

UCH-FC
Biotecnología
A446
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

Análisis fenotípico y molecular de los efectos estimulantes provocados por cepas nativas de *Trichoderma* sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular por

Romina Luz Catalina Almasia Croce

Director de Seminario de Título: Dr. Michael Handford
Co-director de Seminario de Título: Dra. Margarita Carú

Enero, 2013

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Romina Luz Catalina Almasia Croce**

“Análisis fenotípico y molecular de los efectos estimulantes provocados por cepas nativas de *Trichoderma* sobre plántulas de *Arabidopsis thaliana*.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Michael Handford
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Michael Handford.

Dra. Margarita Carú
Co-Directora

Firma manuscrita en azul de Margarita Carú.

Comisión de Evaluación

Dra. Rosalba Lagos
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Rosalba Lagos.

Dra. Lorena Norambuena
Evaluadora

Firma manuscrita en azul de Lorena Norambuena.



Santiago de Chile, Enero de 2013

Biografía



Una primaveral tarde del 30 de septiembre de 1987, me cortaron el cordoncito y me dieron las palmaditas necesarias para comenzar a caminar por este mundo. A los pocos meses nos trasladamos con mis padres, Alal Almasia y María de la Luz Croce y mi Hermano Emiliano, a la tierra natal de mi papa, la hermosa Argentina. Crecí en Buenos Aires, rodeada de amigos que conocía desde el jardín y con quienes compartí mi educación básica en el colegio Mariano Acha. Como siempre una hija muy regalona y desafiada continuamente por las locuras existencialistas y filosóficas de mi hermano mayor. Al comenzar la enseñanza media por cosas de la vida me vine a vivir a Chile, a un colegio de niñas muy particular, el Liceo 7 de niñas de Providencia. Periodo en el que nació mi amor por los viajes, tuve la suerte de conocer Inglaterra y Grecia. Al terminar el colegio, no sabía qué hacer con mi vida entonces comencé dos hermosos años de Bachillerato, donde hice grandes amigos que aún me acompañan. Luego, sin estar muy convencida pero consciente de mi interés por la ciencia y sus aplicaciones comencé Ing. en Biotecnología Molecular. En la facultad viví muchas experiencias de alegría y angustias, pero más allá de todo conocí gente maravillosa. Pero también durante ese periodo me las ingenie como pude para poder conocer y no solo crecer en lo académico sino también en el mundo, para lo cual viaje y trabaje en programas de "Working Holiday" a EE.UU y Nueva Zelanda. Experiencias únicas y que repetiría mil veces. Con esta tesis se cierra un ciclo, pero también se abren nuevos caminos que traerán nuevos desafíos y alegrías.

Dedicada a mi padre que fue una razón para comenzar y terminar este proceso...

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este gran paso, quiero agradecer a todos aquellos que me acompañaron en este proceso.

Comenzando por mi madre que siempre ha estado a mi lado y por mostrarme que aunque todo este mal tenemos que tener una sonrisa en la cara. A mi padre que me inculco las ganas de investigar y que me dio las fuerzas para continuar con esta tesis.

También a los papas que me regalo la vida, mis tíos (Ceci, Ali, Max y Oscar). Que me han apoyado siempre y acompañado en todos los pasitos que he dado. Además de enseñarme el enorme valor que tiene la familia.

A mi loco hermano que aunque a la distancia siempre está presente y adoro con todo mi corazón.

A mis amigos de "Bachi", "Biotec" y amigos de la vida que acompañaron y alegraron este camino y muchos momentos.

Al Profe Mike, por su enorme paciencia y conocimientos que fueron esenciales en todo el desarrollo de esta tesis. A mis compañeros de laboratorio porque son un grupo excepcional, gracias por su ayuda, compañía, generosidad y momentos lindos.

Al Seba y a la Ange por su buena disposición siempre.

A la profe Carú, sus alumnos y Juanita por dejarme usar su laboratorio, la buena onda y ayuda.

A la profe Inma y sus alumnos porque me acogieron en su laboratorio y enseñaron muchas cosas con la mejor disposición.

A Biopacific y Gabriel por creer en mí y apoyar el desarrollo de mi tesis.

... y a todos lo que han estado presentes y ausentes porque si no fuera por ustedes no habría conseguido todo esto...

ÍNDICE DE CONTENIDO

BIOGRAFÍA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO	V
ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
Agricultura en Chile y el mundo	1
Trabajando en equipo con especies nativas	2
Interacción de <i>Trichoderma</i> con las plantas	3
Habilidad de promover el crecimiento de plantas.....	4
Análisis de compuestos indólicos.....	6
Las auxinas y la selección de marcadores en plantas.....	7
HIPÓTESIS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1.- Cepas	12
2.- Obtención y cultivo de aislados monoespóricos.....	13
3.- Cultivos fúngicos líquidos de cepas de <i>Trichoderma</i>	14
4.- Material vegetal y condiciones de crecimiento	14
5.- Experimentos de inoculación	15
5.1.- Inoculación de Hongos <i>Trichoderma</i>	15
5.2.- Inoculación de diferentes concentraciones de IAA	15
5.3.- Inoculación de cultivos fúngicos filtrados.....	16
6.- Análisis fenotípico.....	16
7.- Crecimiento de hongos y análisis de los compuestos indólicos.....	16
7.1.- Cultivo líquido de hongos	16
7.2.- Análisis de compuestos indólicos	17
8.- Análisis de los cambios de expresión génica de los genes <i>Attir1</i> , <i>Atpla2</i> y <i>AtcycB1;1</i> mediante qRT-PCR.....	18

9.- Análisis de datos.....	22
RESULTADOS.....	23
Objetivo 1:.....	23
Obtención y cultivo de aislados monoespóricos a partir de aislados purificados de cepas nativas de <i>Trichoderma</i>	23
Objetivo 2:.....	23
Cepas del género <i>Trichoderma</i> promueven el crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i>	23
Los sobrenadantes de cultivos fúngicos de las cepas TP y T7 crecidas en cultivo líquido contiene compuestos indólicos.....	32
3.1.- Evaluación por espectrofotometría de compuestos indólicos.....	33
3.2.- Evaluación por TLC de compuestos indólicos.....	34
3.3.- Evaluación <i>in vivo</i> de compuestos indólicos.....	38
Objetivo 4:.....	42
Análisis por qRT-PCR de los cambios en la expresión génica de <i>Attir1</i> , <i>Atp1a2</i> y <i>AtcycB1;1</i> en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> interactuando con <i>Trichoderma</i>	42
DISCUSIÓN.....	47
Cualidades de la diversidad microbiológica nacional.....	47
Obtención de cultivos puros de esporas <i>Trichoderma</i>	47
Cualidades simbióticas entre <i>A. thaliana</i> y <i>Trichoderma</i>	47
Compuestos secretados al medio por el hongo.....	51
Genes involucrados en la interacción simbiote.....	56
CONCLUSIONES.....	63
PROYECCIONES.....	63
CONGRESOS.....	66
PROYECTOS ASOCIADOS.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS.....	70
ANEXO 1: ALINEAMIENTO.....	70
ANEXO 2: MEDIOS DE CULTIVO.....	71

ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS

<i>Tabla 1. Detalle del origen, fuente y lugar de recolección de las muestras obtenidas.</i>	<i>12</i>
<i>Tabla 2. Partidores diseñados para los genes involucrados en la proliferación de raíces laterales en Arabidopsis thaliana.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Valores de movilidad relativa de cada mancha observada en las placas de TLC con muestras provenientes del sobrenadante de cultivos de TP y T7 que no fueron suplementados con triptófano</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 4. Valores de movilidad relativa de las bandas tras separar por TLC muestras provenientes de sobrenadante de cultivos fúngicos suplementados con triptófano (100 y 200 mg/L) para las cepas TP y T7.....</i>	<i>38</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Crecimiento de cultivos monoespóricos en placas con medio PDA</i>	24
<i>Figura 2. Crecimiento de plántulas de Arabidopsis thaliana en presencia de cepas nativas de Trichoderma inoculadas con una suspensión de 10⁷ esporas/ml</i>	26
<i>Figura 3. Largo de raíz principal de plántulas de Arabidopsis thaliana en presencia de cepas nativas de Trichoderma inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml</i>	27
<i>Figura 4. Número de raíces laterales por planta de Arabidopsis thaliana en presencia de cepas nativas de Trichoderma inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml</i>	28
<i>Figura 5. Densidad de raíces laterales de plántulas de Arabidopsis thaliana en presencia de cepas nativas de Trichoderma inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml</i>	29
<i>Figura 6. Peso húmedo de plántulas de Arabidopsis thaliana en presencia de cepas nativas de Trichoderma inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml</i>	30
<i>Figura 7. Análisis de un grupo de 21 taxas de hongos basado en espaciadores de transcripción interna (ITS)</i>	32
<i>Figura 8. Efecto de triptófano en la producción de compuestos indólicos por cepas de Trichoderma. Cepas TP y T7 fueron cultivados en cultivos líquidos MS suplementado con triptófano 200 mg/L (+) y no suplementando (-)</i>	34
<i>Figura 9. Determinación del límite de detección del compuesto ácido índole acético (IAA) en placas de cromatografía de capa fina (TLC) revelada con reactivo de Salkowski</i>	35
<i>Figura 10. Separación por TLC de muestras provenientes de sobrenadante de cultivos fúngicos suplementados con 100 mg/L (100 Trp) y 200 mg/L (200 Trp) de triptófano para las cepas TP y T7</i>	37
<i>Figura 11. Efectos de IAA en el crecimiento de Arabidopsis</i>	39
<i>Figura 12. Fotografía de A. thaliana en placa crecida con alícuotas de diferentes concentraciones de IAA</i>	40
<i>Figura 13. Fotografías de plántulas de A. thaliana en placa crecidas con filtrados fúngicos</i>	41
<i>Figura 14. Efectos de los sobrenadantes filtrados provenientes de los cultivos fúngicos líquidos sobre el crecimiento de Arabidopsis</i>	42
<i>Figura 15. Análisis de expresión relativa de tres genes vegetales en la interacción entre plántulas de A. thaliana inoculadas con diferentes tratamientos de hongo Trichoderma</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC:	Ácido 1-aminociclopropane-1-carboxylic (Precursor del Etileno)
DEPC:	Dietilpirocarbonato (inhibidor RNAsas)
DR5:	Promotor con elementos de respuesta a auxina sintético
GC-MS:	Cromatografía de gas- espectrometría de masa
GUS:	Sistema reportero basado en la enzima β -glucuronidasa.
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento o presión (High-performance liquid chromatography, a veces denominada high-pressure liquid chromatography)
IAA:	Ácido indol-3-acético
IAAId:	Ácido indol-3-acetaldehído
IEt:	Ácido indol-3-etanol
ISR:	Resistencia sistémica inducida
PDA:	Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar)
SAR:	Resistencia sistémica adquirida
SCAR	Sequence characterized amplified regions
Trp:	Triptófano

RESUMEN

A nivel mundial, existe una fuerte tendencia hacia la producción orgánica de los alimentos para la cual es necesario generar insumos que sean adecuados para dichos cultivos. En este seminario se investigaron los efectos beneficiosos que están presentes en microorganismos nativos, con el fin de generar productos ecológicos hechos a la medida del suelo chileno.

A partir de un conjunto de cepas de diferentes especies fúngicas pertenecientes al género *Trichoderma*, prospectadas en el Sur y Patagonia chilena, se aisló y obtuvo cultivos monoespóricos. Se evaluaron en cultivos axénicos junto con plántulas de *Arabidopsis thaliana* para determinar cuáles poseían efectos bioestimulantes. Se observaron variaciones en el crecimiento vegetal, por un lado asociados a un efecto bioestimulante positivo como un mayor número de raíces laterales, en las cepas *T. harzianum* (TH, TF y T6), *T. citrinoviride* (TP), *T. neozelandeae* (T1a) y *T. atroviride* (TC). Mientras que por otro lado, se observó un crecimiento vegetal negativo asociado a un menor número de raíces laterales presente en T7 (*T. harzianum*) y T9 (*T. atroviride*). Interesantemente, ambos efectos no eran propios de una especie en particular, sino que era un comportamiento presente en diferentes cepas de variadas especies. Tras este análisis preliminar, se escogió la cepa TP, que presentó efectos positivos estimulantes en 2 de las 3 concentraciones probadas (10^6 y 10^7 esporas/ml), y la cepa T7 que no mostró efectos bioestimulantes en ningún caso. Se evaluó en estas cepas, la presencia de compuestos indólicos en los filtrados de cultivos líquidos mediante dos metodologías, una cualitativa utilizando placas de sílice y otra cuantitativa utilizando espectrofotometría. De esto último se pudo determinar que la producción y concentración de compuestos indólicos es dependiente del medio de

cultivo e inductores utilizados para crecer el hongo, así como también de la especie del hongo. Se evaluó preliminarmente, los efectos provocados por los filtrados de los cultivos líquidos de la cepa TP sobre plántulas de *A. thaliana*, demostrándose que el diseño experimental es un sistema útil para entregar información relevante sobre las capacidades de cepas de *Trichoderma* de provocar efectos en el crecimiento de la planta.

Finalmente, producto de la interacción planta-hongo se evaluaron los cambios en la expresión génica de tres genes relacionados con diferentes respuestas asociadas al crecimiento de raíces laterales (*Attir1*, *Atpla2* y *AtcycB1;1*) mediante qRT-PCR en raíces de *A. thaliana*, observándose que la cepa TP a 10^6 esporas/ml es capaz de estimular la transcripción de *Attir1* a un nivel mayor que los otros tratamientos (TP a 10^5 esporas/ml y T7 a 10^6 esporas/ml), que se traduce en un aumento en la transcripción del gen *Atpla2* que se encuentra río abajo de *Attir1*. El gen *AtcycB1;1* cuya expresión es posterior a la expresión de *Attir1*, no presentó cambios significativos para los tratamientos con las cepas TP, pero sí para la cepa T7. Los resultados muestran que existen cambios en la expresión de genes relacionados con diversos procesos asociados al desarrollo de raíces laterales, cambios que dependen de la cepa utilizada.

Con la metodología utilizada en este seminario, fue posible discriminar capacidades bioestimulantes a nivel fenotípico como molecular entre cepas. Dicha investigación permitió resaltar características beneficiosas presentes en microorganismos nativos, que podrían ser útiles en el futuro para el desarrollo de la agricultura orgánica. Además, es una metodología que puede ser reproducida y utilizada para rescatar microorganismos benéficos presentes en diferentes suelos.

ABSTRACT

Globally, there is a strong trend towards organic agriculture, for which it is necessary to generate products that are suitable for such crops. In this seminar, the beneficial effects that are present in native microorganisms were investigated in order to generate organic products tailored to Chilean soils.

A set of strains from different fungal species belonging to the genus *Trichoderma*, originating from South and Patagonian Chile, was isolated and obtained monospore cultures. All were evaluated with seedlings of *Arabidopsis thaliana* in order to determine those which possessed bio-stimulant effects. Variations were observed in plant growth associated with beneficial bio-stimulant effects such as a greater number of lateral roots in *T. harzianum* (strains TH, TF, and T6), *T. citrinoviride* (TP), *T. neozelandeae* (T1a) and *T. atroviride* (TC). While on the other hand, showed a negative plant growth associated with fewer lateral roots present in T7 (*T. harzianum*) and T9 (*T. atroviride*). Interestingly, both effects were not specific to a particular species, but rather was present in different strains belonging to different species. After this preliminary analysis, strain TP was selected, which showed a stimulating effect at 2 of the 3 concentrations tested (10^6 and 10^7 spores/ml), whilst strain T7, which showed no bio-stimulant effect in any manner. The presence of indolic compounds in liquid culture filtrates of these two strains was analyzed by two methods, one qualitative using silica plates and the other quantitative using spectrophotometry. From that experience, it was determined that the production and concentration of indolic compounds is dependent on the culture medium used to grow and induce the fungus as well as the characteristics of the fungus inoculum. Preliminarily, the effects caused by the liquid filtered cultures of strain TP on seedlings of *A. thaliana* was evaluated, demonstrating that the experimental design is a

useful system to deliver relevant information about the capabilities of *Trichoderma* strains to cause effects on plant growth.

Finally, the molecular consequences of the plant-fungus interaction was assessed by monitoring the expression of three genes related to different responses associated with the growth of lateral roots (*Attir1*, *Atpla2* and *AtcycB1;1*) in roots of *A. thaliana* by qRT-PCR. Strain TP at 10^6 spores/ml was able to stimulate transcription of *Attir1* to a higher level than the other treatments (TP at 10^5 spores/ml and T7 at 10^6 spores/ml), which translated into an increase in transcription of the gene *Atpla2* which is downstream of *Attir1*. The gene *AtcycB1;1* whose expression is later than the expression of *Attir1*, did not change significantly in the treatments with strain TP, but did for strain T7. The results show that there are changes in the expression of genes related to various processes associated with lateral root development, changes that depend on the strain used.

With the methodology used in this seminar, it was possible to discriminate bio-stimulant capabilities at the phenotypic and molecular level between strains. This investigation allowed us to highlight the beneficial features present in native microorganisms that could be useful in the future development of organic agriculture. It is also a methodology that can be reproduced and used to rescue other beneficial microorganisms present in different soils.

INTRODUCCIÓN

Agricultura en Chile y el mundo

En los últimos años, la población mundial ha ido tomando consciencia sobre los efectos negativos asociados al uso excesivo de agroquímicos. Este abuso se ve reflejado en la progresiva contaminación de los cuerpos de agua adyacentes a los cultivos, a lo que se le suma el rápido agotamiento de las tierras asociado a la pérdida de fertilidad, que conducen a un detrimento en la salud de los ecosistemas (Proyecto Life Sinergia).

El uso excesivo de agroquímicos genera dependencia, ya que conduce al agotamiento de los nutrientes del suelo y pérdida de la microbiota nativa, generando un círculo vicioso que culmina en tierras inservibles y agricultores sin trabajo. Por lo tanto, se hace necesario desarrollar la investigación y fomentar nuevas tecnologías ecológicamente amigables, que sean aceptadas por la normativa orgánica.

A nivel mundial, existe una fuerte tendencia hacia la producción orgánica de los alimentos, producción que se está expandiendo a razón de US\$ 2,4 mil millones al año, concentrando la gran mayoría (96%) de las ventas en dos regiones, Estados Unidos y la Unión Europea (The World of Organic Agriculture Statistics & Emerging Trends, 2006). Con ello, aparece la creciente necesidad de insumos adecuados para dichos cultivos. Actualmente, mercados influyentes como Francia, han fijado normas y tendencias de producción limpia y sustentable, como una forma de establecer parámetros claros que respalden los productos orgánicos comercializados, que debería estimular la investigación y comercialización de ellos.

Chile se propuso para la próxima década, convertirse en una potencia agroalimentaria de nivel mundial (BCN, 2007), pero para ello es necesario abrirse a las demandas

internacionales y revertir prácticas actualmente utilizadas, por ejemplo, la importación anual de cerca de 1,1 millones de toneladas de fertilizantes químicos (ODEPA-Fertilizantes en Chile, 2009).

Actualmente, el mercado de la agricultura orgánica nacional está creciendo. Para el periodo 2009-2010, la superficie orgánica total certificada alcanzó las 151.097 hectáreas, destacándose el aumento en la superficie de cultivo de la uva vitivinífera en un 31% (Prochile). Esto último resulta interesante porque Chile se ha convertido en un oferente importante para el resto del mundo en la producción frutícola y vitivinícola. Esto se debe a sus condiciones climáticas, geográficas y ecológicas que dificultan el acceso a plagas en comparación con otros países de la región. Además, Chile posee un clima y posición geográfica estratégica que permite ofrecer productos en el hemisferio norte en contra temporada (Prochile, <http://www.prochile.cl/importadores/es/oferta-exportable/agricola/organicos.php>).

Trabajando en equipo con especies nativas

En este seminario de título, se propuso como desafío aportar a este desarrollo mediante la investigación. Para ello, se investigaron los efectos beneficiosos que están presentes en microorganismos nativos, que podrían ser útiles en el futuro para el desarrollo de la agricultura, con el fin de generar productos ecológicos hechos a la medida del suelo chileno. Como propuesta principal, se planteó determinar si las especies fúngicas pertenecientes al género *Trichoderma*, que habían sido prospectadas en el Sur y Patagonia chilena (Castillo. P., 2009) poseían efectos bioestimulantes, para luego iniciar estudios sobre los mecanismos moleculares que regulan dicho efecto.

El género *Trichoderma* está constituido por hongos en su forma imperfecta o anamorfa, pero se ha asociado a este mismo el teleomórfo *Hypocrea* (Hoyos-Carvajal. L y col., 2009). Este género es reconocido por su habilidad de actuar como agente biocontrolador contra los patógenos de las plantas. Dentro de sus principales mecanismos se incluyen: actividad micoparasitaria, creciendo directamente sobre la presa, fijándola y envolviéndola como una trampa; actividad antibiótica, mediante la producción de una amplia variedad de enzimas extracelulares antifúngicas; y su eficiente capacidad de competir por los nutrientes y el espacio (Harman, 2006). Por otro lado, este género fúngico es considerado como oportunista, está presente en una amplia variedad de ecosistemas (Harman, 2006) y es capaz de interactuar tanto con micro como macroorganismos.

