alteración en la morfología radicular en plantas en contacto con microorganismos a través de la ruta de las auxinas está bien documentado, lo que sugiere que, al menos en parte, la activación local de la ruta de señalización de las auxinas promueve las modificaciones en la raíz primaria o que tal vez los hongos que causan pudrición peduncular pueden producir auxinas, precursores de auxinas o compuestos que mimeticen la señal.

Lo más interesante es la expresión de los marcadores inducibles por CK, la expresión fue drásticamente más intensa que en los controles, especialmente con *P. viticola* 5480, el cual es el hongo que inhibe el crecimiento de la planta. Las heridas mecánicas y la herbivoría incrementan las concentraciones de citocininas y esto puede contribuir a la reparación del tejido. La aplicación exógena de CK inhibe el crecimiento de la raíz primaria a través de la modificación de los programas de elongación, se reduce el número de células meristemáticas y la zona de transición se desarrolla más próxima al meristemo, sin afectar la actividad mitótica (Dello iolo et al., 2007). Sin embargo, bacterias y hongos patógenos y benéficos modifican la morfología radicular al inhibir el crecimiento a través de la ruta de señalización de las CK (Ruzicka et al., 2009; Giron et al., 2013; Radhika et al., 2015; Wang et al., 2018).

Algunos microorganismos patógenos sintetizan citocininas o compuestos que tienen una función de citocinina como estrategia para infectar los tejidos, los cuales se acumulan en el tejido para inhibir el crecimiento o formar estructuras que deterioran a la planta, como las agallas. Típicamente, durante el desarrollo más de una hormona está implicada en el proceso, así, la coordinación del traslape de éstas es crucial para el correcto desarrollo de la planta. Algunos patógenos como *Magnaporthe oryzae*, *Rhodococcus fascians* y *Claviceps purpurea* aumentan su virulencia cuando aumentan las concentraciones de CK y éstas actúan sinérgicamente con auxinas, ácido salicílico y etileno (Ruzicka et al., 2009; Jiang et al., 2013). Por lo cual, el aumento de CK en las plantas que interactuaron con *P. viticola* 5480 y *D. phaseolorum* 5185 puede ser debido a la producción por parte del hongo de CK, algún precursor o compuesto con función de CK o bien los compuestos producidos por los hongos inducen una respuesta de CK que altera el metabolismo y se refleja en el crecimiento vegetal.

Las compensaciones crecimiento-defensa son comunes en las plantas que están expuestas a una restricción de nutrientes o bajo el desafío de un patógeno, lo cual demanda una priorización entre crecimiento o defensa, dependiendo de los factores internos y externos. El ácido jasmónico tiene un impacto en la supervivencia, la reproducción y la salud (Antico et al., 2012). De hecho, hasta recientemente se le

involucra en la regulación de la morfología del sistema radicular. Para determinar una posible interacción entre las rutas de señalización de defensa y de crecimiento desencadenadas por los hongos que causan pudrición peduncular, la expresión del gen marcador de respuesta a ácido jasmónico se ensayó en *Arabidopsis* en co-cultivo en caja completa o solo por volátiles con *P. viticola* 5480, *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*. Consistente con la activación de la defensa, una mayor expresión del marcador se observó en la parte foliar, independientemente de que no existiera contacto físico. Estos datos demuestran que los hongos que causan pudrición peduncular activan sistémicamente respuestas de defensa en hojas a través de la señalización del ácido jasmónico.