Interacción de *Trichoderma* con las plantas

Uno de los macroorganismos con los que este género fúngico interactúa, son las plantas a nivel radicular y foliar. El crecimiento de las plantas es afectado por una amplia variedad de factores entre los que se incluyen luz, temperatura y nutrientes, pero también por microorganismos que viven asociados a la rizosfera, que son atraídos por los productos de fotosíntesis que se liberan a través de las raíces como la sacarosa (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009) y el triptófano (Lugtenberg. B. y Kamilova. F., 2009), así como también por la presencia de hongos presa como las micorrizas (Druzhinina. I. y col., 2011).

Algunas cepas de este género fúngico han sido descritas como rizosfera competente, por su asociación infecciosa asintomática en las raíces al colonizar las regiones corticales externas. Esta interacción íntima con la planta promueve una serie de beneficios de gran importancia, tales como a) el aumento de la resistencia a varios

tipos de estrés bióticos y abióticos mediante la resistencia sistémica inducida (ISR) y adquirida (SAR), b) potencia el uso eficiente de nitrógeno al fomentar la reducción y asimilación de éste e c) incrementa la fertilidad de los suelos y promueve el crecimiento de raíces laterales, contenido de clorofila, área de la hoja y rendimiento (Gal-Hemed. I. y col., 2011). Con respecto a este último punto, se ha observado en plantas de maíz (*Zea mays*), que al inocular con determinadas especies de *Trichoderma*, la arquitectura del sistema radicular es positivamente modulada hacia la formación de más raíces, observándose además un aumento en el rendimiento de la planta. Se propone que esta variación positiva se debe a que el sistema radicular provee de anclaje y fuente de nutrientes, por lo que un aumento en la superficie radicular contribuye con el aumento en la eficiencia de absorción de agua y nutrientes desde el suelo (Björkman et al., 1998 ; López-Bucio et al., 2005). Adicionalmente, hay un constante intercambio de productos metabólicos existente entre ambas especies que regulan y modulan la interacción simbiótica (Druzhinina. I. y col., 2011).

Habilidad de promover el crecimiento de plantas

La regulación entre ambos componentes simbiotes (planta-*Trichoderma*) se ha estudiado anteriormente. Comúnmente, se ha utilizado el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, debido a que es sencillo de cultivar y manipular física y genéticamente en el laboratorio, posee un corto tiempo entre generaciones (2 meses) y genera una gran cantidad de semillas por planta.

· En estudios desarrollados en la Universidad de Chile, se han identificado 14 cepas pertenecientes a 4 especies del género *Trichoderma*, las cuales han sido identificadas morfológicamente mediante cultivo y análisis confrontacionales (Castillo. P., 2009). Al

nivel molecular, se identificaron todas las cepas aisladas por Castillo (2009) mediante análisis de las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*) y de aquellas especies reconocidas como *T. harzianum* se generó un marcador molecular mediante la técnica de SCAR (Perez. G., 2010). Para esta última especie, se han identificado cepas nativas con efectos bioestimulantes y biocontroladores (Bionativa - <http://www.bionativa.cl/tec-publicaciones.html>), pero se desconocen los efectos presentes en cepas pertenecientes a otras especies rescatadas desde el suelo chileno.

Lo que se ha descrito en la literatura con respecto a algunas especies no nativas, es que ciertas cepas fúngicas de *Trichoderma* son capaces de activar genes específicos de las vías de defensa en *A. thaliana* como PR-1^a, PR-2, LOX-1, ATPCA, PDA3 y PDF1.2 tanto en raíces como en hojas (Salas-Marina. M. A. y col., 2011). Pero no solo modula la expresión de genes de resistencia, sino que también, se ha observado que determinadas especies de este género como *T. atroviride* y *T. virens* son capaces de producir fitohormonas tipo auxinas, elementos que son claves en la regulación del desarrollo vegetal. La producción de esta fitohormona en las especies anteriormente mencionadas se evaluó en cultivos líquidos con y sin precursores de la vía de los compuestos indólicos como triptófano, triptamina o triptofol, demostrándose que incluso en condiciones control, estas especies producen compuestos indólicos (Gravel. V. y col., 2007). Posteriormente, se demostró mediante un acucioso estudio en sobrenadantes fúngicos utilizando cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) que *T. virens* es capaz de producir compuestos tipo indólicos y que éstos correspondían específicamente a ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-acetaldehído (IAAld) y ácido indol-3-etanol (IET). Demostraron además, que dichos compuestos eran capaces de activar diferencialmente la expresión de genes

marcadores inducibles por auxinas en planta, mediante el promotor sintético sensible a auxina DR5 asociado a β -glucuronidasa (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009). Se ha descrito también que la habilidad de este género para promover el crecimiento de las plantas podría deberse a una disminución en los niveles de la hormona etileno, ya que posee el gen de una deaminasa de α -1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), una enzima clave en la degradación del precursor ACC de la vía de biosíntesis de etileno (Druzhinina. I. y col., 2011)

Análisis de compuestos indólicos

Para intentar determinar si estas especies nativas poseen la capacidad de producir compuestos indólicos que pudieran promover el crecimiento de plantas, fue necesario contar con técnicas que permitieran determinar la presencia e identidad de compuestos tipo auxinas en diferentes sustratos como sobrenadantes de cultivos fúngicos o bacteriales. Existen técnicas más precisas como Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o GC-MS, pero también es posible determinar la presencia de compuestos indólicos de forma sencilla, rápida y barata mediante técnicas químicas colorimétricas basadas en el reactivo de Salkowski. Este último método colorimétrico ha sido ampliamente utilizado para detectar con especificidad distintos compuestos indólicos (Ehmann. A., 1977). El análisis se puede llevar a cabo mediante espectrofotometría o en placas de sílice.

Los análisis en espectrofotómetro se realizan con el reactivo de Salkowski, el cual consiste en una mezcla de un ácido fuerte con una alta concentración de FeCl_3 , estos forman con los compuestos indólicos un complejo (indol)Fe(III) que presenta una coloración roja (Rahman. A. y col., 2010). Es posible distinguir entre triptófano, IAA y otros compuestos indólicos observándoles a diferentes longitudes de onda (Glickmann.

E. y Dessaux. Y., 1995). Esta última técnica ha sido evaluada en cultivos líquidos de cepas de *T. atroviride*, en donde se determinó que la especie era capaz de producir IAA y compuestos indólicos con y sin inductores de la vía de las auxinas (Gravel. V. y col., 2007).

Dado que la técnica anterior solo permite determinar la presencia de compuestos indólicos y no discrimina completamente entre ellos, es que se puede utilizar otra técnica que confirma la presencia de uno u otro compuesto indólico. Esta es la cromatografía de capa fina, que utiliza placas de sílice, y el reactivo de Vanurk que consiste en mezclar el reactivo de Salkowski con el reactivo de Ehrlich (Hassan. M. K. y Ahmed. H.A., 2008). En este último, se encuentra el componente paradimetilaminobenzaldehído (p-DMAB), el que en condiciones fuertemente ácidas y con la adición de FeCl₃ como catalizador, reacciona generando sustituciones en los anillos indólicos, que dependiendo del compuesto, entrega diferentes tonos en la región del rojo, violeta y azul (Ehmann. A., 1977; Eich. E., 2008).

Las auxinas y la selección de marcadores en plantas

Las auxinas son compuestos claves en la asociación simbiote entre el hongo y la planta. En plantas, las auxinas juegan un papel fundamental en la regulación del crecimiento, controlando desde la arquitectura radicular hasta la extensión del tallo. Al nivel radicular, se han generado mutantes relacionadas con auxina en *A. thaliana* que afectan la formación de raíces laterales en varios estados del desarrollo, lo que sugiere que dicha fitohormona es requerida para el desarrollo de las raíces laterales en diferentes etapas (Casimiro. I. y col., 2001). También es requerido IAA en *A. thaliana* inicialmente, debido a que las raíces laterales se originan exclusivamente en células fundadoras del periciclo localizadas en el polo opuesto del xilema producto de la

presencia de auxinas, para luego mediante sucesivas divisiones anticlinales crear una capa simple. Posteriormente, divisiones anticlinales y periclinales van formando los diferentes estados (I-VIII) (Malamy. J. y Benfey. P., 1997), siempre que las concentraciones de los compuestos sean precisas, ya que altas concentraciones (superiores a los 60 nM) inhiben el crecimiento de raíces laterales (Péret. B. y col., 2009).

En estudios previos se han analizado los efectos provocados por auxina exógena sobre plántulas de *A. thaliana*, observándose cambios importantes en procesos celulares (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009). Experimentos analizados mediante microarreglos revelan que aproximadamente 80 genes son sustancialmente encendidos en las raíces en las primeras 12 horas post tratamiento. Dentro de ellos, se incluyen genes típicos de respuesta a auxina como la quinona reductasa *FQR1* y los represores de la transcripción dependiente de auxina de la familia *IAA/AUX*. También aumenta la expresión de genes cuyos productos proteicos modifican la pared celular, actuando secuencialmente primero una pectinmetilesterasa (*AtPME*), luego poligalacturonasa (*AtPG*) y finalmente pectatoliasa (*AtPLA*) que en conjunto digieren los polímeros de pectina. La acción de esta última enzima ha sido asociada al programa de activación de genes necesarios que conducen a la formación de raíces laterales, por lo que variaciones en la expresión de esta enzima se asocia a la aparición de raíces laterales (Laskowski. M. y col., 2006). Es por ello que en este seminario, se utilizará la expresión de *AtPLA* como un marcador de aparición de raíces laterales.

Otros genes típicos de expresión de respuesta a auxina son los transportadores de auxina como *EIR1* y *AUX1* (Laskowski. M. y col., 2006), y las proteínas F-box como

TIR1 y AFB1-3, que actúan como receptores dominantes de auxina y están ligados a la vía de ubiquitinación de proteínas de la familia AUX/IAA (Chen. Z. y col., 2011). Para estas últimas, las auxinas funcionan como “pegamento” molecular, ya que promueven la unión de las proteínas F-box con las proteínas AUX/IAA, activando a la ubiquitin ligasa E3, y conduciendo a la degradación de los reguladores negativos AUX/IAA a través del proteosoma (Robert-Seilaniantz. A. y col., 2011).

Se ha descrito que mutaciones en el gen *TIR1* provocan alteraciones en respuestas mediadas por auxinas como la inhibición de la elongación de raíces y la inducción de la formación de raíces laterales. Aunque las funciones de TIR1 y AFB1-3 se solapan en algunas respuestas y considerando que TIR1 y AFB2 tienen funciones en raíz, los efectos de TIR1 no pueden ser reemplazados completamente por ninguna variante de proteínas F-box (Calderon-Villalobos. L. y col., 2010). Se conoce también que dichas proteínas F-box son reguladas post-transcripcionalmente por miRNAs como miR393 en respuesta a tratamientos con auxina y a la presencia de patógenos (Chen. Z. y col., 2011). Recientes estudios han determinado que la colonización de las raíces de *A. thaliana* por *T. atroviride* induce y solapa la expresión de genes de defensa de las vías de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico/etileno (JA/ET) contra patógenos biotróficos y necrotróficos, así como también es capaz de desencadenar respuestas dependiente de SA en ausencia de patógenos (Hermosa. R. y col., 2012). Este último punto es importante por que influye directamente en la expresión de *TIR1*, dado que el SA inhibe la biosíntesis de IAA en plantas e independientemente de la expresión de miR393, reprime la expresión de *TIR1* (Kazan. K. y Manners. J., 2009). Por lo anteriormente descrito, es que se escogió al gen *TIR1* como marcador de respuesta a auxinas.

La inducción de raíces laterales supone una tasa mayor de división celular en zonas determinadas. Se ha descrito que la expresión de *TIR1* es necesaria previamente a la expresión de genes participantes en el ciclo de división celular como la ciclina *CYCB1,1* (Gray. W. y col., 1999). Sumado a que las auxinas están vinculadas con el crecimiento vegetal y participan en la regulación de la iniciación de raíces laterales, es que se ha investigado el efecto de esta hormona sobre el ciclo celular. Básicamente, el ciclo celular está comandado por quinasas dependientes de ciclinas que requieren de la dimerización con una subunidad regulatoria (ciclinas) para su activación. En un estudio previo se demostró que las auxinas inducen la expresión de varias ciclinas mitóticas como *CYCA2;1*, *CYCA2;2*, *CYCB1;1* y *CYCB1;2* (Vanneste. S. y col., 2005). Una de las ciclinas antes mencionadas, *CYCB1;1*, funciona como marcador del ciclo celular en la transición G2/M en *A. thaliana*, y se encuentra expresada en células en división tanto en el meristema apical de la raíz como en células del periciclo que se transformarán en raíces laterales. De acuerdo con ello es que esta ciclina se utilizará en este seminario como marcador de mitosis para evaluar los cambios provocados en la planta producto de la presencia del hongo.

Dada la importante interacción presente entre hongos y plantas, en conjunto con todos los efectos moleculares ya conocidos y lo esencial que resulta este contacto y la información derivada de éste para el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas, es que se planteó la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“Cepas nativas del género *Trichoderma* son capaces de estimular el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* mediado por la producción de compuestos tipo auxinas”.

Para validar dicha hipótesis se definieron los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar a nivel fenotípico, químico y genético el efecto bioestimulante de cepas nativas del hongo *Trichoderma* sobre el desarrollo de plántulas de *A. thaliana*.

Objetivos específicos:

- 1) Obtención y cultivo de aislados monoespóricos a partir de aislados purificados de cepas nativas de *Trichoderma*.
- 2) Selección de cepas nativas de *Trichoderma* de acuerdo a su capacidad de estimular el crecimiento de *A. thaliana*
- 3) Obtención y análisis de los sobrenadantes de las cepas de *Trichoderma* seleccionadas crecidas en medios de cultivo líquido modificados
- 4) Evaluar los cambios en la expresión génica de los genes *tir1*, *pla2* y *cycB1;1* mediante qRT-PCR en raíces de *A. thaliana* producto de la interacción planta-hongo

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cepas

El material biológico fue proporcionado por Pedro Castillo del Valle (Laboratorio de microbiología ambiental, Dra. Margarita Carú), quien en su seminario de título aisló, purificó e identificó, basándose en características morfológicas y pruebas de antagonismo, cepas fúngicas que presentaban hábitos similares a los observados dentro del género *Trichoderma* (Castillo. P., 2009). De la investigación anterior se obtuvieron 14 cepas que fueron colectadas de diferentes fuentes y orígenes como se detalla en la Tabla I.

Tabla 1. Detalle del origen, fuente y lugar de recolección de las muestras obtenidas. Coordenadas incluyen los metros sobre el nivel el mar (msnm) del lugar de recolección. (Castillo. P., 2009)

Nombre	Origen	Fuente	Origen de la muestra	Coordenadas*
T10	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Radicular	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
T9	Río Laja	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
TR	Río Laja	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Trampa	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
T5	Neltume	<i>Nothofagus oblicua</i>	Foliar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
TC	Puerto Fuy	<i>Berberis microphylla</i>	Foliar	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
T6	Río Laja	<i>Populus nigra</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
TA	Neltume	<i>Malus sylvestris</i>	Foliar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
T7	Río Laja	<i>Prunus insititia</i>	Radicular	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
T10a	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Radicular	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
TH	Puerto Fuy	<i>Borrigo officinalis</i>	Foliar	39°52'28"S - 71°53'29"O 731 msnm
TF	Río Laja	<i>Eucryphia cordifolia</i>	Foliar	37°12'43"S - 72°19'18"O 149 msnm
T1a	Neltume	<i>Luma apiculata</i>	Foliar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm
TP	Puerto Consuelo	<i>Achillea millefolium</i>	Foliar	51°39'53"S - 72°34'25"O 27 msnm
T2	Neltume	<i>Senecio sp.</i>	Foliar	39°51'08"S - 71°55'35"O 516 msnm

* Coordenadas aproximadas.

2.- Obtención y cultivo de aislados monoespóricos

Para obtener los cultivos monoespóricos de los 14 cultivos previamente purificados, se realizaron diluciones seriadas para cada una de las cepas fúngicas utilizando agua destilada estéril. A continuación se tomaron 100 µl de cada una de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , los que se sembraron en placas con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con antibióticos (100 mg/l Kanamicina y 100 mg/l Ampicilina). Estas placas se incubaron a 25°C en oscuridad hasta obtener colonias aisladas (3-4 días) pertenecientes a una sola conidia. Luego, cada colonia fue aislada e incubada en placas con medio PDA. Se dejaron crecer por una semana a 25°C en oscuridad hasta que el cultivo cubrió toda la placa. Posteriormente, se cortaron cuadrados de 1cm² de cada agar y se reincubaron en placas con medio PDA hasta que el cultivo cubrió toda la placa y comenzó a esporular (aproximadamente 7-8 días). En dicho momento se rompió parte del medio-agar para promover la esporulación de cada cepa. Al obtener placas esporuladas completamente provenientes de una colonia, se agregó agua estéril (10 ml) y se raspó la superficie con una espátula. Se conservó cada cultivo monoespórico en un frasco de vidrio esterilizado a 4°C hasta el momento de titular.

Cada cultivo fue titulado utilizando una cámara de Petroff-Hausser. Para ello, se tomó 50 µl de cada una de las suspensiones de esporas generadas en el punto anterior, y bajo microscopio se contó el número de esporas en 4 secciones de la cámara (cada una de 25 cuadrados pequeños) y se calculó el número promedio en ellos. Luego se calculó el número de esporas por ml mediante la siguiente fórmula

(http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documento/uni_02/58/texthtml/cap804.htm):

$$\frac{N^{\circ} \text{esporas}}{\text{ml}} = \text{esporas promedio por cuadrado } (N^{\circ}) \times 25 \times 50 \left(\frac{1}{\text{mm}^3} \right) \times 10^3 \left(\frac{\text{mm}^3}{\text{ml}} \right) \quad (1)$$

Con cada título, se generó diferentes reservas de esporas para cada hongo a las concentraciones siguientes: 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} esporas/ml.

3.- Cultivos fúngicos líquidos de cepas de *Trichoderma*

En matraces de 250 ml, se agregaron 100 ml de medio Vogel-Bonner (Vogel 1x-Anexo2: Medios de cultivo) con 0,5% de sacarosa. Para evaluar la potencialidad de los hongos para producir compuestos indólicos, se les crecieron en medios suplementados con triptófano (Trp), un inductor de la vía metabólica de las auxinas. Para ello se suplementaron con 0 mg/l, 100 mg/l y 200 mg/l de Trp (Gravel. V. y col., 2007; Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009). En estos últimos, se inocularon 10 μ l de una suspensión de esporas activas (cepas TP y T7 independientemente) a una concentración final de 10^6 esporas/l. Estos cultivos se crecieron por 7 días a 25°C con agitación de 150 rpm.

Para extraer el sobrenadante de los cultivos líquidos fúngicos, se utilizó primero un filtro Nyltal (filtros de nylon; diámetro de poro de 30 μ m) y luego filtros de 0,22 μ m (Millipore). El sobrenadante filtrado se conservó a 4°C hasta que fuera necesario usarlo como se describe en la sección 5.3.

4.- Material vegetal y condiciones de crecimiento

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* Heynh., ecotipo Columbia-0 fueron utilizadas en diferentes experimentos. Se esterilizó la superficie de las semillas con la solución 1 (1 ml de etanol 95% (v/v) filtrado) por 5 min en agitación y luego con la solución 2 (1 ml de etanol 70% (v/v) con TritonX 100 0,1% (v/v)) por 15 min en agitación. Luego de lavar 4 veces con agua destilada estéril, se dejó incubando 24 h a 4°C para la estratificación.

Tras la estratificación, se sembraron 15-18 semillas en una línea en placas cuadradas de 120x120x17mm. En dichas placas, se vertió 50 ml de medio que contenía: 4,43 g/l

de medio MS (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, M524-Phytotechnology) ,12 g/l agar-agar (MERCK), suplementado con 60 mg/l de inositol, sin sacarosa a pH 5,8. Se dejaron incubar en una cámara con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad a 22°C. La incubación de las placas fue en un ángulo de 65° que permitió el crecimiento de la raíz por la superficie del agar.

5.- Experimentos de inoculación

5.1.- Inoculación de Hongos *Trichoderma*

Los cultivos de cepas de *Trichoderma* fueron evaluados *in vitro* por su capacidad de promover el crecimiento de *A. thaliana*. Para ello, luego de 4 días tras la siembra de las semillas, se inocularon 10 µl de una suspensión de esporas titulada a 10⁵ esporas/ml, 10⁶ esporas/ml o 10⁷ esporas/ml de cada una de las 14 cepas, por separado. El inóculo se situó a 5 cm de las puntas de las raíces principales (15-18 plántulas por placa). Las plantas fueron regresadas a la cámara hasta el día 11 tras la siembra. Tras dicho periodo, se realizó el análisis fenotípico (sección 6).

5.2.- Inoculación de diferentes concentraciones de IAA

Se evaluó *in vitro* el efecto de IAA sobre el crecimiento de *A. thaliana*. Para ello, luego de 4 días tras la siembra de las semillas, se agregaron diferentes concentraciones de ácido indol-acético (IAA) diluido en medio mineral Vogel 1x (50µl) a 2,5 cm de la raíz principal de las plántulas en línea recta. Las concentraciones evaluadas fueron 0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml y 50 µg/ml. Tras 11 días post-siembra, se analizó el fenotipo de las plantas (sección 6).

5.3.- Inoculación de cultivos fúngicos filtrados

Se evaluó el efecto directo del sobrenadante de cultivos líquidos de algunas cepas fúngicas sobre el crecimiento de las plantas. Para ello, tras extraer el sobrenadante de los cultivos líquidos fúngicos y filtrarlos (sección 3), se procedió a colocarlos en esterilidad sobre placas de MS que contenían plántulas de *Arabidopsis* de 4 días post-siembra. Para ello, se distribuyó homogéneamente 100 µl de filtrado a 2,5 cm de las puntas de las raíces principales en línea recta. Luego de 6 días en presencia del filtrado, se procedió a evaluar el fenotipo de las plantas (sección 6).

6.- Análisis fenotípico

Para cada plántula, se contó el número de raíces laterales con una lupa, se midió el largo de la raíz principal mediante la aplicación tpsDig2 Versión 2.15 (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>) y se midió el peso húmedo de la parte aérea en una balanza analítica. La densidad de raíces laterales se evaluó considerando el promedio del total de raíces laterales por planta dividido por el promedio del largo de la raíz principal de cada planta.

7.- Crecimiento de hongos y análisis de los compuestos indólicos.

7.1.- Cultivo líquido de hongos

Para evaluar la producción de compuestos indólicos, se inoculó con 10 µl de una suspensión de esporas activas a una concentración final de 10^9 esporas/l en 100 ml de medio Vogel 1x estéril o MS 1x (Anexo 2: Medios de cultivo), ambos con 0,5% (p/v) de sacarosa en matraces de 250 ml. Para evaluar la potencialidad de los hongos para producir compuestos indólicos, se les crecieron en medios suplementados con Trp, un inductor de la vía metabólica de las auxinas. Para ello, se agregó 0, 100 o 200 mg Trp/l

(Gravel. V. y col., 2007; Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009). Estos cultivos se crecieron por 7 días a 25°C con agitación de 150 rpm. Tras la incubación, se filtraron los cultivos con filtros Nyltal (filtros de nylon; diámetro de poro de 30 μm) y filtros de 0,22 μm (Millipore) y los sobrenadantes fueron ajustados a pH 2 (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009) con HCl 1 M. Los compuestos indólicos en el sobrenadante fueron extraídos 2 a 3 veces con volúmenes iguales de 100% (v/v) acetato de etilo. Los extractos fueron evaporados hasta sequedad en rotavapor con vacío a 38°C, y luego resuspendidos en 1 ml 100% (v/v) metanol.

7.2.- Análisis de compuestos indólicos

El análisis de los compuestos se llevó a cabo en dos formas, una cualitativa mediante el uso de cromatografía de capa fina (TLC – *thin layer chromatography*) y la otra cuantitativa mediante el uso de espectrofotómetro.

7.2.1.- Análisis cualitativo por cromatografía de capa fina

El análisis cualitativo fue realizado mediante TLC en placas de sílice (MERCK) utilizando como fase móvil isopropanol:amonio:agua (10:1:1, v/v) (Gravel. V. y col., 2007). Se pipetearon 5 μl de cada muestra en las placas con los estándares (IAA) correspondientes para cada prueba. Se dejó fluir la fase móvil sobre la placa en un jarro de vidrio sellado a temperatura ambiente. Luego, las placas fueron visualizadas bajo luz UV y luz blanca, para identificar compuestos que no son revelados por los reactivos. Tras ello la cromatografía fue revelada pulverizando el reactivo Vanurk. Este último se preparó mezclando un volumen de reactivo Ehrlich (1g de p-dimetilamino benzaldehído disuelto en 50 ml HCl 37% v/v) y dos volúmenes de reactivo Salkowski (2,03 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 500 ml agua destilada más 300 ml H_2SO_4 10,8 M) (Hassan. M. K. y Ahmed. H.A., 2008). Tras pulverizar, la cromatografía fue calentada en

horno a 100°C por 5 min y las placas se dejaron enfriar. La movilidad relativa (Murray. L. K. y col., 2009) de todas las muestras fue medida. Se determinó al observar el estándar de IAA que tras aplicar el revelador, éste aparece bajo luz blanca como una mancha de color azul-violeta, sin revelador y observado bajo luz UV de onda corta (254 nm) como una mancha celeste claro y bajo luz UV de onda larga (366 nm) como una mancha de color violeta oscuro. En los distintos revelados presenta un Mr que está en el rango de 0,54 y 0,6 (Gravel. V. y col., 2007).

7.2.2.- Análisis cuantitativo mediante espectrofotómetro

En cuanto al análisis cuantitativo, para visualizar los compuestos indólicos en el espectrofotómetro se utilizó un método colorimétrico tipo Salkowski en el cual se mezcló 1 volumen de muestra (cultivo fúngico en MS 1x) con 1 volumen de reactivo (4,5 g FeCl₃/l H₂SO₄ 10,8 M), se dejó incubando por 30 min en oscuridad y luego se midió a una longitud de onda de 541 nm (Glickmann. E. y Dessaux. Y., 1995). Se compararon los resultados obtenidos en cada muestra con una curva estándar en la que se diluyeron distintas concentraciones de IAA (35 µg/ml a 1 µg/ml) en medio MS 1x.

8.- Análisis de los cambios de expresión génica de los genes *Attir1*, *Atpla2* y *AtcycB1;1* mediante qRT-PCR

Plántulas de *A. thaliana* de 4 días post-siembra crecidas en placas de Petri con medio basal MS 1x fueron inoculadas a 5 cm de la raíz principal. El inóculo consistió en 10 µl de cada una de las siguientes suspensiones de esporas de la cepa TP: 10⁵ esporas/ml y 10⁶ esporas/ml y de la cepa T7: 10⁶ esporas/ml, todas en forma independiente en placas que contenían entre 12 y 15 plántulas. Se incluyeron tratamientos con agua destilada como controles negativos. Durante 6 días más, se

dejaron interactuar los distintos tratamientos. Luego de completar 11 días tras la siembra, y utilizando un bisturí se cortó la unión brote/raíz y se colectaron las raíces de las plántulas de *A. thaliana* para cada tratamiento por separado. Estas últimas fueron congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C hasta el momento de la extracción del RNA.

El RNA total se extrajo utilizando el kit UltraClean™ Plant RNA Isolation (MOBIO) como describe el fabricante. Se purificaron las muestras de RNA agregando 0,1 volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol 100% (v/v), se dejó durante 24 horas a -80°C y se centrifugó a 17000xg por 15 minutos a 4°C . Conservando el pellet, éste se lavó con etanol 70% (v/v) y se volvió a centrifugar 5 minutos a 17000xg. Se repitieron los lavados 2 veces. Finalmente se resuspendió el pellet en 20µl de agua DEPC.

Se realizó el tratamiento de DNAsa para el RNA total obtenido. Para ello, se cuantificaron las muestras de RNA utilizando un NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific.). Se agregó 1 U de DNAsal (Fermentas), amortiguador DNAsal con Magnesio 1x y 40 U de "RiboLocRNaseInhibitor" (Fermentas) a 3 µg de RNA y se completó hasta un volumen final de 20 µl con H₂O DEPC. Se incubó en un baño termostático durante 35 minutos a 37°C , se pasó a hielo donde se agregó 2 µl de EDTA (25 mM), y finalmente, se dejó 10 minutos a 65°C .

Posteriormente se realizó la transcripción reversa para una reacción total de 20 µl utilizando dos mezclas. La mezcla 1 consistió en 3,8 µl de RNA post tratamiento con DNAsa y 1,2 µl de partidor Oligo AP DEPC (10 µM; Tabla 2). Este se dejó en el termociclador por 5 minutos a 70°C . Tras dicho tratamiento, se agregó la mezcla 2, la cual consistió en 4 µl de Amortiguador 5x (Promega), 1,2 µl de RT-impromII (Promega), 0,4µl de Ribolock (Fermentas), 4 µl MgCl₂ 25 mM (Promega), 1 µl de dNTP DEPC (10

mM) y 4.4 µl de agua DEPC. Finalmente se dejó continuar el programa para RT-PCR de acuerdo a las temperaturas y tiempos siguientes: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos, 72°C por 15 minutos por 1 ciclo y finalmente se dejó a 10°C.

Se escogieron 3 genes relacionados con diferentes respuestas asociadas al crecimiento de raíces laterales: *Attir1*, *Atpla2* y *AtcycB1.1*. Se incluyeron como genes normalizadores a *UBI10*, *PP2A* y *At4g26410* (Czechowski. T. y col., 2005); Tabla2). Los partidores específicos para *Attir1* y *PP2A* fueron generados mediante el programa AmplifX1.4.5, considerando como respaldo las secuencias disponibles en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) y se corroboraron los índices termodinámicos teóricos mediante la herramienta online de IDT (<http://www.idtdna.com/scitools/scitools.aspx>). Los partidores para *Atpla2* fueron diseñados por el grupo de Dr. Andrés Zurita (Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas). Finalmente los partidores para *AtcycB1;1*, *UBI10* y *At4g26410* fueron diseñados por el grupo de la Dr. Lorena Norambuena (Laboratorio de Biología Vegetal Molecular).

Se confirmó mediante secuenciación (Macrogen Corp, USA) que los amplicones obtenidos mediante PCR utilizando los partidores diseñados contra los tres genes escogidos (*Atpla2*, *Attir1* y *AtcycB1;1*) correspondían al segmento de gen esperado. Se compararon las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) utilizando el programa BioEdit (Sequence Alignment Editor).

La expresión de los distintos genes en la planta fue evaluada mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Los experimentos fueron llevados a cabo en el sistema para detección de qRT-PCR denominado Stratagene Mx3000P (Agilent

technologies) utilizando el Mastermix 2x-Sensimix SYBRHi-ROX (Bioline) según las sugerencias del fabricante.

El programa utilizado consistió: segmento 1 de un ciclo de 1 segundo a 25°, segmento 2 de 1 ciclo por 10 min a 95°, segmento 3 de 40 ciclos de 15 segundos a 95°, 15 segundos a 55° y 15 segundos a 72°, segmento 4 de 5 segundos a 95°, 1 segundo a 25°, 15 segundos a 55° y un segundo a 72°. Se confirmó la ausencia de dímeros de partidores con reacciones que no contenían cDNA. Cada reacción se llevó a cabo en duplicado técnico y se realizó un análisis de cuantificación relativa considerando los genes normalizadores y genes muestra en base a la fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{eficiencia gen}^{(\Delta Ct)}}{\text{eficiencia normalizador}^{(\Delta Ct)}} \quad (2)$$

considerando ($\Delta Ct = (Ct_{wt} - ct_{muestra})$)

Tabla 2. Partidores diseñados para los genes involucrados en la proliferación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

Nombre Partidor	Secuencia	Gen Amplificado	Número de acceso
PLA2 F	5'-TCCACTCCCGTCTCCGAACC'3	At1g67750	NM_105443
PLA2 R	5'-TCCCATTTCTGGGTCGCATCT'3	(PLA2)	
Cycb1 F	5'GCATTTTCGAGGGAATCATGACG'3	At4g37490	NM_119913
Cycb1 R	5'CTTAGACGAATCCTCAATCCTGG3	(CYCB1;1)	
TIR F	5'TGGTCTTGAGGTGCTTGCTTCAAC'3	At3g62980.1	NM_116163
TIR R	5'GCATTGGTCATTTGACGGCAGAAG'3	(TIR1)	
UBI10 F	5'ACCAGCAGCGTCTCATCTT'3	AT4g05320	
UBI10 R	5'GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA'3	(Ubiquitina 10)	
PP2A F	5'GATACTTTGTCTGTGTGTGCTT'3	At1g13320	NM_101203
PP2A R	5'CAAATACGCCAACGAACAA'3	(PP2AA3)	
G26410 F	5'GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC'3	At4g26410	NM_118774
G26410 R	5'GGTCCGACATACCCATGATCC'3	(Proteína expresada)	
OligoAP	5'CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT3'		

9.- Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó para comparar cada tratamiento con hongo con respecto al control. Para ello, se utilizó el programa GraphPadPrism 5 realizando un análisis de ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple de Dunnett que considera $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,001$ (***) como indicadores de significancia.

RESULTADOS

Objetivo 1:

Obtención y cultivo de aislados monoespóricos a partir de aislados purificados de cepas nativas de *Trichoderma*.

Muestras de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* provenientes del centro y sur de Chile fueron previamente identificadas genética y morfológicamente (Castillo. P., 2009). Durante mi seminario de título, éstas fueron aisladas mediante diluciones sucesivas y cultivo en placas hasta obtener cultivos provenientes de una sola espora. Estos últimos fueron cultivados estimulando la esporulación, obteniéndose así 14 cultivos monoespóricos independientes. En la Figura 1, se muestran algunos de ellos en fase de completa esporulación. Tras raspar cada una de las placas con agua estéril, se tituló cada cultivo líquido llevándolos a una concentración de 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas por ml (Sección 2).

Objetivo 2:

Cepas del género *Trichoderma* promueven el crecimiento de plántulas de *A. thaliana*.

Con el objetivo de evaluar cada cepa del género *Trichoderma* de acuerdo a su capacidad de estimular el crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis*, placas con plántulas de 4 días post siembra fueron inoculadas a 5 cm de su raíz principal con esporas de hongos, y se los dejó crecer e interactuar por 6 días bajo condiciones controladas de crecimiento. Se incluyeron placas inoculadas con agua destilada como tratamiento control e inóculos con diferentes titulaciones de esporas (10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/ml)

como tratamientos experimentales, proceso que se repitió para cada uno de los 14 cultivos monoespóricos en forma independiente.

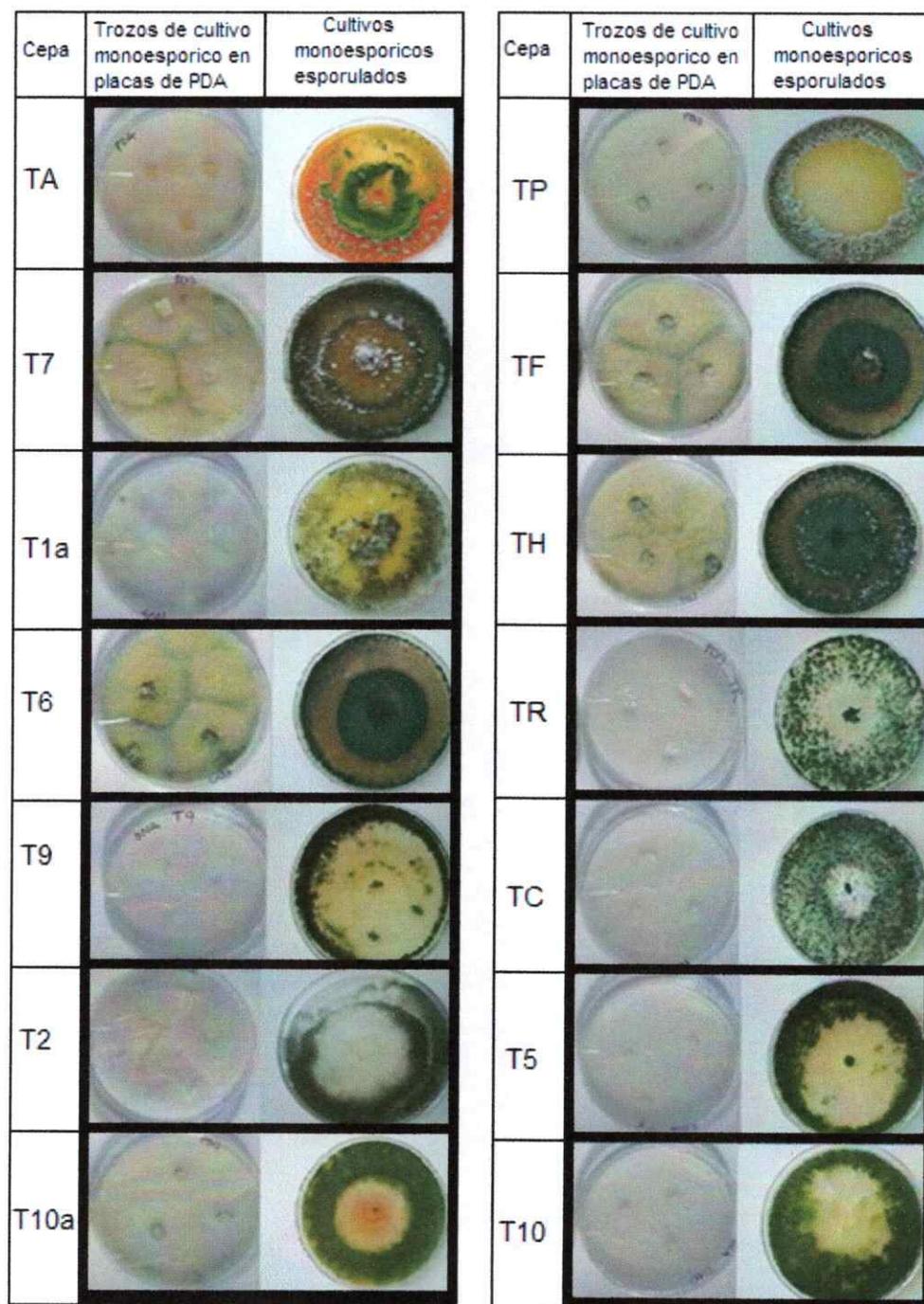


Figura 1. Crecimiento de cultivos monoespóricos en placas con medio PDA. Se observa en cada recuadro, de izquierda a derecha: Nombre de la cepa, Trozos de medio PDA provenientes de placas con cultivos monoespóricos y placas con medio PDA con el hongo esporulado tras 3 semanas de cultivo.

En el caso de inóculos de 10^7 esporas/ml, tras 6 días de interacción, se observó que el crecimiento de la raíz principal de las plántulas fue inhibido en todos los casos al compararlas con las placas control (Figura 2-A). En cuanto al número de raíces laterales, se observó un aumento promedio significativo de un 35.4% y 30.7% sobre el control, en el caso de cepas TP y TH, respectivamente y una disminución promedio significativa de 60.7 y 70.8% inferior al control, en el caso de T10a y T2, respectivamente (Figura 2-B). Con respecto al peso húmedo, no se observó estimulación a esta concentración de esporas. Interesantemente, aquellas cepas que presentaron un aumento en el número de raíces laterales (TP, TH) no presentaron diferencias significativas en el peso húmedo con respecto al control (Figura 2-C). En resumen, los resultados reflejados en los tres parámetros considerados no muestran un efecto beneficioso sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas al inocular con 10^7 esporas/ml.

Por lo tanto, se repitió el proceso experimental con dos titulaciones menores (10^5 y 10^6 esporas/ml de manera independiente) a modo de evaluar si el efecto del hongo sobre el crecimiento de *Arabidopsis* era dosis-dependiente. Al evaluar el largo de la raíz principal se observó que no existían grandes diferencias entre ambas dosis (Figura 3). Al inocular con las cepas TR, T10, T5, TA, T2, T10a y TC, el largo de la raíz fue menor con respecto al control con ambas dosis, mientras que para el caso de T1a, a la mayor concentración de esporas no se observan diferencias respecto al control. En cambio, se observó que al inocular con las cepas T6 y T7, el largo de la raíz principal era levemente mayor a la menor concentración. Las cepas TP, T9, TH y TF no afectaron el largo de la raíz principal en ambas dosis.