Una observación interesante, es el crecimiento de la planta una vez que el estímulo de los metabolitos secundarios fúngicos desaparece. Las plantas que interactuaron en co-cultivo en caja completa o con los volátiles de los tres hongos de la pudrición peduncular y después se trasplantaron a suelo tuvieron un crecimiento diferencial. Especialmente, las que estuvieron en interacción únicamente con los COVs de *D. phaseolorum* 5185 y *P. stromaticum*, sus tallos fueron más largos y tuvieron mayor producción de silicuas al final de su ciclo de vida. Esto sugiere que desde etapas tempranas de la interacción, los COVs aceleran el crecimiento vegetal, probablemente a través de la resistencia sistémica al activar las rutas de defensa. Cuando se retira el estímulo, el condicionamiento que indujeron estos dos hongos se mantienen durante todo el ciclo de vida, como una “memoria” (Pieterse et al., 2014; Kinoshita y Seki, 2014). La “memoria” en la planta requiere dos incidentes secuenciales, el evento que condiciona la defensa de la planta y el reto, el cual activa las características relacionadas con la defensa a nivel fenotípico. Además de la “memoria”, algunos otros aspectos relacionados con el condicionamiento o “priming”, es tener una respuesta de defensa más robusta, un mejor rendimiento, aclimatación, tolerancia y reducir el costo energético (Conrath et al., 2002; Martínez-Medina et al., 2016; Mauch-Mani et al., 2017). En términos ecológicos puede ser que el hongo prepare a la planta para recibirlo, donde el microorganismo produce primero compuestos bioactivos que aseguran el crecimiento de la planta para después poder continuar con la fase patogénica; por otro lado, las plantas pueden

tener un evento de condicionamiento o priming, en la cual, la planta aumenta su biomasa para resistir la infección o acelera su crecimiento para terminar su ciclo de vida más rápido. Caso contrario, cuando se retiró el estímulo en las plantas que interactuaron en los dos sistemas con *P. viticola* 5480, restablecieron su tamaño similar al control, lo que sugiere que las moléculas que el hongo emite son percibidas como tóxicas, las plantas detienen su crecimiento, pero no dejan la “memoria” y el efecto no se mantiene. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más ensayos para fortalecer esta observación.

Si bien cada hongo tiene una actividad específica, los metabolitos de los hongos patógenos que causan pudrición peduncular predisponen a distancia a las plantas a la infección al alterar la morfología radicular, promoviendo o inhibiendo el crecimiento. Alternativamente, las plantas pueden aumentar el crecimiento radicular a través de la percepción de los metabolitos para sacrificar parte de la biomasa radicular y acelerar el desarrollo y reproducción para sobrevivir a la infección.

## 10. Literatura citada

- Alkan, N., Espeso, E. A., y Prusky, D. (2013). Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19, 1012–1025.
- Antico, C. J., Colon, C., Banks, T., y Ramonell, K. M. (2012). Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *Frontiers in Biology*, 7, 48–56.
- Badri, D. V., y Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell & Environment*, 32, 666–681.
- Beemster, G. T. S., y Baskin, T. I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116, 1515–1526.
- Beltran-Garcia, M., Estarron-Espinosa, M., y Ogura, T. (1997). Volatile compounds secreted by the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and their antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4049–4052.
- Bennett, J., Hung, R., Lee, S., y Padhi, S. (2012). Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. P. 373–393. En *Fungal Associations* (B. Hock Ed.). Springer-Verlag. Berlín, Heidelberg.
- Berendsen, R., Pieterse, C., y Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.
- Bitas, V., Kim, H., Bennett, J., y Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 835–843.
- Bitas, V., McCartney, N., Li, N., Demers, J., Kim, J. E., Kim, H. S., Brown, K. M., y Kang, S. (2015). *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–14.
- Bolwell, G. P. (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 287-94.

- Bonfante, P., y Requena, N. (2011). Dating in the dark: How roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 451–457.
- Brakhage, A., y Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 15–22.
- Casarrubia, S., Sapienza, S., Fritz, H., Daghino, S., Rosenkranz, M., Schnitzler, J., Martin, F., Perotto, S., y Martino, E. (2016). Ecologically different fungi affect *Arabidopsis* development: contribution of soluble and volatile compounds. *PLoS One*, 11, 1-23.
- Chanclud, E., y Morel, J. B. (2016). Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular Plant Pathology*, 17, 1289-1297.
- Cho, H. T., y Cosgrove, D. J. (2002). Regulation of root air initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 14, 3237–3253.
- Claus, W., y Strnad, M. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development – active and inactive compounds. *New Biotechnology*, 33, 604-613.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J., y Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7, 210–216.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera-Estrella, A., y 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 Signaling & Behavior*, 6, 1554–1563.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., y 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 Physiology*, 149, 1579–1592.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Del-Val, E., y Larsen, J. (2016). Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants. *Fems Microbiology Ecology*, 1–17.