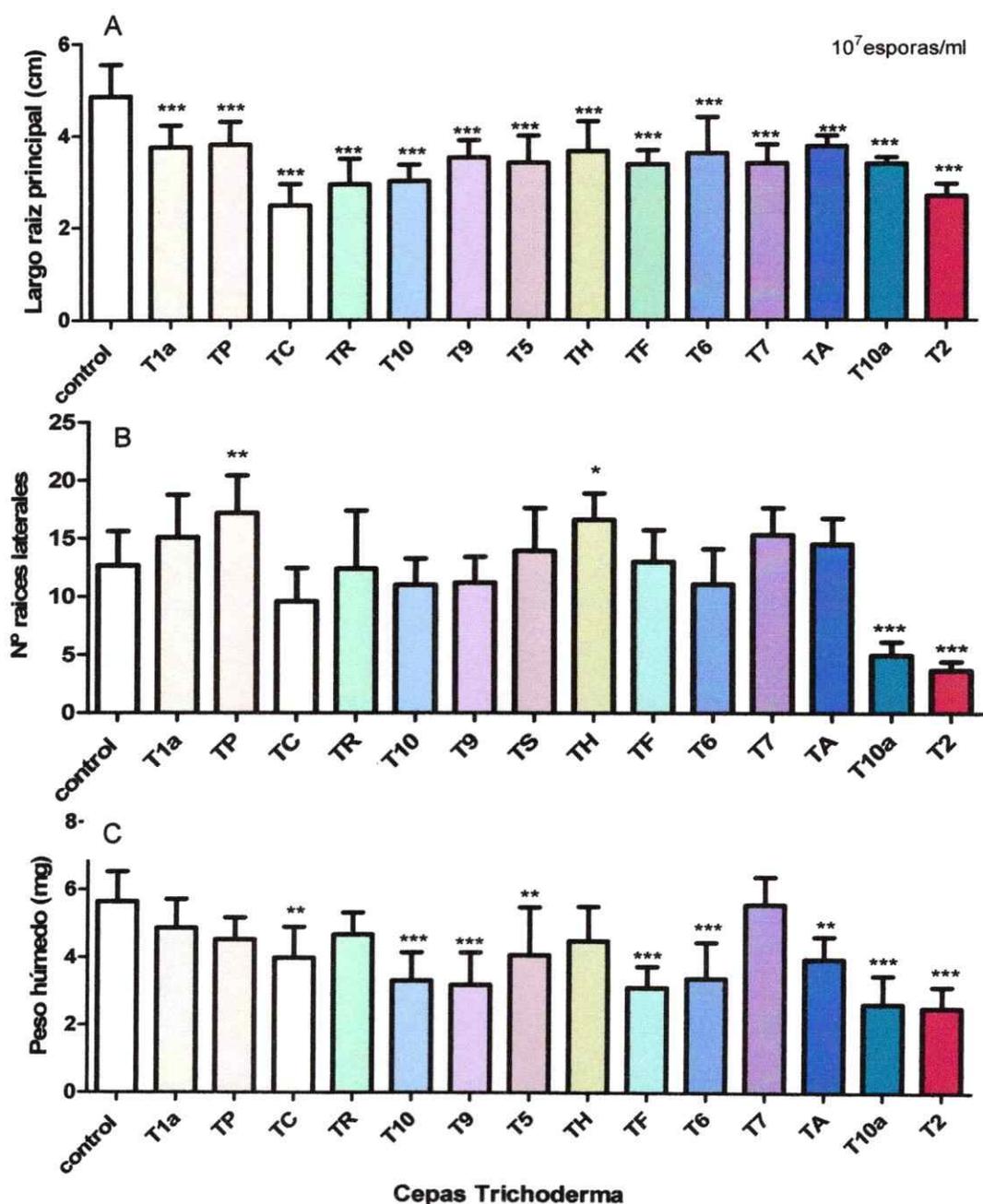


Figura 2. Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de cepas nativas de *Trichoderma* inoculadas con una suspensión de 10⁷ esporas/ml. Se muestra el efecto de la inoculación en el largo de la raíz principal (A), El número de raíces laterales (B) y en el peso húmedo (C). Datos muestran promedio y desviación estándar de un grupo de 10 plántulas por tratamiento. El experimento fue repetido 2 veces con similares resultados. Se considera *(P<0,05), ** (P< 0,01) y *** (P<0,001) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

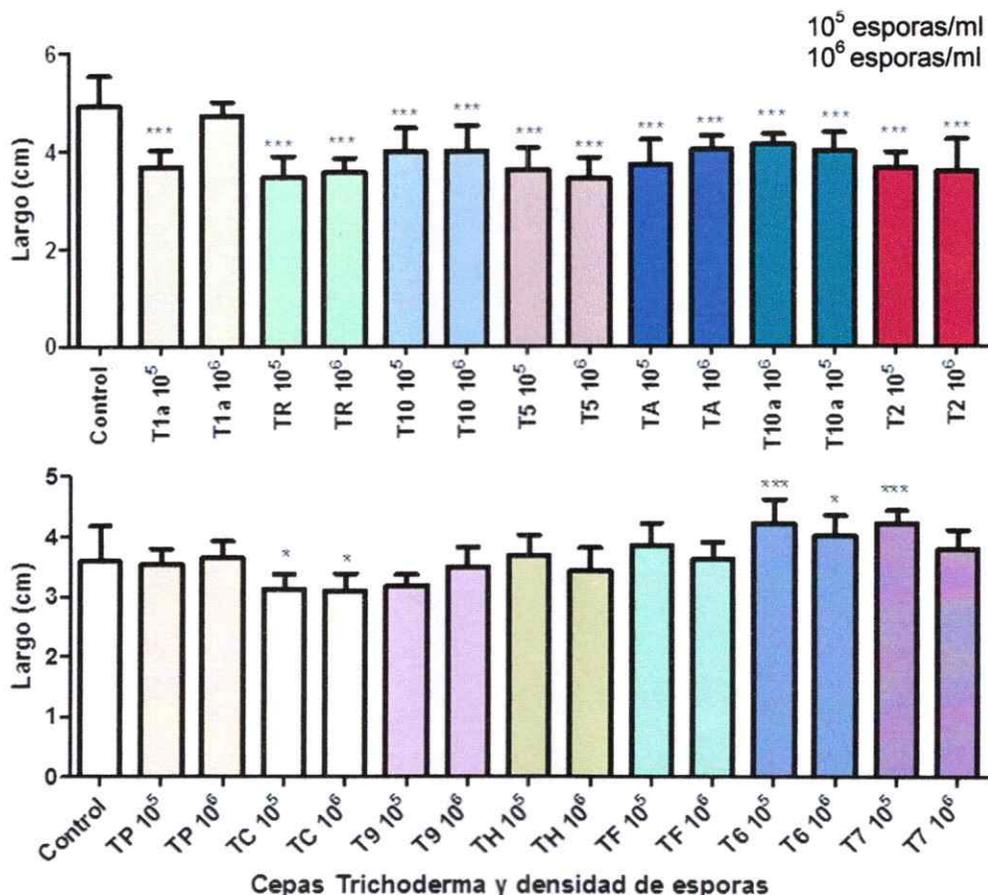


Figura 3. Largo de raíz principal de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de cepas nativas de *Trichoderma* inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml. Datos muestran promedio y desviación estándar de un grupo de 10 plántulas por tratamiento. El experimento fue repetido 2 veces con similares resultados. Se considera * (P<0,05), ** (P< 0,01) y *** (P<0,001) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Al analizar el efecto de las cepas sobre el número de raíces laterales, se observó que algunas cepas, a determinadas concentraciones de esporas, eran capaces de provocar un efecto estimulante (Figura 4). Específicamente, a una concentración de esporas de 10⁵ esporas/ml, las cepas TH, TF y T6 provocaron un aumento de 47.3%, 37.7% y 46.5%, respectivamente. Cuando se inoculó con las cepas T1a, TP, TC y T6 a 10⁶ esporas/ml, las plántulas presentaron más raíces laterales con respecto al control. En

promedio, estas cepas fueron capaces de estimular el desarrollo de raíces laterales al menos en un 50%.

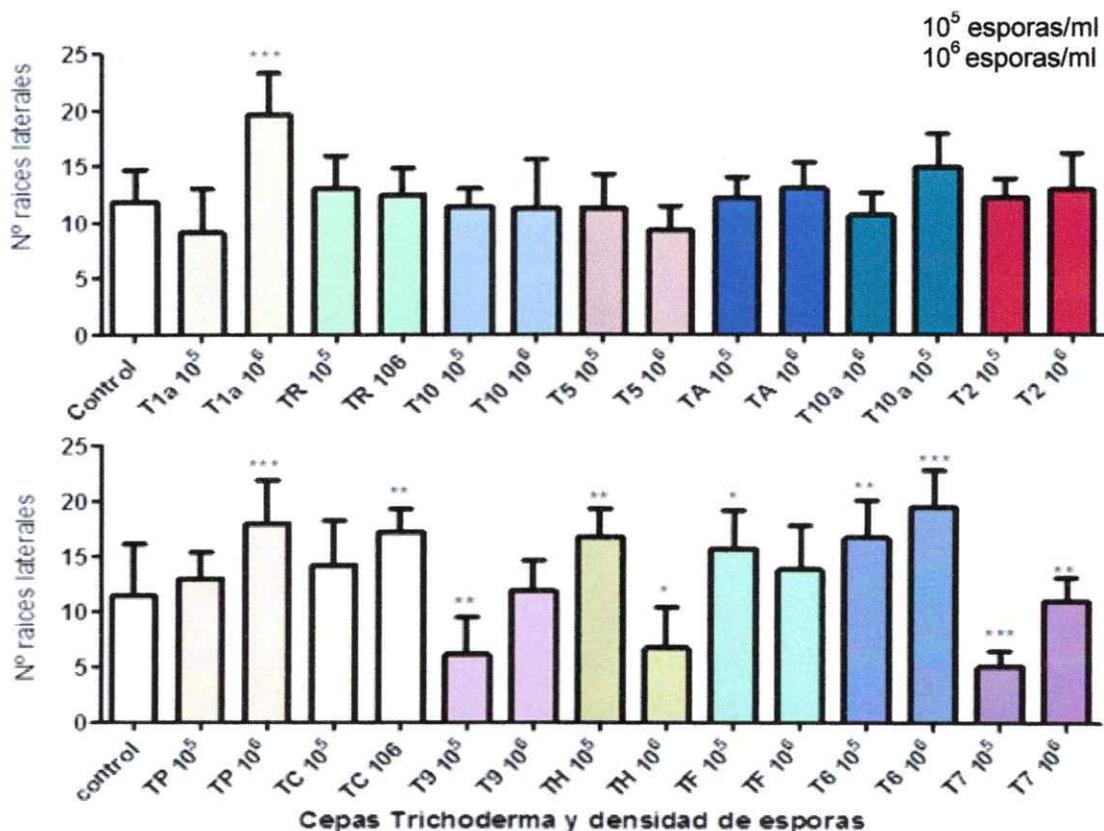


Figura 4. Número de raíces laterales por planta de *Arabidopsis thaliana* en presencia de cepas nativas de *Trichoderma* inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml. Datos muestran promedio y desviación estándar de un grupo de 10 plántulas por tratamiento. El experimento fue repetido 2 veces con similares resultados. Se considera * (P<0,05), ** (P< 0,01) y *** (P<0,001) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Dado que la presencia de ciertas cepas del hongo generó diferencias en el largo de la raíz principal, pero también diferencias en el número de raíces laterales es que se evaluó la relación entre ellos. Así, nos permite determinar si es que las cepas promueven diferencias en cuanto a la densidad de raíces laterales (Figura 5).

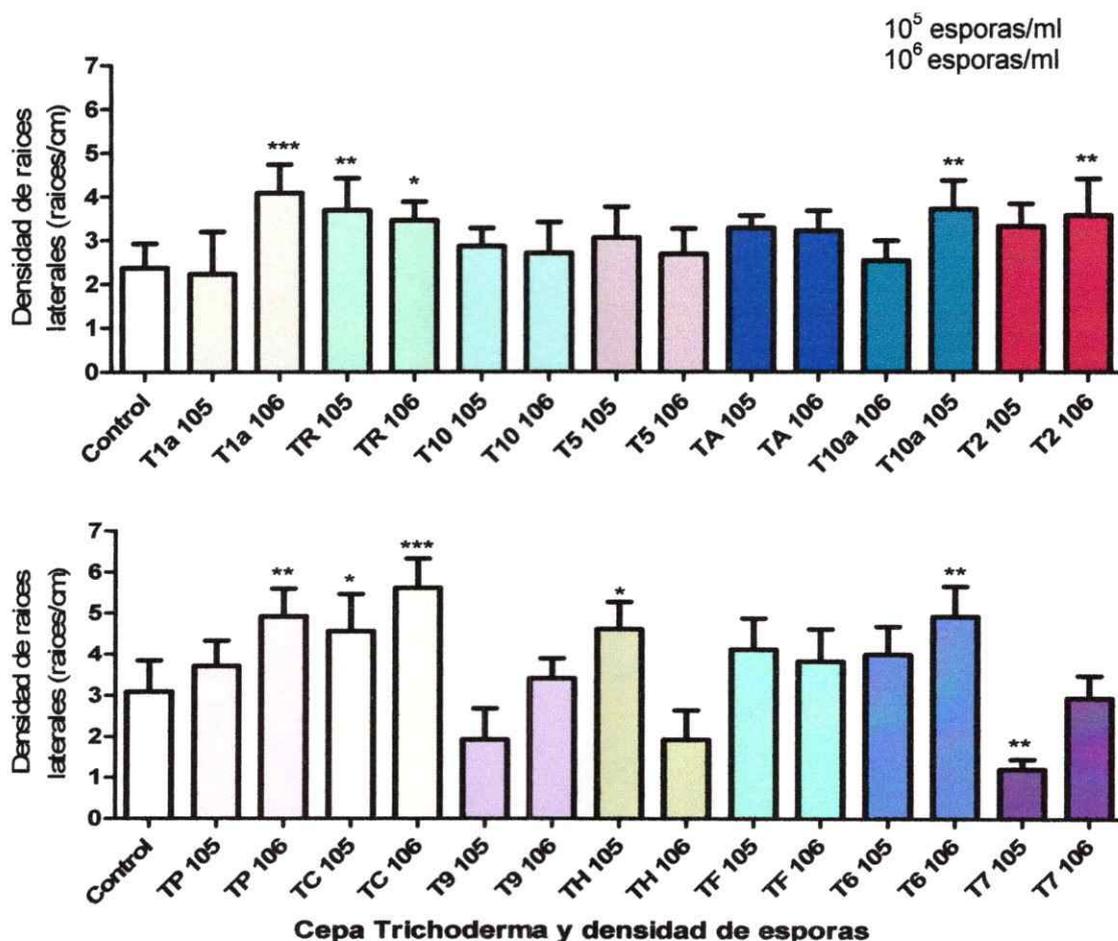


Figura 5. Densidad de raíces laterales de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de cepas nativas de *Trichoderma* inoculadas con una suspensión de 10⁵ y 10⁶ esporas/ml. Datos muestran promedio y desviación estándar de un grupo de 10 plántulas por tratamiento. El experimento fue repetido 2 veces con similares resultados. Se considera * (P<0,05), ** (P< 0,01) y *** (P<0,001) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Se observó que la densidad de raíces laterales concuerda con lo observado en los datos de número de raíces laterales. Esto confirma que el efecto estimulante en el número de raíces laterales es mayor en los tratamientos indicados (TH, T6, T1a, TP, TC y TR).

Finalmente, se evaluó si este efecto estimulante en el crecimiento radicular estaba reflejado en el peso fresco de las plántulas expuestas a las distintas cepas. Como se muestra en Figura 6, se observó un aumento significativo solamente para la cepa T1a

a una concentración de 10^6 esporas/ml, pero también a dicha concentración de esporas, se aprecia que el promedio en el peso húmedo para las cepas TP, TC, T6, TH, TF y TR es mayor que el control, coincidentemente con las cepas que anteriormente presentaron mayor número de raíces laterales (Figura 4).

En general, el comportamiento del peso fresco es proporcional a la estimulación en el número de raíces laterales.

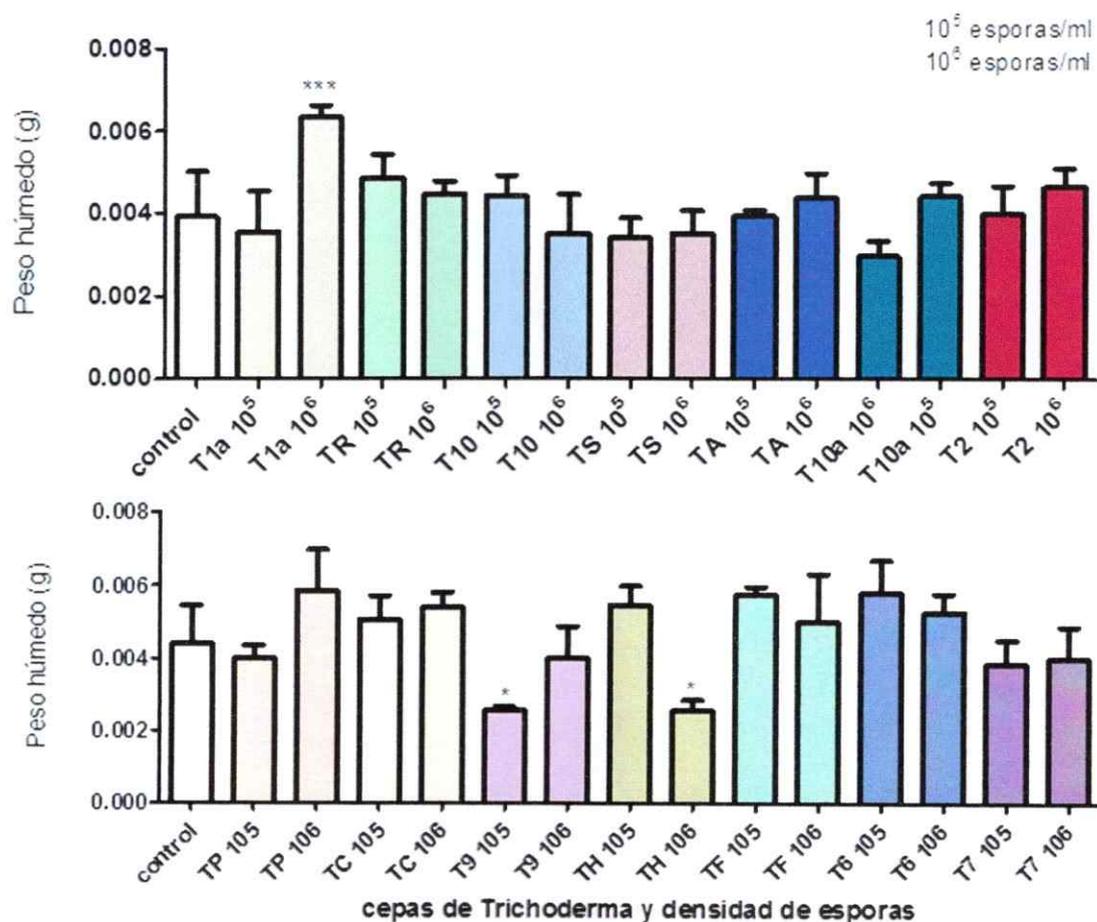


Figura 6. Peso húmedo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* en presencia de cepas nativas de *Trichoderma* inoculadas con una suspensión de 10^5 y 10^6 esporas/ml. Datos muestran promedio y desviación estándar de un grupo de 10 plántulas por tratamiento. El experimento fue repetido 2 veces con similares resultados. Se considera * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Con estos resultados, fue posible observar que el efecto estimulante varía según la cepa y que este mismo es dosis-dependiente observándose mayor estimulación en el número de raíces laterales a concentraciones menores de esporas. Las cepas TP (a 10^6 y 10^7 esporas/ml) y TH (a 10^5 y 10^7 esporas/ml) indujeron mayores números de raíces laterales, sobre todo al inocularlos en la menor concentración (Figura 4). La cepa T1a presentó un comportamiento muy similar a TP, mientras que TF mostró un comportamiento similar a TH. Las otras cepas que presentan efecto estimulante son TC y T6 a una concentración de 10^6 esporas/ml.

Para evaluar la relación filogenética entre estas últimas cepas, se utilizaron los datos del análisis de espaciadores de transcripción interna (ITS, *Internal Transcribed Spacer*) elaborado con la herramienta TrichoOkey (gentileza Gabriel Pérez; Figura 7). Se observó que TH, TF y T6 pertenecen a *T. harzianum*, la cepa TC pertenece a *T. atroviride*, la cepa T1a pertenece a *T. neozelandiae*, la cual es muy cercana a la cepa TP (*T. citrinoviride*).

Para los experimentos que se presentaran a continuación, se consideró solo a la cepa TP y T7. La cepa TP debido a que no ha sido descrita anteriormente como especie bioestimulante y que presenta dichos efectos en 2 de las 3 concentraciones probadas (10^6 y 10^7 esporas/ml; Figuras 4, 5 y 6). Mientras que la cepa T7, se escogió por que no mostró efectos bioestimulantes en ningún caso, por lo que se utilizó para comparar.

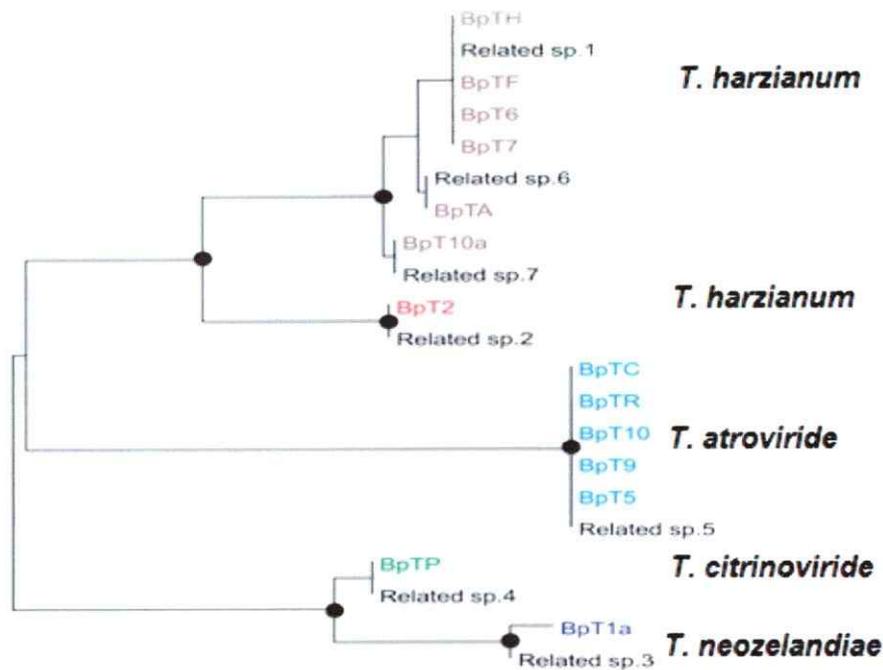


Figura 7. Análisis de un grupo de 21 taxos de hongos basado en espaciadores de transcripción interna (ITS). El árbol topológico se construyó usando el algoritmo de Neighbour-Joining con 1000 iteraciones de bootstrap.(*) – Los nodos se sustentan por valores de bootstrap de 99%. Cada color se asoció con una especie utilizando TrichOKEY 2.0.

Objetivo 3:

Los sobrenadantes de cultivos fúngicos de las cepas TP y T7 crecidas en cultivo líquido contiene compuestos indólicos

Para identificar aquellas moléculas secretadas por el hongo que podrían estar involucradas en la estimulación de crecimiento de *Arabidopsis*, se analizó si las cepas seleccionadas eran capaces de producir compuestos indólicos con actividad tipo auxina. Para ello se cultivaron ambas cepas en dos medios líquidos diferentes: Vogel 1x y MS 1x, con el objetivo de evaluar los efectos del medio en el que se crece el hongo. Ambos medios fueron suplementados con L-triptófano (Trp; 0, 100 y 200 mg/l), un precursor natural de la vía de síntesis de auxinas como Ácido indol-3-acético (IAA) e Ácido indol-3-acetaldehído (IAAld). Luego de una semana de cultivo, se filtraron los

cultivos (sección 7) y como se menciona en la Introducción (Análisis de compuestos indólicos), se implementaron dos técnicas para analizar su composición indólica. Específicamente, parte de este filtrado se utilizó para evaluar cuantitativamente la muestra por espectrofotómetro y otra parte se extrajo con compuestos orgánicos para evaluar cualitativamente la muestra mediante cromatografía de capa fina (TLC). En ambos análisis, para visualizar los compuestos indólicos, se utilizó una metodología colorimétrica basada en el reactivo de Salkowski (sección 7).

3.1.- Evaluación por espectrofotometría de compuestos indólicos

El objetivo de este experimento era evaluar la capacidad del hongo de producir y secretar compuestos tipo auxinas en el medio MS1x, medio en el que se creció las plantas.

Se observó que existe un marcado aumento en estos compuestos al suplementar el medio de cultivo con Trp para ambas cepas. Tanto la cepa TP y T7 a la misma concentración de esporas inoculadas (10^6 esporas/l y sin Trp) producen en promedio niveles similares de compuesto indólicos (6,3 y 6,7 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente).

Sin embargo, aparecen diferencias cuando se estimula la producción potencial del hongo al agregar Trp, donde TP suplementado produjo 19,7 $\mu\text{g/ml}$ y T7 produjo solo 11,7 $\mu\text{g/ml}$.

Con el resultado anterior se determinó que, la capacidad del hongo *Trichoderma* para producir compuestos indólicos en medio MS 1x varía cuando se suplemento el medio con el inductor (Trp). Esto último, nos entrega información del efecto simbiótico potencial en presencia de la planta que participaría como inductor de la producción de compuesto indólicos. Finalmente y no menos importante es que los hongos son

capaces de producir los compuestos y liberarlos al medio durante su crecimiento.

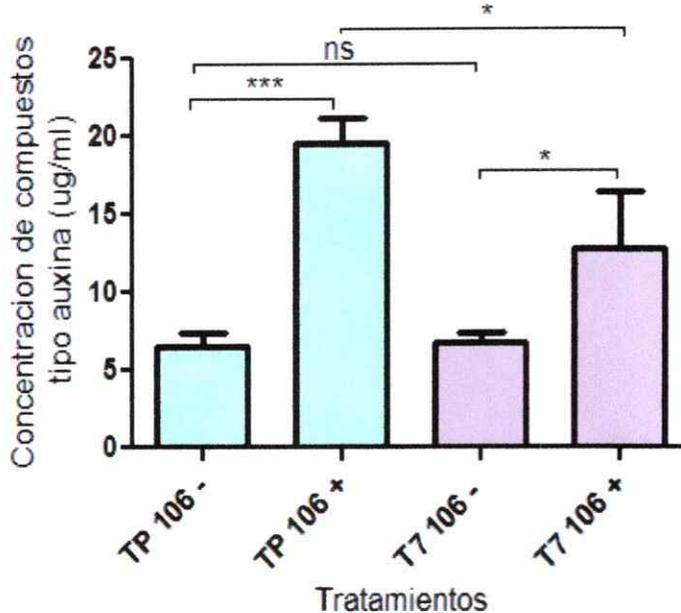


Figura 8. Efecto de triptófano en la producción de compuestos indólicos por cepas de *Trichoderma*. Cepas TP y T7 fueron cultivados en cultivos líquidos MS suplementado con triptófano 200 mg/L (+) y no suplementando (-). Se consideró en los cultivos 106 a la concentración 10^6 esporas/L y 107 a la concentración 10^7 esporas/L.

Datos muestran promedio y desviación estándar de 3 mediciones por tratamiento. Repetido 2 veces con similares resultados

Se considera * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$) como indicadores de significancia.

3.2.- Evaluación por TLC de compuestos indólicos

La metodología anterior nos entrega información de la presencia de una serie de compuestos indólicos en el sobrenadante y sugiere en parte, que los efectos observados en el objetivo 2 podrían estar asociados a estos compuestos tipos indólicos. Por lo tanto, a continuación se utilizó una técnica cualitativa, que permite discriminar entre compuestos con mayor detalle que la técnica anterior, al colorear las bandas de una cromatografía de TLC de acuerdo con las sustituciones que posee el grupo indol. Además de permitir comparar la movilidad relativa de dichos compuestos en relación a un patrón.

Para implementar esta metodología, primero se evaluó el límite de detección mediante sucesivas diluciones de IAA. Luego de resolver las muestras en placas de TLC (sección 7), fue posible visualizar IAA a concentraciones de 3 mg/ml y 50 μ g/ml a luz

blanca y como mínimo a 25 µg/ml bajo luz UV (Figura 9), determinándose que el Mr estándar de IAA es de 0,58, en este caso.

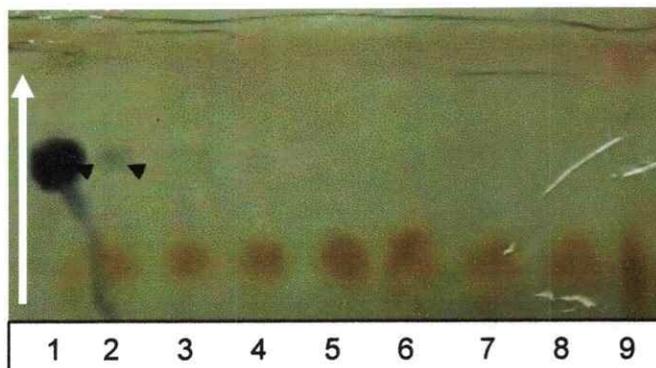


Figura 9. Determinación del límite de detección del compuesto ácido indole acético (IAA) en placas de cromatografía de capa fina (TLC) revelada con reactivo de Salkowski. Las concentraciones de IAA utilizadas fueron: 1) 3 mg/ml, 2) 50 µg/ml, 3) 25 µg/ml, 4) 10 µg/ml, 5) 5 µg/ml, 6) 0,5 µg/ml, 7) 0,05 µg/ml, 8) 5 ng/ml, 9) 0,5 ng/ml. Flecha blanca indica dirección de migración del solvente. Flechas negras indican concentraciones visibles.

Una vez que se determinó el rango de detección y Mr estándar de IAA, se procedió a analizar los sobrenadantes de los cultivos fúngicos obtenidos.

A continuación se evaluó en placas de TLC, los filtrados analizados anteriormente pero también se evaluó si existían diferencias por efecto del medio en el que se crecía el hongo. Para ello, se analizó mediante TLC los sobrenadantes obtenidos del medio MS1X y del medio Vogel1x, un medio mínimo utilizado para crecer hongos.

Primero, se analiza los cultivos propagados en medios sin Trp, donde los extracto de los filtrados (filtrado extraído con acetato de etilo) de ambas cepas (TP y T7) no presentaron manchas que corresponden a la Mr de IAA (Tabla 3). Aunque se observó en el caso de TP que aparecen bandas visibles a la luz UV con mayor movilidad que el estándar de IAA en el medio Vogel 1x, estas bandas no fueron visibles en el filtrado de T7 (Tabla 3).

Luego, se procedió a analizar los sobrenadantes de los cultivos suplementados con Trp. En las muestras provenientes de los cultivos fúngicos líquidos en Vogel 1x con TP aparecen bandas azules y con movilidad similares al estándar IAA, así como también

bandas rojizas-naranja con mayor movilidad que el estándar (Figura 10, carril 2 y 4). Además, se evaluó si parte de los compuestos quedaban en la fase acuosa de la extracción; sin embargo, se descartó esta posibilidad en las siguientes experiencias ya que esta fase no retuvo compuestos indólicos (Figura 10, carriles 3 y 5).

Tabla 3. Valores de movilidad relativa de cada mancha observada en las placas de TLC con muestras provenientes del sobrenadante de cultivos de TP y T7 que no fueron suplementados con triptófano

	Mr			
	TP		T7	
	MS	Vogel	MS	Vogel
Extracto	-	0,87 0,76	-	-
IAA puro	0,7	0,67	0,59	0,62

Puede observarse que para la cepa TP, existe una marcada diferencia en la producción de compuestos (Figura 10, carriles del 1 al 9). En el medio Vogel 1x con Trp, los compuestos son menos variados pero en mayor concentración (Figura 10, carriles 2 y 4), mientras que en el medio MS con Trp aparecen más compuestos a concentraciones detectables solo bajo luz UV y muy levemente a luz visible (Figura 10, carriles 7 y 9).

Por otro lado, en el caso de T7 en el medio MS no se observaron bandas y solo algunas en el medio Vogel 1x Trp (Figura 10, carril 19). En Tabla 4, se detalla la movilidad relativa de las bandas observadas en las placas mostradas en Figura 10.

Dado que el reactivo de Vanurk colorea de igual forma al Trp y al IAA, es que se probó correr ambos por separado. Se observó que IAA avanza entre 0,56 y 0,67 (Figura 10, carril 11), mientras que Trp migra entre 0,47-0,5 (Figura 10, carril 10), demostrando que ambos compuestos son distinguibles bajo las condiciones experimentales empleadas. En los cultivos líquidos inoculados con la cepa TP, se observaron dos

bandas distintivas para IAA y Trp. Primero en el medio Vogel 1x, la fitohormona IAA pura posee un Mr de 0.56 que correspondería a la banda que aparece como 0,58 (Figura 10, carril 2) y 0,59 (Figura 10, carril 4), mientras que en la misma placa, el Trp posee un valor de Mr cercano a 0.4.

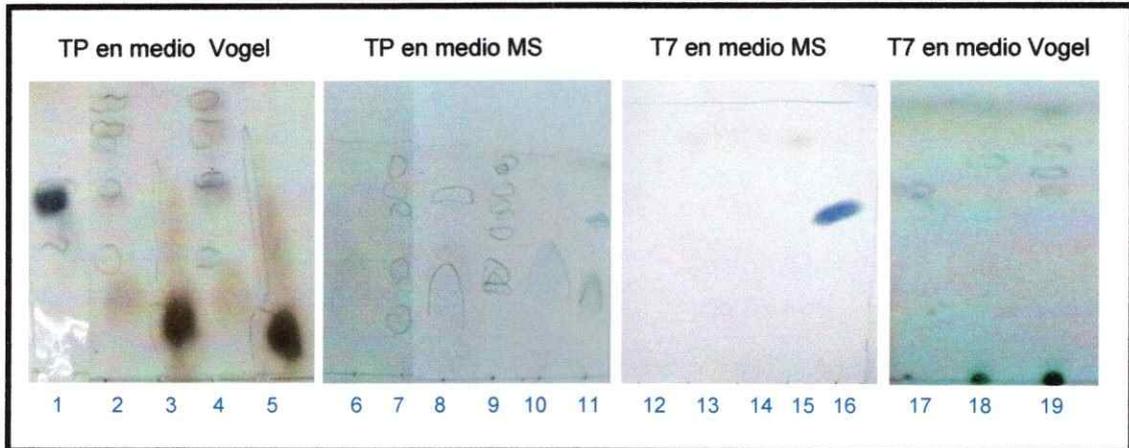


Figura 10. Separación por TLC de muestras provenientes de sobrenadante de cultivos fúngicos suplementados con 100 mg/L (100 Trp) y 200 mg/L (200 Trp) de triptófano para las cepas TP y T7.

1) IAA 3 mg/ml., 2) Extracto de filtrado de cultivo TP en medio Vogel1x-100 Trp, 3) Extracto acuoso de cultivo TP en medio Vogel1x-100 Trp, 4) Extracto de filtrado de cultivo TP en medio Vogel1x-200 Trp, 5) Extracto acuoso de cultivo TP en medio Vogel1x-200 Trp, 6) Filtrado de cultivo TP en medio MS-100Trp, 7) Extracto de filtrado de cultivo TP en medio MS-100 Trp, 8) Filtrado de cultivo TP en medio MS-200Trp, 9) Extracto de filtrado de cultivo TP en medio MS-200 Trp, 10) Triptófano 200 mg/L, 11) IAA 50 µg/ml, 12) Filtrado de cultivo T7 en medio MS-100Trp, 13) Extracto de filtrado de cultivo T7 en medio MS-100 Trp, 14) Filtrado de cultivo T7 en medio MS-200Trp, 15) Extracto de filtrado de cultivo T7 en medio MS-200 Trp, 16) IAA 3 mg/ml, 17) IAA 50 µg/ml, 18) Extracto acuoso de cultivo T7 en medio Vogel1x-200 Trp, 19) Extracto de filtrado de cultivo T7 en medio Vogel1x-100 Trp

Lo mismo ocurre en el medio MS; IAA puro tiene un valor de Mr de 0,67 que se asocia a la banda encontrada en los cultivos suplementados (Mr de 0,71), mientras que Trp avanza hasta los 0,5 (Figura 10, carril 10), asociándose con las bandas que poseen valor de 0,54. El cultivo inoculado con la cepa T7 cultivado en Vogel 1x produjo compuestos indólicos en muy baja concentración. El estándar IAA avanzó hasta un valor de Mr de 0,62 que podría asociarse con las bandas observadas con valor Mr de 0,6 (Figura 10, carril 19).

Tabla 4. Valores de movilidad relativa de las bandas tras separar por TLC muestras provenientes de sobrenadante de cultivos fúngicos suplementados con triptófano (100 y 200 mg/L) para las cepas TP y T7.

	Mr							
	TP				T7			
	MS		Vogel		MS		Vogel	
	100 mg/L	200 mg/L						
Extracto	0.9	0.85	0.9	0.9				
	0.78	0.77	0.82	0.78				0.83
	0.71	0.71	0.75	0.59	-	-	0.75	0.72
	0.46	0.52	0.58	0.4				0.6
IAA puro	0,67		0,56		0,62		0,62	

Se propone que la diferencia en la producción de compuestos indólicos tipo auxinas observados en los diferentes medios puede deberse a que el medio Vogel 1X, cotidianamente utilizado para el crecimiento de hongos, posee la vitamina biotina, un factor de crecimiento esencial para algunos hongos que está ausente en el medio MS1X.

3.3.- Evaluación *in vivo* de compuestos indólicos

Dado que el análisis anterior demuestra la presencia de IAA y otros compuestos tipo indol en los sobrenadantes de los cultivos fúngicos, especialmente en la cepa que promovió el crecimiento de *Arabidopsis* en mayor grado (TP), es que se diseñó un experimento para evaluar si estos compuestos secretados eran capaces de alterar el desarrollo y crecimiento de plántulas, sin la presencia del hongo. Para ello, primero se inoculó de forma exógena sobre las raíces de las plántulas, diferentes diluciones de IAA comercial diluido en medio Vogel 1x como control positivo (Figura 11). Se hizo en medio Vogel 1x basándonos en los resultados del punto 3.2, donde se observó que la cepa TP era capaz de producir IAA en mayor proporción que en MS al compararlo con el patrón en dicho medio (Figura 10). Los tratamientos muestran el efecto dosis dependiente de la fitohormona IAA. A la concentración de 5 ng/ml (30 nM), se obtuvo la

mayor estimulación en el crecimiento de raíces laterales y peso fresco de la planta.

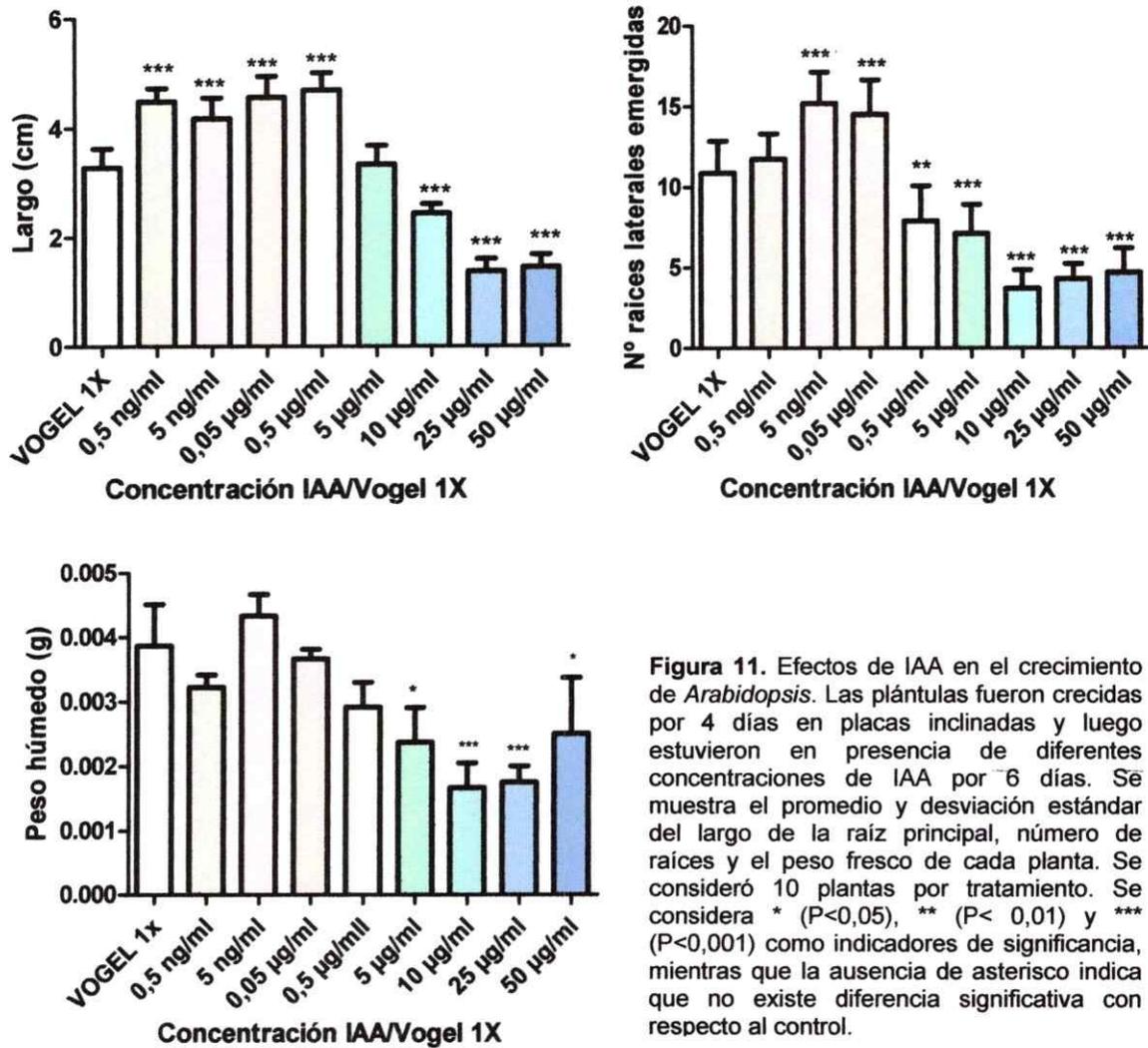


Figura 11. Efectos de IAA en el crecimiento de *Arabidopsis*. Las plántulas fueron crecidas por 4 días en placas inclinadas y luego estuvieron en presencia de diferentes concentraciones de IAA por 6 días. Se muestra el promedio y desviación estándar del largo de la raíz principal, número de raíces y el peso fresco de cada planta. Se consideró 10 plantas por tratamiento. Se considera * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

Se observó además, que a medida que aumenta la concentración de IAA, aparecía una fuerte inhibición en el crecimiento de la raíz principal y raíces laterales, así como también del peso fresco total. A continuación se muestran las fotografías que demuestran el comportamiento descrito anteriormente (Figura 12).