- Cordovez, V., Mommer, L., Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Pierik, R., Mumm, R., Carrion, V. J., y Raaijmakers, J. M. (2017). Plant phenotypic and transcriptional changes induced by volatiles from the fungal root pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–14.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., y Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235–253.
- D'Agostino, I. B., Deruère, J., y Kieber, J. J. (2000). Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, 124, 1706–1717.
- Danggomen, A., Visarathanonth, N., Manoch, L., y Piasai, O. (2013). Morphological studies of endophytic and plant pathogenic *Phomopsis liquidambaris* and *Diaporthe phaseolorum* (*P. phaseoli* anamorph) from healthy plants and diseased fruits. *Thai Journal of Agricultural Science*, 46, 157–164.
- Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I., y Wasternack, C. (2006). Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*-enzymes, products, regulation. *Plant Biology*, 8, 297–306.
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., y Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*, 17, 678–682.
- Dissanayake, A. J., Liu, M., Zhang, W., Chen, Z., Udayanga, D., Chukeatirote, E., Li, X. H., Yan, J., y Hyde, K. D. (2015). Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. *Fungal Biology*, 119, 283–294.
- Ditengou, F., Müller, A., Rosenkranz, M., Felten, J., Lasok, H., Miloradovic van Doorn, M., Legué, V., Palme, K., Schnitzer, J., y Polle, A. (2015). Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature Communications*, 6, 1-9.

- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., y Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 665–703.
- Erincik, O., Madden, L. V., Ferree, D. C., y Ellis, M. A. (2001). Effect of growth stage on susceptibility of grape berry and rachis tissues to infection by *Phomopsis viticola*. *Plant Disease*, 85, 517–520.
- Eskalen, A., Faber, B., y Bianchi, M. (2013). Spore trapping and pathogenicity of fungi in the Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae associated with avocado branch canker in California. *Plant Disease*, 97, 329–332.
- Espinoza-Madrigal, R. M., Del Río-Torres, R., Flores-García, A., y Martínez-Pacheco, M. M. (2018). Potassium bicarbonate on stem end root avocado (*Persea americana* Mill. Var Hass). *Transylvanian Review*, 24, 8019-8116.
- Evangelisti, E., Rey, T., y Schornack, S. (2014). Cross-interference of plant development and plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 118–126.
- Everett, K. R., y Pak, H. A. (2001). Orchard survey: Effect of preharvest factors on postharvest rots. *NZ Avocado Growers Association Annual Research Report*, 1, 10-19.
- Farag, M., Ryu, C., Sumner, L., y Paré, P. (2006). GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. *Phytochemistry*, 67, 2262–2268.
- Fiers, M., Lognay, G., Fauconnier, M., y Jijakli, M. H. (2013). Volatile compound-mediated interactions between barley and pathogenic fungi in the soil. *PLoS*, 8, 1-18.
- Fu, S., Wei J., Chen H., Liu Y., Lu H., y Chou, J. (2015). Indole-3-acetic acid: a widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant Signaling & Behavior*, 10, 1-9.
- Fusconi, A. (2014). Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: What role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation? *Annals of Botany*, 113, 19–33.

- Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Mendez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L., y López-Bucio, J. (2015). The volatile 6-pentyl-2 H -pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209, 1496-1512.
- Giron, D., Frago, E., Glevarec, G., Pieterse, C. M. J., y Dicke, M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: Connecting plant growth and defence. *Functional Ecology*, 27, 599–609.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2013). *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 1–41.
- Gray, W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, 2.
- Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., y Schiefelbein, J. (2014). Root hairs. *The Arabidopsis Book*, 12, 1-25.
- Guarnaccia, V., Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., Perrone, G., y Polizzi, G. (2016). Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 963–976.
- Gutiérrez-Luna, F., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Reyes de la Cruz, H., y Macías-Rodríguez, L. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 51, 75–83.
- Hartill, W. F. T., y Everett, K. R. (2002). Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of 'Hass' avocado (*Persea Americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30, 249–260.
- Hause, B. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*, 130(3), 1213–1220.
- Hayashi, K. I. (2012). The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology*, 53, 965–975.