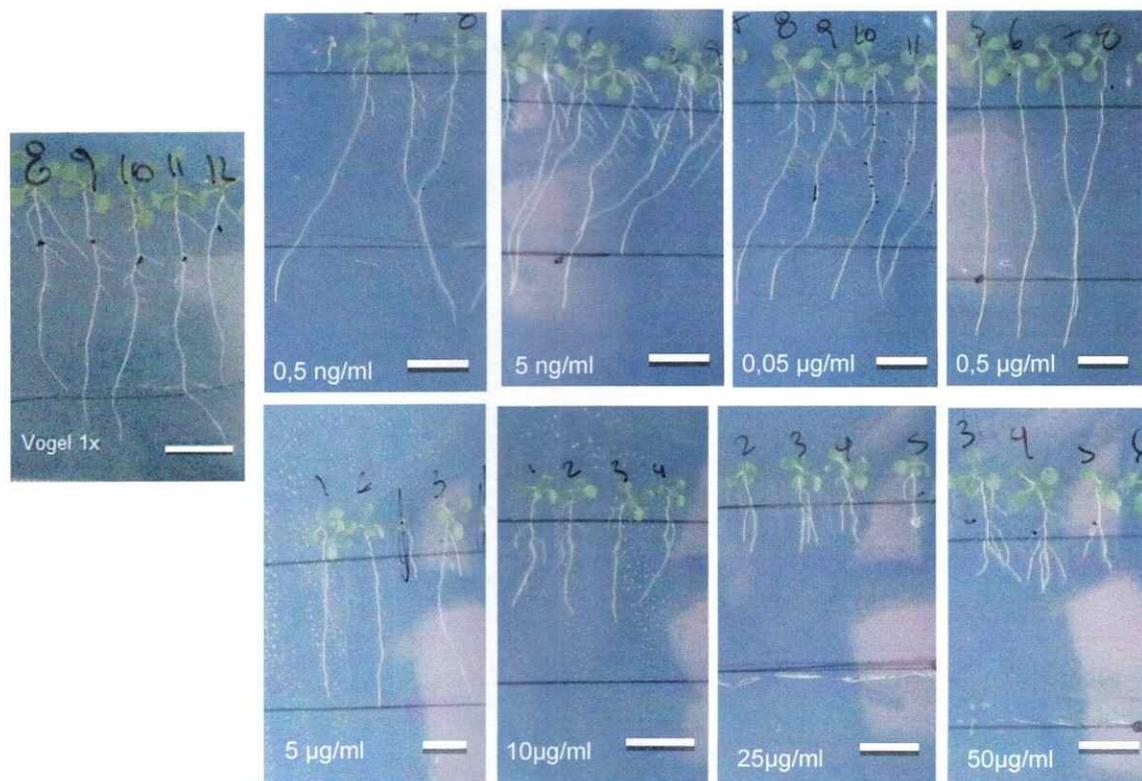


Figura 12. Fotografía de *A. thaliana* en placa crecida con alícuotas de diferentes concentraciones de IAA. En cada fotografía se detalla la concentración de IAA disuelta en medio Vogel 1x utilizada. Barra blanca corresponde a 1 cm. La línea negra superior muestra el largo de las raíces al momento de agregar la alícuota (4 d) y la línea negra inferior muestra el lugar donde se agregó IAA (a 2,5 cm de la línea superior). Las placas fueron fotografiadas luego de 6 d en presencia de IAA.

Una vez que conocíamos los efectos de agregar IAA exógeno sobre las plántulas (Figura 11), sumado a que los cultivos del hongo en medio Vogel 1x eran capaces de estimular en mayor medida la producción potencial de compuestos indólicos tipo IAA (Figura 10, carril 2 y 4), es que se propuso inocular directamente sobre las plántulas los sobrenadantes filtrados que habían sido cultivados en medio Vogel 1x con esporas de la cepa TP (10^6 esporas/l). Se inocularon los filtrados a 2,5 cm de la raíz al día 4 de post-siembra (sección 5.3).

En Figuras 13 y 14, se muestra la evaluación de las plántulas tras 6 días de interacción con el control con Vogel 1x, un segundo control con la concentración a la cual IAA mostró ser estimulante (5 ng/ml; Figura 11) y los filtrados.

En las fotografías y el gráfico es posible observar directamente que el filtrado suplementado con 200 mg/l tiene un efecto inhibitorio en el largo de las raíces principales (Figura 13 y 14 A). Este fenotipo es muy similar al observado en la Figura 12 a altas concentraciones de IAA comercial. En cuanto a las raíces laterales, las plántulas tratadas con IAA 5 ng/ml presentaron mayor estimulación, mientras que los filtrados sin y con Trp no presentaron valores significativamente mayores que el control (Vogel 1x; Figura 13 y 14B). El peso fresco presentó un mayor peso en el filtrado no inducido, mientras que los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas, pero es posible ver en los promedios una tendencia estimulante provocada por los filtrados (Figura 14C).

Luego, se analizó la relación entre la raíz principal y las raíces laterales, observándose que las plántulas tratadas con IAA 5 ng/ml, filtrados inducido con 0 y 200 mg/ml presentaban un aumento significativo de la densidad de raíces comparado con el control.

Aunque este resultado preliminar requiere repetición considerando un mayor número de muestras, se demuestra que este diseño experimental es un sistema útil para entregar información relevante sobre las capacidades de cepas de *Trichoderma* de provocar efectos en el crecimiento de la planta.



Figura 13. Fotografías de plántulas de *A. thaliana* en placa crecidas con filtrados fúngicos. Los filtrados fúngicos fueron cultivados en medio Vogel 1x con 0,5% de sacarosa con una concentración final de esporas de la cepa TP de $10^6/l$. Los cultivos fueron suplementados con 0 mg/l, 100 mg/l y 200 mg/l de Trp. Se agregó un control de hormona IAA (5 ng/ml) diluida en medio Vogel1x. Se consideró 10 plantas por tratamiento. En la parte superior de cada placa se detalla el filtrado o control agregado a cada sección. Barras blancas corresponden a 1 cm.

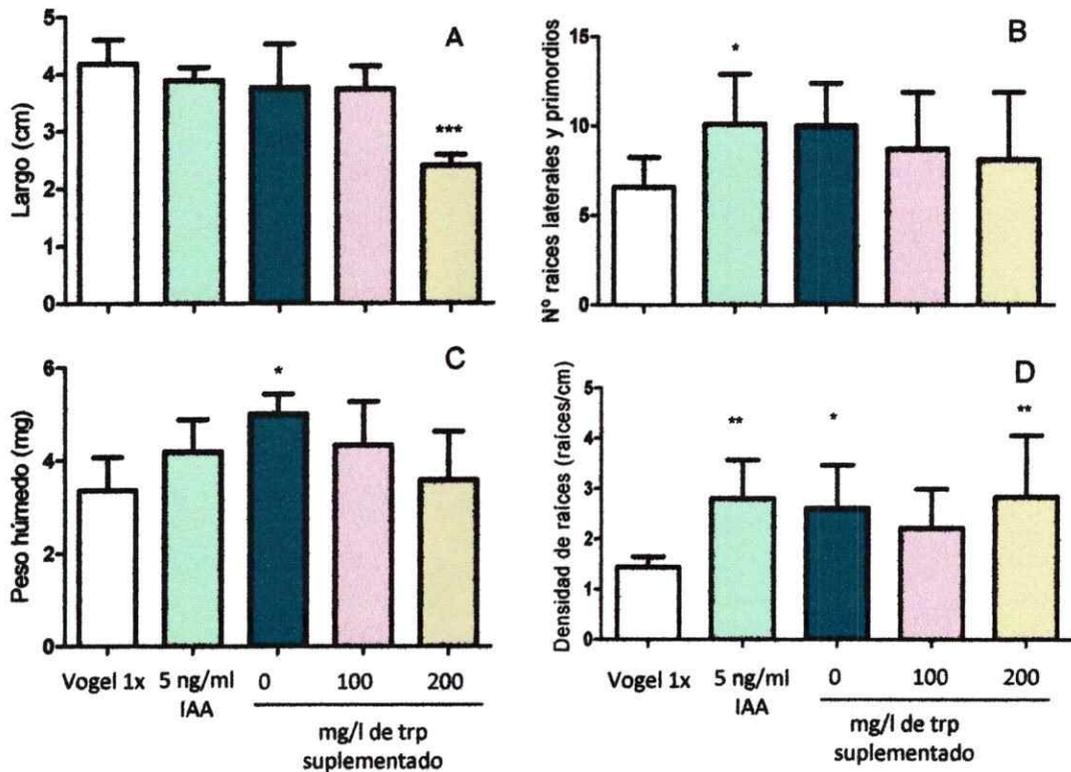


Figura 14. Efectos de los sobrenadantes filtrados provenientes de los cultivos fúngicos líquidos sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. Los cultivos líquidos utilizados corresponden a medio Vogel 1x con 0,5% de sacarosa inoculado con una concentración final de esporas de 10^6 esporas/l de la cepa TP, suplementados con 0 mg/l, 100 mg/l y 200 mg/l de Trp, Se agregó un control de hormona IAA (5 ng/ml) diluida en medio Vogel 1x. Se muestra en el promedio y desviación estándar de: A) Largo de la raíz principal, B) Número de raíces laterales, C) Peso húmedos y D) Densidad de raíces de las 10 plántulas analizadas para cada tratamiento. Se considera * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con

Objetivo 4:

Análisis por qRT-PCR de los cambios en la expresión génica de *Attir1*, *Atpla2* y *AtcycB1;1* en raíces de *Arabidopsis thaliana* interactuando con *Trichoderma*.

La interacción entre los simbioses *A. thaliana* y *Trichoderma* promueve la expresión de una serie de genes vinculados con diferentes procesos en ambos componentes (Druzhinina. I. y col., 2011). En este caso se propuso hacer estudios que permitan dilucidar en parte los efectos de esta interacción evaluando los cambios en la

expresión de tres genes presentes en *A. thaliana* al estar en presencia de distintas cepas, y diferentes concentraciones de *Trichoderma*. Uno de ellos está asociado a la vía de recepción y señalización de las auxinas y respuesta a estrés como *Attir1*, otro ligado al proceso de división celular como *AtcycB1;1* y finalmente un gen reconocido por su participación en el proceso de crecimiento de raíces laterales, *Atpla2* (Ver Introducción, sección: Las auxinas y la selección de marcadores en plantas).

Primero, se diseñaron los partidores de qRT-PCR para amplificar un fragmento de cada gen. Luego, para probar los partidores, se realizó un PCR utilizando cDNA de *Arabidopsis* como templado. Al secuenciar los tres productos de PCR, y alinear las secuencias con las depositadas en TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), se comprobó que los tres amplicones corresponden efectivamente a los genes blanco (Anexo1-Imagen suplementaria 1).

Segundo, utilizando RNA extraídos de raíces de *A. thaliana* que han estado en presencia (o no) de las cepas TP o T7, se llevó a cabo la retro-transcripción y luego el análisis de expresión relativa de los genes escogidos como marcadores de la interacción de *Trichoderma* con las plántulas, mediante qRT-PCR (Figura 15). Para este análisis se evaluaron 3 normalizadores probados por Czechowski y col. (2005) para la validación de qPCR: *UBI10*, *PP2A* y *At4g26410*. Mediante el programa NormFinder (complemento de Excel), se identificó entre los candidatos al gen *UBI10* como el normalizador óptimo para este experimento.

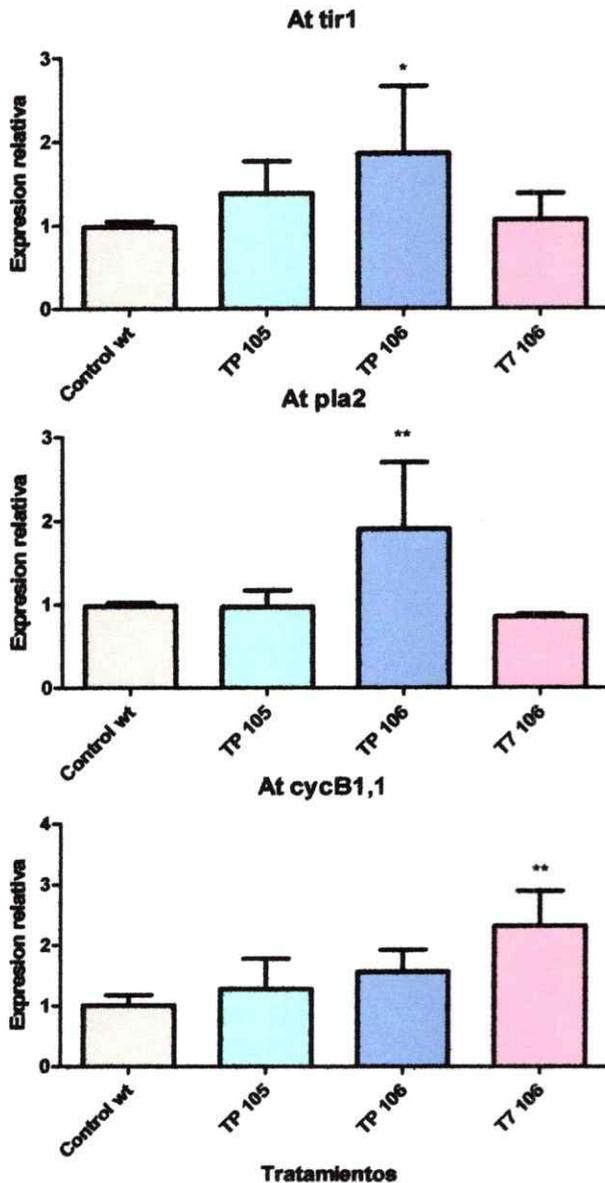


Figura 15. Análisis de expresión relativa de tres genes vegetales en la interacción entre plántulas de *A. thaliana* inoculadas con diferentes tratamientos de hongo *Trichoderma*: Cepa T7 a una concentración de 10^6 esporas/ml (T7 106) y cepa TP a una concentración de 10^5 esporas/ml (TP 105) y 10^6 esporas/ml (TP 106). Control de agua destilada.

Se extrajo el RNA total de raíces de plántulas de *A. thaliana* inoculadas con los tratamientos de *Trichoderma* los que se sometieron independientemente a qRT-PCR para cuantificar la expresión de tres genes relacionados con los posibles efectos en plantas provocados por la presencia del hongo. Para ello se escogieron los siguientes genes: uno relacionado con la recepción de auxinas (*Attir1*), un marcador de aparición de raíces laterales (*Atp1a2*) y marcador de mitosis (*AtcycB1;1*). El resultado representa el promedio de experimento hecho en triplicado biológico para los genes *Attir1* y *Atp1a2*, y en duplicado biológico para el gen *AtcycB1;1*. Para todas se consideró triplicado técnico. Normalizador UBI10 fue elegido mediante el algoritmo utilizado por el programa NormFinder. Se considera *($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) y *** ($P < 0,001$) como indicadores de significancia, mientras que la ausencia de asterisco indica que no existe diferencia significativa con respecto al control.

En cuanto a la expresión relativa del gen asociado a la recepción de auxina y respuesta a estrés *Attir1*, se observó que la expresión es significativamente mayor (*, $P < 0.05$) en los tratamiento en los que se inoculó una mayor concentración de esporas de la cepa TP (10^6 esporas/ml), efecto que no se observó en los tratamientos cuyo inóculo contenía una menor concentración de la misma cepa (10^5 esporas/ml), ni tampoco cuando se inoculó 10^6 esporas/ml de la cepa T7. Si consideramos los valores

promedios del tratamiento control (Agua destilada) y TP106 en proporción, se obtiene que la expresión de *Attir1* en este último aumenta un 131% sobre el control, pero con una desviación estándar considerable. Dado que la proteína Attir1 es reconocido por su participación en la recepción de auxinas en las raíces, sumado al leve aumento en el nivel de expresión de sus transcritos observados en presencia del hongo, es que se propone que no es necesario un cambio dramático en su expresión para que las plántulas perciban los estímulos del hongo asociados a auxina. Por lo tanto, la planta estaría percibiendo levemente más las auxinas con respecto al control lo que se podría traducir en un aumento en la expresión de genes río debajo de Attir1.

Se evaluó también la expresión relativa en raíces de *Atpla2*, reconocido por su participación en el proceso de crecimiento de raíces laterales. Se observó que los tratamientos TP105 y T7106 presentan una expresión relativa similar al control sin diferencias significativas. Sin embargo, el tratamiento en el que se inoculó TP 106, la expresión relativa del gen aumentó significativamente (**, $P < 0,01$) alcanzando un aumento del 98% sobre el control. Los resultados de expresión relativa de este gen se corresponden con lo observado en la Figura 4, donde se observa que el número de raíces laterales de los tratamientos TP105 y el control tienen valores muy similares, mientras que T7106 presente menos raíces laterales, a la vez que el tratamiento TP106 presenta un número mayor de raíces laterales.

Muy distinto es el comportamiento observado para el tercer gen estudiado, *AtcycB1;1*, que se utilizó como marcador de división celular, presuponiendo que un mayor número de raíces implicaría aumentar la expresión de la maquinaria asociada a ciclo celular. En este caso, se observó que el tratamiento con T7106 presente una expresión relativa significativamente mayor que el control aproximadamente de un 130%, mientras que

los tratamientos con la cepa bioestimulante, TP no presentan diferencias significativas con respecto al control.

En su conjunto, estos datos demuestran claramente que existen variaciones cepa-específicas en el transcriptoma de plántulas de *A. thaliana* cuando interactúa con *Trichoderma*.

DISCUSIÓN

Cualidades de la diversidad microbiológica nacional

La diversidad microbiológica presente en Chile posee características únicas determinadas por la amplia heterogeneidad geográfica y climática de nuestro país. Dicha diversidad nos permite encontrar en la microbiota nativa cualidades exclusivas que nos entregan ventajas comparativas con respecto a otros países. Poder determinar los beneficios asociados a las diferentes especies del suelo podría permitirnos generar nuevas formas de agricultura sustentables y sanas para la tierra, así como también para las personas que hacen uso de esta misma.

En este seminario de título se analizaron algunos beneficios asociados a la microbiota nativa ligada al reino de los hongos, con el fin de poder rescatarla. Específicamente, se evaluó el género *Trichoderma*, y de las cepas fúngicas analizadas fue posible determinar que algunas poseen características similares a las descritas en la literatura, como por ejemplo efectos bioestimulantes (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009).

Obtención de cultivos puros de esporas *Trichoderma*

En el proceso de aislamiento y obtención de las cepas del hongo *Trichoderma* utilizadas en este trabajo, se determinó que es posible aislar cepas puras a través de sucesivas diluciones y aislamiento hasta obtener cultivos monoespóricos y que estos últimos pueden cultivarse hasta obtener una alta concentración de esporas, sin contaminantes (Figura 1).

Cualidades simbióticas entre *A. thaliana* y *Trichoderma*

Posteriormente, se analizaron los efectos simbióticos de *Trichoderma* con un organismo perteneciente al reino plantae. Para ello, se evaluaron los cambios

fenotípicos generados en plántulas de *A. thaliana* que habían estado en contacto durante su crecimiento con cepas de *Trichoderma*. Para algunas cepas, existían variaciones en el crecimiento vegetal asociadas a un efecto bioestimulante positivo como un mayor número de raíces laterales, donde estos efectos positivos no eran propios de una especie en particular, sino que era un comportamiento presente en diferentes cepas pertenecientes a diferentes especies como *T. harzianum* (TH, TF y T6), *T. citrinoviride* (TP), *T. neozelandeae* (T1a) y *T. atroviride* (TC). De ellas, las cepas TP (a 10^6 y 10^7 esporas/ml) y TH (a 10^5 y 10^7 esporas/ml) promovieron la aparición de un mayor número de raíces laterales, sobre todo al inocularlos en la menor concentración (Figura 4). La cepa T1a presentó un comportamiento muy similar a TP, mientras que TF mostró un comportamiento similar a TH. Interesantemente, estos pares nombrados presentan cercanía en el árbol filogenético (Figura 7). Las otras cepas que presentaron efectos estimulantes fueron TC (*T. atroviride*) y T6 (*T. harzianum*) a una concentración de 10^6 esporas/ml. Se postula que, la estimulación del crecimiento a concentraciones menores de esporas de ciertas cepas podría estar vinculado a la concentración de compuestos indólicos secretados por los hongos, un efecto que fue analizado directamente en este seminario de título (ver más adelante sección: Compuestos secretados al medio por el hongo). Pero no se descarta la regulación de otras vías de síntesis o degradación de fitohormonas como etileno, citoquinina, entre otros.