- Hernández-Calderón, E., Aviles-Garcia, M. E., Castulo-Rubio, D. Y., Macías-Rodríguez, L., Ramírez, V. M., Santoyo, G., López-Bucio, J., y Valencia-Cantero, E. (2018). Volatile compounds from beneficial or pathogenic bacteria differentially regulate root exudation, transcription of iron transporters, and defense signaling pathways in *Sorghum bicolor*. *Plant Molecular Biology*, 96, 291–304.
- Herrera, J., Pizzolitto, R., Zunino, M., Dambolena, J., y Zygadlo, J. (2015). Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 62, 74–80.
- Heyl, A., y Schmülling, T. (2003). Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 480–488.
- Huerta-Venegas, P. I. (2018). Participación del gen *MEDIADOR16* en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* al compuesto volátil fúngico 6-pentil-2H-piran-2-ona. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 80 pp.
- Hughes, D., y Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 111–120.
- Hung, R., Lee, S., y Bennett, J. W. (2015). Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 3395–3405.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., y Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6, 3901–7.
- Jensen, A. B., Raventos, D., y Mundy, J. (2002). Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 29, 595–606.
- Jiang, C.-J., Shimono, M., Sugano, S., Kojima, M., Liu, X., Inoue, H., Sakakibara H. y Takatsuji, H. 2013. Cytokinins act synergistically with salicylic acid to activate defense gene expression in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 287–96.

- Johnson, I., Mea, A. J., y Cooke, A. W. (1992). Endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*, 120, 225–234.
- Kakimoto, T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, 116, 233–239.
- Kaliterna, J., Miličević, T., y Cvjetković, B. (2012). Grapevine trunk diseases associated with fungi from the Diaporthaceae family in Croatian vineyards. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63, 471-479.
- Kanchiswamy, C., Malnoy, M., y Maffei, M. (2015). Bioprospecting bacterial and fungal volátiles for sustainable agricultura. *Trends in Plant Science*, 20, 206-211.
- Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., y Martinoia, E. (2017). Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends in Plant Science*, 1-7.
- Kazan, K., y Lyons, R. (2014). Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell*, 26, 2285-2309.
- Kinoshita, T., y Seki, M. (2014). Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant and Cell Physiology*, 55, 1859–1863.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., y Takabayashi, J. (2007). Volatile 1-octen-3-ol induces a defensive response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 35–37.
- Kohli, M., Galati, V., Boudier, K., Roberson, R. W., y Philippsen, P. (2008). Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips. *Journal of Cell Science*, 121, 3878–3889.
- Kong, X., Zhang, L., y Ding, Z. (2016). 26S Proteasome: Hunter and prey in auxin signaling. *Trends in Plant Science*, 21, 546–548.
- Lam, E., Kato, N., y Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411, 848-583.
- Landa-Zavaleta, L. M. (2011). Escrutinio para la obtención de hongos productores de celulasas. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 98 pp.

- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry*, 661, 23-67.
- Le Floch, G., Rey, P., Benizri, E., Benhamou, N., y Tirilly, Y. (2003). Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant Soil*, 257, 459–470.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., y Bennett, J. (2016). Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3, 1-7.
- Li, N., Alfiky, A., Vaughan, M., y Kang, S. (2016). Stop and smell the fungi: fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. *Fungal Biology Reviews*, 30, 134–144.
- Libault, M., Brechenmacher, L., Cheng, J., Xu, D., y Stacey, G. (2010). Root hair systems biology. *Trends in Plant Science*, 15, 641–650.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943–950.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., y Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinions in Plant Biology*, 6, 280–287.
- López-Bucio, J., Pelagio-Flores, R., y Herrera-Estrella, A. (2015). *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae*, 196, 109–123.
- López-Ráez, J. A., Shirasu, K., y Foo, E. (2017). Strigolactones in plant interactions with beneficial and detrimental organisms: The Yin and Yang. *Trends in Plant Science*, 22, 527–537.
- Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., y Beltrán-Peña, E. (2015). El transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal. *Ciencia Nicolaita*, 64, 22–41.
- Maillet, F., Poinso, V., André, O., Puech-Pagés, V., Haouy, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Martinez, E. A., Driguez, H.,

- Bécard, G., y Dénarié, J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469, 58–64.
- Malamy, J. E., y Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33–44.
- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M. J., Pozo, M. J., Ton, J., van Dam, N. M., y Conrath, U. (2016). Reconizing plant defense priming. *Trends in Plant Science*, 21, 818-822.
- Mattei, A. S., Severo, C. B., Guazzelli, L. S., Oliveira, F. M., Gené, J., Guarro, J., Cano, J., y Severo, L. C. (2013). Cutaneous infection by *Diaporthe phaseolorum* in Brazil. *Medical Mycology*, 2, 85–87.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., y Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptative part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 485-512.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389).
- Michniewicz, M., y Brewer, P. B. (2007). Polar Auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book*, 1–28.
- Minerdi, D., Bossi, S., Gullino, M., y Garibaldi, A. (2009). Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. *Environmental Microbiology*, 11, 844–854.
- Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M., Gullino, M., y Garibaldi, A. (2011). *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 342–351.
- Mitchell, A., Strobel, G., Moore, E., Robison, R., y Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 156, 270–277.
- Müller, B., y Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453, 1094–1097.

- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Narasimhan, M. L., Damsz, B., Coca, M. A., Ibeas, J. I., Yun, D. J., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., y Bressan, R. A. (2001). A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Molecular Cell*, 8, 921-930.
- Oláh, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarié, J., y Gough, C. (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant Journal*, 44, 195–207.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., y López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 701–712.
- Ortíz-Castro R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., y López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 364–378.
- Ottenschlager, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R. P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., y Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 2987–2991.
- Patkar, R. N., y Naqvi, N. I. (2017). Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS Pathogens*, 13, e1006334.
- Paul, D., y Park, K. (2013). Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors*, 13, 13969–13977.
- Pečenková, T., Janda, M., Ortmannová, J., Hajná, V., Stehlíková, Z., y Žárský, V. (2017). Early *Arabidopsis* root hair growth stimulation by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Annals of botany*, 120, 437–446.
- Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J. y Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early

- trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phyto-stimulation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1-13.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., y Bennett, M. J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14, 399–408.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P., y Macías-Rodríguez, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 1-13.
- Perilli, S., Moubayidin, L., y Sabatini, S. (2010). The molecular basis of cytokinin function. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 21–26.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., y Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375.
- Pioli, R. N., Morandi, E. N., Martínez, M. C., Lucca, F., Tozzini, A., Bisaro, V., y Hopp, H. E. (2003). Morphologic, molecular, and pathogenic characterization of *Diaporthe phaseolorum* variability in the core soybean-producing area of Argentina. *Phytopathology*, 93, 136–46.
- Prusky, D., Barad, S., Ment, D., y Bi, F. (2016). The pH modulation by fungal secreted molecules: a mechanism affecting pathogenicity by postharvest pathogens. *Israel Journal of Plant Science*, 63, 22–30.
- Radhika, V., Ueda, N., Tsuboi, Y., Kojima, M., Kikuchi, J., Kudo, T., y Sakakibara, H. (2015). Methylated cytokinins from the phytopathogen *Rhodococcus fascians* mimic plant hormone activity. *Plant Physiology*, 169, 1118–1126.
- Raya-González, J., Velázquez-Becerra, C., Barrera-Ortíz, S., López-Bucio, J., y Valencia-Cantero, E. (2017). *N,N*-dimethyl hexadecylamine and related amines regulate root morphogenesis via jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 254, 1399–1410.