Al comparar el comportamiento estimulante de las cepas TP (10^6 esporas/ml- *T. citrinoviride*) y TH (10^5 esporas/ml – *T. atroviride*) con lo descrito en la literatura, en estas se observó que el número promedio por planta de raíces laterales era 18 y 16,8 respectivamente, comparado con el control que presentó 11.4 raíces laterales

promedio (Figura 4). Por otro lado, en condiciones muy similares el grupo Contreras-Cornejo H. A. y cols (2009), publicó que la cepa utilizada perteneciente a la especie *T. atroviride* estimulaba en promedio 11 raíces laterales por planta, en relación a un control de 2 raíces laterales por planta. En el experimento desarrollado en este seminario, las plantas control poseen en promedio mayor número de raíces laterales que las descritas en la literatura. Sin embargo, es posible observar un efecto estimulante y las raíces emergidas en promedio se observan de mayor longitud que las raíces presentes en el control (datos no mostrados). Esto último se corresponde en parte con lo propuesto por el trabajo de Contreras-Cornejo H. A. y cols (2009), quienes sugieren que *Trichoderma* promueve la ramificación de las raíces en *A. thaliana* induciendo el crecimiento de raíces laterales, más que inducir la formación de novo de primordios.

No todas las cepas nativas estudiadas fueron bioestimulantes. De hecho, un comportamiento completamente opuesto se obtuvo para las cepas T9 (*T. atroviride*) y T7 (*T. harzianum*), en las que se observaron determinados efectos fenotípicos negativos en el crecimiento de *A. thaliana* como una menor densidad de raíces y peso húmedo (Figura 5 y 6). Una conducta singular se observó en las cepas T7 y T9 ya que al agregar una concentración menor de hongo, el efecto negativo en la estimulación se intensificaba. Posiblemente los efectos negativos observados se deban a que no se probó la concentración requerida para observar efectos beneficiosos. Otra explicación, sugiere que dichas cepas no poseen efectos estimulantes sino que como se ha descrito anteriormente, éstas funcionan como biocontroladores (datos no publicados -

Pasantía Universidad Técnica de Viena de Gabriel Pérez) alterando la homeostasis hormonal de la planta en desmedro del crecimiento (Bolton. M. D., 2009).

Pudo observarse también que las plantas, al ser inoculadas independientemente con las cepas de *T. harzianum* T2 y T10a, a altas concentraciones, mostraron un fenotipo con baja estimulación de raíces laterales, pero cuando se redujo la concentración de esporas el efecto estimulante aumentó hasta igualarse al control. Posiblemente, estas cepas no tengan efectos estimulantes aunque no se descarta otros efectos comunes del género.

Los efectos observados en las plántulas concuerdan con estudios anteriores, que han revelado que cepas de *T. harzianum* inducen el crecimiento de plantas asociadas a la horticultura como tomate, rábano, pimentón, entre otros (Baker. R. y col., 1984; Chang. Y. y col., 1986). Así como también, se ha descrito que cuando se inocula plántulas de *A. thaliana* con cepas de *T. atroviride*, éstas presentan un fenotipo característico de tratamientos con auxinas que incluyen un aumento de la biomasa y estimulación de raíces laterales (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009). Sin embargo, nada se ha descrito con respecto a los efectos de cepas de las especies *T. citrinoviride* (TP) o *T. neozelandeae* (T1a) en el desarrollo de plantas, y por esta razón se enfocaron los estudios en este seminario en caracterizar química y molecularmente la interacción entre una de ellas, TP, y *A. thaliana*. La cepa TP presentó efectos estimulantes en 2 de las 3 concentraciones probadas (10^6 y 10^7 esporas/ml; Figuras 4, 5 y 6), y se escogió la cepa T7 que no mostró efectos bioestimulantes en ningún caso.

Compuestos secretados al medio por el hongo

En aquellos casos en que se observaron efectos estimulantes, se propone que podría relacionarse fuertemente con la producción de ciertos compuestos tipo auxinas como los identificados en *T. atroviride*, *T. virens* (Contreras-Cornejo, H. A. y col., 2009; Salas-Marina, M. A. y col., 2011) y *T. harzianum* (Vinale, F. y col., 2008), en las que se ha observado que los compuestos producidos por dichas especies son capaces de estimular el crecimiento de las plantas y el desarrollo de la raíz. Diferentes cepas podrían poseer diferentes tasas de crecimiento o ser capaces de producir en un nivel basal o potencial, diferentes cantidades de auxinas. Para demostrar si las cepas escogidas poseían un efecto estimulante que pudiera asociarse a la producción de auxinas, se las cultivó en medios líquidos y se evaluó la producción de dichos compuestos en presencia y en ausencia de un inductor de la vía de su síntesis, Trp.

Inicialmente, se evaluó la presencia de compuestos indólicos mediante un método cuantitativo utilizando espectrofotómetro. En los cultivos líquidos con las cepas escogidas, pudo observarse que la producción de compuestos indólicos tipo auxinas era dependiente de la especie inoculada (Figura 8). Específicamente, se analizó la presencia de IAA según lo describe la literatura (Glickmann, E. y Dessaux, Y., 1995) para espectrofotometría. Para ello se comparó con una curva estándar, determinándose la producción de ambas cepas en medio MS 1x. En el cultivo de la cepa TP con un inóculo inicial de 10^6 esporas/l, estimulado con 200 mg/l de Trp, triplicó la producción basal de IAA. No ocurrió lo mismo para la cepa T7 de *T. harzianum* con igual inóculo inicial, donde al estimular con Trp solo duplicó la producción basal de esta fitohormona.

En el trabajo realizado por el grupo de Salas-Marina y col. (2011) se detectó una cepa con efectos bioestimulantes, ésta se inoculó (10^8 esporas) en medio líquido Ms1x con y sin Trp, obteniéndose tras filtrar una producción de compuestos indólicos cercana a $11,9 \mu\text{g/ml}$ en cultivos filtrados de *T. atroviride* sin suplemento. Por otro lado, en aquellos cultivos suplementados con Trp, aumentó considerablemente la producción de este tipo de compuesto alcanzando los $23 \mu\text{g/ml}$. Aunque en este seminario se agregó menor cantidad de esporas en el inóculo inicial, 10^5 esporas (10^6 esporas/L) y una cepa perteneciente a otra especie: *T. citrinoviride*, la producción basal fue de $6,3 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, mientras que al inocular con Trp la producción de los compuestos alcanzó $19,7 \mu\text{g/ml}$. Es así que con un inóculo inicial menor, se detectaron niveles similares de producción de compuestos indólicos. Aunque debe considerarse que pueden existir diferencias en el protocolo de ambos trabajos, se observa que el comportamiento de las cepas del género es potenciado al suplementar los medios, y la producción de los compuestos aumenta para los casos en que se utilizó cepas estimulantes.

Con el resultado anterior se determinó que la capacidad del hongo *Trichoderma* para producir compuestos indólicos en medio MS 1x varía cuando se suplemento el medio con el inductor (Trp). Pero más interesante aun, es que nos entrega información del efecto simbiótico potencial en presencia de la planta, donde estas últimas participarían como inductores de la producción de compuesto indólicos. Finalmente y no menos importante es que los hongos son capaces de producir los compuestos y liberarlos al medio durante su crecimiento

Para evaluar el comportamiento de estos cultivos, se probó una metodología cualitativa utilizando placas de cromatografía a las que se les aplicó un revelador tipo Salkowski,

que permite confirmar la presencia de determinados compuestos indólicos, como por ejemplo: revela IAA como una mancha azul y otros compuestos indólicos con diferentes tonalidades que van desde el azul al rojo (Ehmann. A., 1977).

En los cultivos de TP en medio Vogel 1x, la intensidad de dicha banda era dependiente de la cantidad de inductor agregada al medio de cultivo (Figura 9, carril 2 y 4), pero este mismo efecto no se observó en el caso de la cepa T7 (Figura 9, carril 17 y 18). En el caso de los cultivos líquidos en medio MS 1x, se observó que la cepa T7 no era capaz de producir compuestos visibles por esta técnica. Sin embargo, se observó un número mayor de manchas en el caso de la cepa TP en medio MS 1x, por lo que se propone que podría ser capaz de producir un número mayor de compuestos diferentes (visibles bajo luz UV) de los cuales algunos reaccionan con el reactivo de Salkowski, pero otros no reaccionan. Posiblemente se deba a que no corresponden a compuestos indólicos o en el caso de serlo están en una concentración mínima. De lo anterior, se concluye que la producción y concentración de compuestos indólicos es dependiente del medio de cultivo utilizado para crecer el hongo, MS 1x o Vogel 1x, siendo mayor este tipo de compuesto en el último como se observa en las placas.

Dado que ambas formas de determinación permiten identificar compuestos indólicos, se considera que es posible observar falsos positivos, porque el reactivo Salkowski reconoce una gran variedad de compuestos indólicos que podrían superponerse, pero es una técnica funcional fácil de realizar en el laboratorio y que puede resolverse mediante GC-MS.

De las placas es posible inferir que la concentración de compuestos indólicos como IAA en cultivos líquidos en medio Vogel 1x, debería ser mayor que la encontrada en los cultivos líquidos en medio MS 1x.

Por lo que a continuación se evaluó el fenotipo de las raíces de las plántulas inoculadas de forma exógena con diferentes diluciones de IAA comercial diluido en medio Vogel 1x, como "curva de calibración" para las pruebas de filtrados. En los tratamientos, se observó un efecto dosis dependiente de la fitohormona IAA (Figura 11 y 12). A la concentración de 5 ng/ml (30 nM), se obtuvo la mayor estimulación en el crecimiento de raíces y peso fresco de la planta. A medida que aumentó la concentración de fitohormona pudo observarse una fuerte inhibición en el crecimiento a nivel de raíz principal y raíces laterales, así como también del peso fresco total (Contreras-Cornejo. H. A. y col., 2009).

Considerando los datos anteriores, se buscó determinar preliminarmente, si los filtrados (sin concentrar) de cultivos líquidos de la cepa TP en medio Vogel 1x eran capaces de provocar cambios en el crecimiento de plántulas de *A. thaliana*. Una vez que conocíamos los efectos de agregar IAA exógeno sobre las plántulas (Figura 11) y que los cultivos del hongo en medio Vogel 1x eran capaces de estimular en mayor medida la producción potencial de compuestos indólicos tipo IAA (Figura 9), es que se evaluó la inoculación directa de los sobrenadantes filtrados que habían sido cultivados en medio Vogel 1x con esporas de la cepa TP (10^6 esporas/l) sobre las plántulas (Figura 13). Se observó que el filtrado suplementado con 200 mg Trp/l tuvo un efecto inhibitorio en el largo de las raíces principales y se produjo un fenotipo muy similar al observado en la Figura 12 a altas concentraciones de IAA. En cuanto a las raíces laterales, las plántulas tratadas con IAA puro presentaron mayor estimulación (Figura

14B), mientras que los filtrados sin y con Trp no presentaron diferencias significativas en relación al número de raíces laterales (Figura 14B), pero interesantemente se observa que los tratamientos con 5 ng/ml de IAA y los tratamientos con los sobrenadantes inducidos con 0 y 200 mg/l de trp presenta una mayor densidad de raíces laterales (Figura 14D). Por otro lado, el peso fresco no presentó diferencias significativas, en gran parte de los tratamientos, pero es posible ver una tendencia estimulante provocada por los filtrados y un efecto significativo para el tratamiento inducido con 0 mg/l de trp (Figura 14C).

Este resultado es preliminar y requiere de repetición, sin embargo, se demuestra que este diseño experimental es un sistema útil para entregar información relevante sobre las capacidades de cepas de *Trichoderma* de provocar efectos en el crecimiento de la planta. Posiblemente el efecto estimulante del sobrenadante de los cultivos de la cepa TP se ve atenuado, si lo comparamos con los efectos inducidos por el hongo mismo, dado que en presencia de ambos organismos simbioses, existe una regulación fina de la expresión de los genes vinculados en dichos efectos. Además los cultivos no solo contienen medio y compuestos indólicos sino que también pueden contener otros compuestos que pueden interferir en el efecto final. Un ejemplo de ello es la presencia de ACC deaminasa que se ha descrito como un metabolito secretado por *Trichoderma*, este provoca un efecto completamente opuesto a la señalización por auxina (Hermosa. R. y col., 2012). Alternativamente, el efecto puede ser debido a la presencia de Trp, considerando la presencia de una cantidad de Trp mínima (Como puede observarse en las placas de TLC). Se ha descrito que 10 mg/l (50µM) es una cantidad suficiente para duplicar la cantidad de raíces laterales de plantas de *A. thaliana* en medio MS1X (Honda. H. y col., 2011). Se ha demostrado que al agregar IAA exógeno directamente

en suelos con plantas de trigo, este es asimilado y conjugado en planta. Pero al agregar el precursor Trp este produce un efecto mucho menor al que significa agregar IAA exógeno. La respuesta positiva al agregar Trp se debe a la presencia de microorganismos que transforman el Trp en auxinas disponibles (Martens. D. y Frankenberger. W., 1994). Considerando lo anterior, se evaluó el efecto de 10, 100 y 200 mg/L de Trp directamente sobre las plantas para descartar efectos relacionados con la estimulación de trp. De dicha experiencia, se observó que el crecimiento de las plántulas tratadas o no con trp no tienen diferencias significativas comparados con el control (datos no mostrados).

Además, sería importante repetir este experimento con la cepa no estimulante T7, para analizar si la carencia relativa de compuestos indólicos en el medio de cultivo (Figura 9) se traduce en efectos reducidos al aplicar dicho medio a plántulas de *A. thaliana*.

Genes involucrados en la interacción simbiote

Finalmente, se evaluó a nivel molecular determinados efectos de la interacción de *Trichoderma* con plántulas de *A. thaliana*, monitoreando los cambios en la expresión relativa de tres genes marcadores. Teniendo especial cuidado en amplificar solo los genes de *A. thaliana* y no los del hongo, se secuenciaron todos los productos de PCR y se corroboró que concordaban con la información presente en las bases de datos: TAIR y Blast de NCBI.

El producto de uno de los genes escogidos *Attir1* pertenece a un pequeño grupo de receptores de auxina que contiene una caja F (AFB - Auxin Signaling F-box) y que funciona como un componente proteico del complejo ubiquitin ligasa Skp1-Cullin1-F-

box (SCF). AtTIR1 regula la señalización por auxina mediante la proteólisis de los represores auxina/ácido indole-3-acético (Aux/IAA) que permite liberar la actividad de los factores de respuesta a auxina (ARFs)(Chen. Z. y col., 2011). Con este gen, se evaluó si las plantas poseían iguales niveles de percepción de auxinas, pues se ha demostrado que *Trichoderma* es capaz de desencadenar respuestas dependientes de SA en ausencia de patógenos (Hermosa. R. y col., 2012). Este último influye directamente en la expresión de *Attir1*, ya que el SA inhibe la biosíntesis de IAA en plantas e independientemente de la expresión de miR393, reprime la expresión de *Attir1* (Kazan. K. y Manners. J., 2009). Los resultados obtenidos descartan que respuestas dependientes de SA estén afectando la percepción de auxinas en las raíces, ya que no se observó inhibición de la expresión al compararlo con el control (Figura 15). Se determinó además, que el tratamiento en el que se había observado efecto estimulante (TP106; Figura 4 y 5) presentaba un aumento significativo en expresión con respecto al tratamiento sin hongo (control; Figura 15). Posiblemente, un cambio leve de expresión haga una diferencia visible en plántulas en crecimiento, pero sería interesante evaluar la expresión transcripcional de genes inmediatamente río abajo de este receptor que responden rápidamente a auxina, para poder comparar este leve aumento con un efecto real en la vía de señalización por auxinas. Los genes candidatos para ello son: LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18 (LBD16/ASL18) y/o. LBD29/ASL16 en raíces ya que ambos son regulados transcripcionalmente por dos factores de respuesta a auxina (ARF): ARF7 y ARF19. Estos últimos funcionan como activadores transcripcionales de respuesta temprana a auxina en la formación de raíces laterales (Okushima. Y. y col., 2007; Kieffer. M. y col., 2010).

Una explicación posible a las pequeñas diferencias observadas en la expresión de *Attir1* en los diferentes tratamientos es la presencia de miRNA. Se ha descrito que existe una familia conservada en diferentes plantas denominada miR393 que en *A. thaliana* está codificada por dos loci, MIR393a y MIR393b (Chen. Z. y col., 2011). Se han identificado y validado que 4 genes receptores de auxina como *Attir1*, AFB1, AFB2 y AFB3 son blancos de miR393. Este último produce dos miR393 maduros idénticos, pero la activación de uno u otro locus es específica. Por un lado, la presencia de patógenos induce la activación de la transcripción del locus MIR393a mientras que cuando la planta es tratada con IAA, se activa la transcripción de MIR393b (Chen. Z. y col., 2011). En una publicación anterior, se evaluó el efecto en la acumulación de miR393 y los niveles de *Attir1* en plántulas de *A. thaliana* frente a tratamientos de IAA exógena. Se determinó por qRT-PCR que no existían cambios significativos en los transcritos de *Attir1* después de un tratamiento con una alta concentración de auxinas (10 μ M). Pero a continuación cuantificaron los transcritos de *GUS* que estaban bajo el promotor de *Attir1*, en los que se encontró que aquellos tratamientos con auxina poseían mayores niveles de actividad de sus promotores, lo que indica que tratamientos con IAA exógena aumenta la transcripción de *Attir1* en raíces por lo que proponen que miR393 estaría contribuyendo a la homeostasis de mRNA en respuestas a altas concentraciones de IAA (Chen. Z. y col., 2011). Considerando la información anterior, se propone que la cepa TP es capaz de producir mayores niveles de compuestos indólicos, estimulando la transcripción de *Attir1* a un nivel mayor que los otros tratamientos. Esto se refleja en una mayor expresión relativa a nivel molecular mientras que a nivel fenotípico se presenta como un efecto estimulante, pero dada la

presencia de estos reguladores negativos, los niveles de expresión relativa se mantienen cercanos a los obtenidos con los demás tratamientos.

Se ha descrito que las células del periciclo se expanden y dividen dando forma a las raíces laterales cuando son tratadas con auxina (De Smet. I., Tetsumura.T., y col., 2007). Es por ello que se evaluó la expresión de *Atp1a2*, un gen relacionado con el comportamiento anterior. Este último ha sido definido como un marcador de aparición de raíces laterales, ya que codifica para una enzima modificadora de pared celular y se ha propuesto que participaría en el rompimiento de la lamela media rica en pectina (Laskowski. M. y col., 2006). En los resultados obtenidos por qRT-PCR, se observó que la expresión del gen en cada tratamiento concordaba fuertemente con los resultados obtenidos al analizar el fenotipo (Figura 15 y 4). Los tratamientos TP105 y T7106 presentan una expresión relativa similar al control sin diferencias significativas (Figura 15), mientras que en el tratamiento en el que se inoculó TP106, la expresión relativa del gen en raíces es significativo alcanzando un aumento del 98% sobre el control. . Estos resultados nos indicarían que aquellas plantas tratadas con TP106 poseen mayor expresión de este gen que participa en el proceso de crecimiento de raíces laterales, lo que podría explicar los efectos observados en el fenotipo (Figura 4 y 5). Este resultado se corresponde con lo observado por qRT-PCR por Laskowski (2006), donde *Atp1a2* aumenta su expresión debido a la presencia de IAA. Por ello, es posible relacionar el efecto observado con la vía de señalización de las auxinas, ya que plántulas de la mutante *solitary root (slr-1)* que posee ganancia de función de factor AUX/IAA14 en presencia de auxinas, son defectuosas en la formación de raíces laterales y poseen una drástica reducción en la inducción de *Atp1a2*. Por lo anterior, se

propone que *Atp1a2* está río abajo de la acción de AUX/IAA14, mientras que este último es degradado por la acción de AtTIR1 al percibir auxinas (Fukaki. H. y col., 2002). Con dicha información, podemos determinar que existe una mayor expresión de los genes río abajo de *Attir1* en presencia del tratamiento TP106, comportamiento que no se observa en los demás tratamientos posiblemente debido a que la producción de auxina de dichos tratamientos no es suficiente para activar al receptor y por lo tanto, tampoco de los genes que se encuentran río abajo.

Además se propone que la cepa T7 podría estar actuando mediante la degradación de ACC, el precursor de la biosíntesis de etileno, cuya vía conduce a la activación de la vía de señalización por SA (Hermosa. R. y col., 2012), la que a su vez inhibe la expresión de AtTIR1 y con ello toda la vía río abajo de este mismo. Como la cepa T7 produce niveles menores de auxina (Figura 9 y 10) posiblemente no es capaz de revertir los efectos provocados por la señalización dependiente de SA, y finalmente la interacción entre organismos simbioses depende de la homeostasis a la que puedan llegar con los elementos que cada uno de ellos presenta.