- Ren, C. G., y Dai, C. C. (2012). Jasmonic acid is involved in the signaling pathway for fungal endophyte-induced volatile oil accumulation of *Atractylodes lancea* plantlets. *BMC Plant Biology*, 12, 128.
- Robert, H. S., y Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*, 5, 325–332.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., y Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317-343.
- Rowan, D. (2011). Volatile metabolites. *Metabolites*, 1, 41–63.
- Ruiz-Herrera, L. F., Shane, M. W., y López-Bucio, J. (2015). Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, 4, 431–443.
- Ruzicka, K., Simaskova, M., Duclercq, J., Petrasek, J., Zazimalova, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. C. E., y Benkova, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America*, 106, 4284–4289.
- Sánchez-López, Á. M., Baslam, M., De Diego, N., Muñoz, F. J., Bahaji, A., Almagro, G., Ricarte-Bermejo, A., García-Gómez, P., Li, J., Humplík, J. F., Novák, O., Spíchal, L., Dolezál, K., Baroja-Fernández, E., y Pozueta-Romero, J. (2016). Volatile compounds emitted by diverse phytopathogenic microorganisms promote plant growth and flowering through cytokinin action. *Plant Cell and Environment*, 39, 2592–2608.
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., y Silva-Rojas, H. V. (2013). Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia*, 47, 61–73.
- Santino, A., Taurino, M., De Domenico, S., Bonsegna, S., Poltronieri, P., Pastor, V., y Flors, V. (2013). Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32, 1085–1098.
- Schalchli, H., Tortella, G., Rubilar, O., Parra, L., Hormazabal, E., y Quiroz, A. (2014). Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenica

- microorganisms in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, Early Online, 1-9.
- Schaller, G. E., Bishopp, A., y Kieber, J. J. (2015). The Yin-Yang of hormones : cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27, 44–63.
- Scheres, B., Benfey, P., y Dolan, L. (2002). Root development. *The Arabidopsis Book*. 1-18.
- Schmidt, R., de Jager, V., Zühlke, D., Wolff, C., Bernhardt, J., Cankar, K., Beekwilder, J., van Ijcken, W., Sleutels, F., Boer, W., Riedel, K., y Garbeva, P. (2017). Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. *Scientific Reports*, 7, 1-14.
- Shavrukov, Y., y Hirai, Y. (2016). Good and bad protons: Genetic aspects of acidity stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 67, 15–30.
- Shenoy, B. D., Jeewon, R., y Hyde, K. D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*, 26, 1–54.
- Silveira, N. S. S., Mariano, R. L. R., Michereff, S. J., Maia, L. C., y Oliveira, S. M. A. (2001). Hongos fitopatógenos asociados a frutos comercializados en Recife, Pernambuco (Brasil). *Boletín Micológico*, 16, 41–47.
- Singh, S., Strobel, G., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., y Ezra, D. (2011). An endophytic *Phomopsis* sp. possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microbial Ecology*, 61, 729–739.
- Spallek, T., Gan, P., Kadota, Y., y Shirasu, K. (2018). Same tune, different song — cytokinins as virulence factors in plant–pathogen interactions?. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 82–87.
- Splivallo, R., Novero, M., Berteza, C., Bossi, S., y Bonfante, P. (2007). Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 175, 417–424.
- Splivallo, R., Ottonello, S., Mello, A., y Karlovsky, P. (2011). Truffle volatiles: From chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189, 688–699.
- Strader, L. C., y Zhao, Y. (2016). Auxin perception and downstream events. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 8–14.

- Sun, X., Bonfante, P., y Tang, M. (2015). Effect of volatiles versus exudates released by germinating spores of *Gigaspora margarita* on lateral root formation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97, 1–10.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., y Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 117–126.
- Twizeyimana, M., Forster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E., y Eskalen, A. (2013). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*, 97, 1580–1584.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G. T. S., y Bennett, M. J. (2012). Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends in Plant Science*, 17, 326–331.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., y Gubler, W. D. (2013). Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, 97, 1571–1579.
- Vernoux, T., y Robert, S. (2017). Auxin 2016: a burst of auxin in the warm south of China. *Development*, 144, 533–540.
- Vespermann, A., Kai, M., y Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5639–5641.
- Vita, F., Taiti, C., Pompeiano, A., Bazihizina, N., Lucarotti, V., Mancuso, S., y Alpi, A. (2015). Volatile organic compounds in truffle (*Tuber magnatum* Pico): comparison of samples from different regions of Italy and from different seasons. *Scientific Reports*, 5, 12629:1-14.
- Wang, J., Zhang, Y., Jin, J., Li, Q., Zhao, C., Nan, W., Wang, X., Ma, R., y Bi, Y. (2018). An intact cytokinin-signaling pathway is required for *Bacillus* sp. LZR216-promoted plant growth and root system architecture alteration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 84, 507–518.

- Wasternack, C., y Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111, 1021–1058.
- Wasternack, C., y Strnad, M. (2016). Jasmonate signaling in plant stress responses and development– active and inactive compounds. *New Biotechnology*, 33, 604–613.
- Weijers, D., y Wagner, D. (2016). Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 21.1-21.36.
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., Sugimoto, K., Koncz, C., Doerner, P., Umeda, M., y Schnittger, A. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*, 35, 2068–2086.
- Werner, S., Polle, A., y Brinkmann, N. (2016). Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 8651–8665.
- Willingham, S. L., Pegg, K. G., Cooke, A. W., Coates, L. M., Langdon, P. W. B., y Dean, J. R. (2001). Rootstock influences postharvest anthracnose development in “Hass” avocado. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52, 1017–1022.
- Yang, B. J., Han, X. X., Yin, L. L., Xin, M. Q., Xu, Z. H., y Xue, H. W. (2016). *Arabidopsis* PROTEASOME REGULATOR1 is required for auxin-mediated suppression of proteasome activity and regulates auxin signalling. *Nature Communications*, 7, 1–9.
- Yu, J.-H., y Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 437–458.
- Zeilinger, S., Gupta, V. K., Dahms, T. E. S., Silva, R. N., Singh, H. B., Upadhyay, R. S., Vieira-Gomes, E., Tsui, C. K., y Nayak, C. (2016). Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 182–207.

- Zhang, F., Yang, X., Ran, W., y Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS Microbiology Letters*, 359, 116–123.
- Zhao, L., Yang, X., Li, X., Mu, W., y Liu, F. (2011). Antifungal, insecticidal and herbicidal properties of volatile components from *Paenibacillus polymyxa* strain BMP-11. *Agricultural Sciences in China*, 10, 728–736.

### **Fuentes de Internet**

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=13187, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13187> (Consultado 24 de octubre de 2018).

## 11. Apéndice

### Publicaciones generadas durante la realización del presente trabajo:

1. **Mendoza-Vázquez, M. A.**, Espinoza-Madrigal, R. M., Flores-García, A., Muñoz-Parra, E., Huerta-Venegas, P. I., Ruiz-Herrera, L. F., Martínez-Pacheco, M. M., y López-Bucio, J. (En revisión). Growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedlings in interaction with fungi isolated from stem-end rot of avocado fruits. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*.
2. **Mendoza-Vázquez, M. A.**, Martínez-Pacheco, M. M., y López-Bucio, J. (2017). Funciones biológicas de los compuestos orgánicos volátiles de hongos. *Biológicas*, 19, 14-21.

### Participación en congresos:

1. **Mendoza-Vázquez, M. A.**, Espinoza-Madrigal, R. M., Muñoz Parra, E., López Bucio, J., y Martínez Pacheco, M. M. (2017). Efecto de compuestos volátiles fúngicos en la estimulación del crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. (Cartel). 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelia, Michoacán, México.
2. **Mendoza-Vázquez, M. A.**, Espinoza-Madrigal, R. M., Muñoz Parra, E., López Bucio, J., y Martínez Pacheco, M. M. (2017). Efecto de los compuestos volátiles de hongos relacionados con la pudrición del pedúnculo del aguacate en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (Ponencia). 12<sup>vo</sup> Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.
3. **Mendoza-Vázquez, M. A.**, Espinoza-Madrigal, R. M., Muñoz Parra, E., López Bucio, J., y Martínez Pacheco, M. M. (2018). Efecto de la interacción con hongos aislados del fruto de aguacate con pudrición peduncular sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (Ponencia) 13<sup>vo</sup> Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. Morelia, Michoacán, México.