El tercer gen analizado fue *AtcycB1;1*. De acuerdo con la literatura AtTIR1 es requerido anteriormente a la expresión de *AtcycB1;1* en el desarrollo de raíces laterales y se sugiere que AtTIR1 es necesario para que las células superen el arresto en G2 (Gray. W. y col., 1999; Stals. H. y Inzé. D., 2001). En los resultados obtenidos por qRT-PCR, se observó un comportamiento diferente, ya que el tratamiento T7106 presente una expresión relativa significativamente mayor que el control de un 130%, mientras que los tratamientos con TP no presentaron diferencias significativas con respecto al control. De acuerdo con estos resultados, las raíces de las plántulas de *A. thaliana*

tratadas con T7106 podrían tener más sitios en división celular que los tratamientos TP, un efecto que no se vio reflejado en términos del número de raíces laterales luego de 6 días de interacción con *A. thaliana* (Figura 4). Posiblemente, el tratamiento con T7 genera más sitios de división que serían visibles solamente cuando la planta sea más grande.

Considerando esto y los resultados reportados por el grupo de Contreras-Cornejo, H.A y cols (2009), quienes proponen que no existen más primordios en las plantas tratadas con *Trichoderma*, sino que en presencia del hongo gran parte de los primordios están en etapa VIII o emergidos. Esto generaría eventos de iniciación que son temporal y espacialmente asincrónicos donde ciertas cepas podrían ser capaces de acelerar el proceso de ramificación por sobre la aparición de más raíces laterales, desfasando el ciclo de expresión génica. Otra explicación posible es que la planta intente defenderse de la presencia del hongo e induzca la expresión de *AtcycB1;1* para crecer más rápido, como se ha observado en *A. thaliana* cuando están en presencia de ciertos patógenos (Korves.T. M. y Bergelson. J., 2003). De igual forma, sería importante evaluar la expresión de las quinasas de *AtcycB1;1* asociadas al ciclo celular como CDKA (Li. X. y col., 2006).

Los resultados muestran que existen cambios en la expresión de genes relacionados con diversos procesos asociados al desarrollo de raíces laterales, cambios que dependen de la cepa utilizada. Cabe destacar que se usaron raíces completas de múltiples plantas (~30) para las tres replicas biológicas usadas en los análisis de expresión génica con el propósito de tener suficiente mRNA para realizar las réplicas técnicas (3) de los tres genes de interés, y para los 3 genes normalizadores. Por lo

tanto, se estaba evaluando un promedio de expresión en toda la raíz, una simplificación que sería informativa analizar a mayor resolución (ver Proyecciones).

Un variable adicional que se ha registrado en la literatura, plantea que los efectos moleculares y fenotípicos de cepas del hongo *Trichoderma* sobre diferentes cepas de tomate dependen del estado fisiológico de la planta y de las condiciones de cultivo (Tucci. M. y col., 2011), por lo que al ser una relación simbiote ésta depende del estado de ambos componentes. Así, el estímulo de *Trichoderma* dependerá del momento, concentración de esporas y especie presente, a lo que la planta responderá desencadenando una respuesta fitohormonal que regulará el desarrollo y respuesta sistémica de defensa frente a este organismo.

Existe una creciente necesidad de aumentar la productividad y calidad de los alimentos, que en las últimas décadas ha llevado al uso excesivo de agroquímicos que generan contaminación en el ambiente y pérdida de suelos. Frente a ello surge la necesidad de utilizar nuevas fuentes sustentables de fertilización y control de plagas, que posean rendimientos similares a los productos que se utilizan actualmente y que generen menos impacto en el ecosistema. Existe una gran variedad de microorganismos con dichas particularidades en nuestros suelos. En este seminario, se han iniciado los estudios necesarios para escoger los más prometedores, y se logró identificar una cepa de la especie *Trichoderma citrinoviride* (TP) con gran potencial.

CONCLUSIONES

En un acercamiento por encontrar nuevas fuentes de bioestimulantes, se analizó la interacción de *A. thaliana* y cepas nativas del género *Trichoderma*. De ésta, pudo determinarse que es cepa y concentración específica, que hay compuestos indólicos secretados por los hongos y que existen cambios en la expresión de genes de la planta modelo.

Se determinó además, que la interacción planta-*Trichoderma* es dinámica, pero una vez definidas las condiciones de crecimiento es posible obtener de dicha interacción un gran potencial aplicable a la agricultura.

Proyecciones

- Inicialmente se evaluaron todas las cepas con el objetivo de identificar aquellas que presentaran un comportamiento con aplicaciones biotecnológicas y considerando que no existían antecedentes sobre los efectos bioestimulantes en especies *T. citrinoviride* es que resultó interesante profundizar en su estudio (TP). Sin embargo, no se descarta lo interesante que puede ser estudiar las cepas no analizadas en profundidad en este seminario, que se espera puedan ser retomadas próximamente.
- Existen técnicas más avanzadas como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) utilizando un citómetro de flujo, que permiten analizar separadamente diferentes grupos celulares de la raíz. Con dicha técnica es posible evaluar la expresión de diferentes genes que estén fuertemente

relacionados con la aparición de raíces laterales pero en determinados grupos celulares, obteniendo valores más precisos que no están afectados por el efecto de dilución que se observa al evaluar la raíz completa.

- Por otro lado, con respecto a la producción de compuestos indólicos, los datos de este seminario no nos permiten determinar si existen diferencias en la producción de auxinas de T7 y TP con inóculos de 10^7 esporas/l. Pero es un experimento interesante de realizar en el futuro ya que nos permitiría evaluar si existen diferencias en la producción de este tipo de compuestos en cepas que tienen menor capacidad bioestimulante.
- Con respecto al análisis molecular de los genes involucrados en el proceso de desarrollo de raíces laterales, se propone evaluar la expresión de genes que estén inmediatamente río abajo de AtTIR1 como LBD16/ASL18 y/o LBD29/ASL16. Además, analizar tanto la expresión de ciclinas como de quinasas con el objetivo de tener mayor claridad del fenómeno completo. También se podría corroborar los cambios en el ciclo celular evaluando la expresión de *promotor AtCycB1.1::GUS* en plántulas de *A. thaliana* frente a los distintos tratamientos, ya que este último ha sido demostrado que funciona como marcador de la formación de raíces laterales en *A. thaliana* (Fukaki. H. y col., 2002; De Smet. I., Tetsumura. T., y col., 2007).
- Otras pruebas también serían interesantes para evaluar el grado de estimulación de las cepas de *Trichoderma*. Por ejemplo, medir el nivel de degradación de ACC, grados de solubilización de P y Fe, nivel de clorofila en las hojas, peso seco y cálculos de biomasa. Todos ellos, más los considerados en este seminario serían muy interesantes de evaluar en una línea de tiempo

asociada al crecimiento y a diferentes tratamientos de *Trichoderma* o diferentes cepas combinadas, preferentemente en una planta de interés comercial en condiciones de campo, por ejemplo, tomate.

Congresos

Almasia, Romina; Pérez, Gabriel; Castillo, Pedro; Carú, Margarita; Handford, Michael (2011). Identification and molecular characterisation of native fungal *Trichoderma* species and their affect on plant growth. VI Reunión de Biología Vegetal. 30 de Nov, 1 y 2 de Dic. Pucón, Chile. (Poster)

Almasia, Romina; Carú, Margarita; Handford, Michael (2012). Characterisation of the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and native *Trichoderma* species: future applications in agriculture. VII Reunión de Biología Vegetal. 3-6 de Dic. Pucón, Chile (Presentación Oral en Ingles)

Proyectos asociados

1º Concurso de Valorización de la Investigación Universitaria de Conicyt-Fondef (2011). Proyecto VIU: 110031, denominado "Identificación de microorganismos bioestimulantes con fines comerciales". Alumno jefe de proyecto: Romina Almasia. Profesor tutor: Michael Handford

Bibliografía

Publicaciones

- Baker. R., Elad. Y. y Chet. I. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology*. 74: 1019-2040.
- BCN. 2007. Chile potencia alimentaria: una meta alcanzable. http://www.bcn.cl/carpeta_temas_profundidad/temas_profundidad.2007-08-31.2393471706.
- Bolton. M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact*. 22: 487-97.
- Calderon-Villalobos. L., Tan. X., Zheng. N. y Estelle. M. 2010. Auxin-perception--structural insights. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:
- Casimiro. I., Marchant. A., Bhalerao. R. P., Beeckman. T., Dhooge. S., Swarup. R., Graham. N., Inze. D., Sandberg. G., Casero. P. J. y Bennett. M. 2001. Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*. 13: 843-52.
- Castillo. P. 2009. Obtencion, reconocimiento e identificacion de cepas de *Trichoderma* sp. nativas de Chile. Evaluacion de antagonismo in vitro frente a *Botrytis* sp. Universidad de Valparaiso. Facultad de ciencias básicas y matemáticas. Instituto de Biología.. 47.
- Contreras-Cornejo. H. A., Macias-Rodriguez. L., Cortes-Penagos. C. y Lopez-Bucio. J. 2009. *Trichoderma* virens, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 149: 1579-92.
- Czechowski. T., Stitt. M., Altmann. T., Udvardi. M. K. y Scheible. W. R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 139: 5-17.
- Chang. Y., Baker. R. y Kleifeld. O. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*.
- Chen. Z., Bao. M., Sun. Y., Yang. Y., Xu. X., Wang. J., Han. N., Bian. H. y Zhu. M. 2011. Regulation of auxin response by miR393-targeted transport inhibitor response protein 1 is involved in normal development in Arabidopsis. *Plant molecular biology*. 77: 619-648.
- De Smet. I., Tetsumura. T., De Rybel. B., Frey. N., Laplaze. L., Casimiro. I., Swarup. R., Naudts. M., Vanneste. S., Audenaert. D., Inzé. D., Bennett. M. y Beeckman. T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*. 134: 681-771.
- De Smet. I., Tetsumura. T., De Rybel. B., Frey. N. F., Laplaze. L., Casimiro. I., Swarup. R., Naudts. M., Vanneste. S., Audenaert. D., Inze. D., Bennett. M. J. y Beeckman. T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development*. 134: 681-90.
- Druzhinina. I., Seidl-Seiboth. V., Herrera-Estrella. A., Horwitz. B., Kenerley. C., Monte. E., Mukherjee. P., Zeilinger. S., Grigoriev. I. y Kubicek. C. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews Microbiology*. 9: 749-808.
- Ehmann. A. 1977. The van urk-Salkowski reagent--a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *Journal of Chromatography A*.
- Eich. E. 2008. Solanaceae and convolvulaceae-secondary metabolites: biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance: a handbook. *Springer Verlag*.

- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H. y Tasaka, M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 29: 153-221.
- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska., Druzhinina, I. S., Viterbo, y Yarden. 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Appl Environ Microbiol*. 77: 5100-9.
- Glickmann, E. y Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 61: 793-6.
- Gravel, V., Antoun, H. y Tweddell, R. J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*. 39: 1968-1977.
- Gray, W., del Pozo, J., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W., Yang, M., Ma, H. y Estelle, M. 1999. Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development*. 13: 1678-1769.
- Harman. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-4.
- Hassan, M. K. y Ahmed, H.A. 2008. Palm pollen extract as plant growth substances for banana tissue culture. *World journal of agricultural science*. 4: 514-520.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. y Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading, England)*. 158: 17-42.
- Honda, H., Hamasaki, R., Ejima, C., Shimizu, N., Kiyohara, S. y Sawa, S. 2011. MM31/EIR1 promotes lateral root formation in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*. 6: 968-1041.
- Hoyos-Carvajal, L, Orduz, S y J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Elsevier*. 51: 409-416.
- Kazan, K. y Manners, J. 2009. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*. 14: 373-455.
- Kieffer, M., Neve, J. y Kepinski, S. 2010. Defining auxin response contexts in plant development. *Curr Opin Plant Biol*. 13: 12-20.
- Korves, T. M. y Bergelson, J. 2003. A developmental response to pathogen infection in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 133: 339-47.
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T. y Prusty, R. 2006. Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant & cell physiology*. 47: 788-880.
- Li, X., Mo, X., Shou, H. y Wu, P. 2006. Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 47: 1112-23.
- Lugtenberg, B. y Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*. 63: 541-597.
- Malamy, J. y Benfey, P. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*. 124: 33-77.
- Martens, D. y Frankenberger, W. 1994. Assimilation of exogenous 2 -14 C-indole-3-acetic acid and 3 -14 C-tryptophan exposed to the roots of three wheat varieties. *Plant and soil*. 166: 281-571.

Murray. L. K., Semrau. K., McCurley. E., Thea. D. M., Scott. N., Mwiya. M., Kankasa. C., Bass. J. y Bolton. P. 2009. Barriers to acceptance and adherence of antiretroviral therapy in urban Zambian women: a qualitative study. *AIDS Care*. 21: 78-86.

Okushima. Y., Fukaki. H., Onoda. M., Theologis. A. y Tasaka. M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*. 19: 118-248.

Péret. B., De Rybel. B., Casimiro. I., Benková. E., Swarup. R., Laplaze. L., Beeckman. T. y Bennett. M. 2009. Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends in plant science*. 14: 399-807.

Perez. G. 2010. Identificación molecular de especies del género fúngico *Trichoderma* y desarrollo de un marcador molecular específico. Laboratorio de microbiología ambiental. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Rahman. A., Sitepu. I., Tang. S. y Hashidoko. Y. 2010. Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 74: 2202-2210.

Robert-Seilaniantz. A., Grant. M. y Jones. J. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*. 49: 317-360.

Salas-Marina. M. A., Silva-Flores. M. A., Uresti-Rivera. E. E., Castro-Longoria. E., Herrera-Estrella. A. y Casas-Flores. S. 2011. Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European journal of plant pathology*. 1-13.

Stals. H. y Inzé. D. 2001. When plant cells decide to divide. *Trends in plant science*, 6: 359-723.

Tucci. M., Ruocco. M., De Masi. L., De Palma. M. y Lorito. M. 2011. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular plant pathology*. 12: 341-395

Vanneste. S., Maes. L., De Smet. I., Himanen. K., Naudts. M., Inze. D. y Beeckman. T. 2005. Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum*. 123: 139-285.

Vinale. F., Sivasithamparan. K., Ghisalberti. E., Marra. R., Barbetti. M., Li. H., Woo. S. y Lorito. M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 72: 80-166.

Páginas de internet

BCN. 2007. Chile potencia alimentaria: una meta alcanzable. http://www.bcn.cl/carpeta_temas_profundidad/temas_profundidad.2007-08-31.2393471706.

Odepa, 2009. FERTILIZANTES EN CHILE: COYUNTURA Y PERSPECTIVAS Jacqueline Espinoza Oyarzún. Artículo n° 205. <http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/ago-09.pdf>. Revisado 12 de mayo del 2012.

Proyecto Life Sinergia (03ENV/E/000085), Publicaciones en línea. http://www.lifesinergia.org/formacion/curso/03_impactos_ambientales_en_agr.pdf. Revisado 10 de mayo del 2012.

The World of Organic Agriculture Statistics & Emerging Trends 2006. Willer, Helga and Minou Youssefi. IFOAM 2006. <http://www.organic-world.net/former-editions.html?&L=0#c15>. Revisado 10 mayo del 2012

Anexos

Anexo 1: Alineamiento

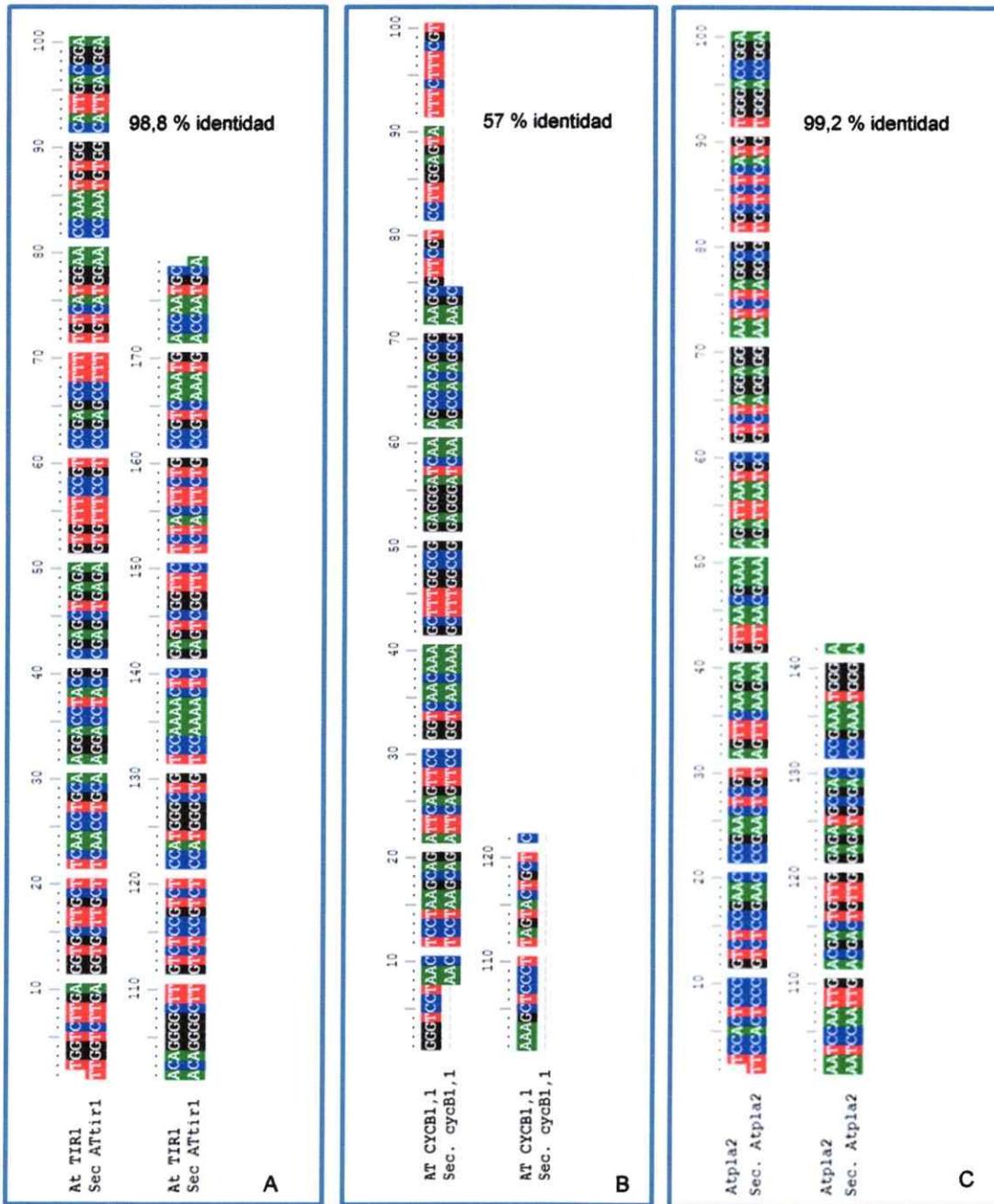


Figura suplementaria 1. Análisis de alineamiento de los amplicones obtenidos por PCR utilizando los partidores diseñados para cada uno de los genes escogidos mediante la herramienta BioEdit. Para ello se comparó las secuenciaciones del producto de PCR con la secuencia completa del gen presente en la base de datos TAIR. En la figura se muestra la secuencia extraída de la base de datos (arriba) y la secuencia obtenida por secuenciación del producto de PCR (abajo) de cada gen *At tir1*- *Sec. Attir1* (A), gen *AtcycB1,1*-*Sec. cycB1,1* (B) y gen *Atpla2*-*Sec. Atpla2* (C), respectivamente.

Anexo 2: Medios de cultivo

1.- Composición y preparación del medio Vogel 1X

Recomendaciones de preparación obtenidos del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

En 750 ml de H ₂ O agregar en orden: (mg/L)	
Constituyentes	Cantidad
Citrato de sodio x 5 H ₂ O	3000
Fosfato de Monopotasio Anhidro	5000
Nitrato de Amonio	2000
Sulfato de Magnesio X 7 H ₂ O	200
Cloruro de Calcio x 2 H ₂ O	100
Elementos trazas	0,1 ml
Biotina	0.05 ml
Cloroformo	0,04 ml
Llevar a 1000 ml	
pH: 4,8	

2.- Composición y preparación del medio basal Murashige y Skoog 1X

Formulación según Laboratorio PhytoTechnology, LLC.

Medio: Murashige and Skoog (MS) Mezcla basal de sales según modificación Finer y Nagasawa. M504

Concentración de trabajo: 4,6 g/L de preparado formulado.

Formula del preparado comercial (mg/L):

Nitrato de Amonio	825
Ácido Bórico	6,2
Cloruro de Calcio, Anhidro	332,2
Cloruro de Cobalto * 6H ₂ O	0,025
Sulfato de Cobre * 5H ₂ O	0,025
Sodio Férrico EDTA	36,7
Sulfato de Magnesio, Anhidro	180,54
Sulfato de Manganeso * H ₂ O	16,9
Ácido de Molibdeno (Sal de sodio) * 2H ₂ O	0,25
Yoduro de Potasio	0,83
Nitrato de Potasio	3030
Fosfato de potasio, Monobásico	170
Sulfato de Zinc * 2H ₂ O	8,6
pH: 5,8	