INSTITUTO HISPANO-LUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLOGÍA VEGETAL

ÁREA: FISIOLOGÍA VEGETAL

Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae

TESIS DOCTORAL

-Jorge Poveda Arias-

Dirigida por:

Dr. Enrique Monte Vázquez

Dr. Carlos Nicolás Rodríguez

Dra. Ana Alonso Ramírez

Salamanca, Junio de 2018

Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae

Tesis presentada por D. Jorge Poveda Arias para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología

Fdo.: Jorge Poveda Arias

VºBº

Los directores de la tesis

Dr. Enrique Monte Vázquez
Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética
Universidad de Salamanca

Dr. Carlos Nicolás Rodríguez
Profesor Titular del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Universidad de Salamanca

Dra. Ana Alonso Ramírez

Salamanca, 1 de Junio de 2018

Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez, Profesor Titular del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Universidad de Salamanca, **Dr. D. Enrique Monte Vázquez**, Catedrático del Área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **Dr. Dña. Ana Alonso Ramírez**, todos miembros del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada "**Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae**", ha sido realizada en el Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal) y en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, por **D. Jorge Poveda Arias**, y que cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor en Agrobiotecnología por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca, a 1 de Junio de 2018.

Fdo: Dr. Carlos Nicolás Rodríguez

Fdo: Dr. Enrique Monte Vázquez

Fdo: Dr. Ana Alonso Ramírez

Dr. Carlos Nicolás Rodríguez, Coordinador del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología (RD 99/2011) de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "**Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae**" presentada por **D. Jorge Poveda Arias** para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Enrique Monte Vázquez, la Dra. Ana Alonso Ramírez y yo mismo, en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo este certificado en Salamanca, a 1 de Junio de 2018.

Fdo.: Dr. Carlos Nicolás Rodríguez

Dr. Dña. María Jesús Elías Rivas, Directora del Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada "**Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae**", ha sido realizada en el Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal) de la Facultad de Biología, de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. Carlos Nicolás Rodríguez, el Dr. Enrique Monte Vázquez y la Dra. Ana Alonso Ramírez, por **D. Jorge Poveda Arias**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor en Agrobiotecnología por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca, a 1 de Junio de 2018.

Fdo: Dr. Dña. María Jesús Elías Rivas

Dr. D. José Martínez Fernández, Director del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada "**Investigación básica y aplicada en la interacción *Trichoderma*-Brassicaceae**", ha sido realizada en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE), de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección del Dr. Carlos Nicolás Rodríguez, el Dr. Enrique Monte Vázquez y la Dra. Ana Alonso Ramírez, por **D. Jorge Poveda Arias**, y cumple las condiciones exigidas para optar el grado de Doctor en Agrobiotecnología por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca, a 1 de Junio de 2018.

Fdo: Dr. D. José Martínez Fernández

Dentro del periodo de formación predoctoral del Programa de Doctorado en Agrobiotecnología (RD 99/2011), realizado por **D. Jorge Poveda Arias**, comprendido entre los cursos académicos 2014-2015 y 2017-2018, he realizado y participado en las siguientes publicaciones:

Artículos científicos

- *Trichoderma harzianum* Root Colonization in *Arabidopsis*. Alonso-Ramírez, A., **Poveda, J**., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. and Nicolás, C. (**2015**). *Bio-protocol* 5(13): e1512. (ISSN: 1364-3703).

- Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. Alonso-Ramírez A, **Poveda J**, Martín JI, Hermosa R, Monte E, Nicolás C (**2014**). *Molecular Plant Pathology*. 15: 823-831. DOI: 10.1111/mpp.12141. (ISSN: 2331-8325).

Revisiones científicas

- Hacia una agricultura más sostenible: el uso de hongos del género *Trichoderma* / Towards a more sustainable agriculture: the use of the fungi genus *Trichoderma*. **Jorge Poveda Arias** (**2017**). *Revista Mundo Investigación*, **2**, 18-23 (ISSN: 2530-0466).

- Arabidopsis: de "mala hierba" a planta modelo. **Jorge Poveda Arias (2018)**. Jóvenes *en la Ciencia*. In Press (ISSN 2395-9797).

Artículos de divulgación científica

- 12 artículos para **Naukas**.
- 1 artículo para **Cuaderno de Cultura Científica**.
- 12 artículos para **Papel de Periódico**.
- 4 artículos para **EspacioCiencia**.
- 6 artículos para **AcercaCiencia**.
- 2 artículos para **Hablando de Ciencia**.
- 7 artículos para **DiarioE**.
- 7 artículos para **Diario Siglo XXI**.
- 14 artículos para **Blasting News**.

Libros de divulgación científica

- De "bichos", plantas y vacunas. **Jorge Poveda Arias**. CreateSpace. **2017**. Depósito legal: S 473-2017. ISBN: 978-1979762489.

Colaboraciones

- Ámbar fúngico. **Jorge Poveda**. FOTCIENCIA12. FECYT-CSIC. **2015**. Depósito legal: M-3591-2015. NIPO: 720-14-137-9.
- Protagonistas de la ciencia: veinte conversaciones con científicos. CSIC. **2015**. Depósito legal: M-35.268-2015. ISBN: 978-84-00-10012-4.

Para que así conste, firmo el presente documento en Salamanca, a 1 de Junio de 2018.

Fdo: D. Jorge Poveda Arias

“En cualquier caso, creo que la fusión de la actividad mental, sobre todo la imaginativa, con las experiencias directas, constituyen la base para poder, no solo acercarnos a la comprensión de la realidad natural, sino también para poder describirla y, por tanto, hacer a todos partícipes de nuestra vivencia.”

Félix Rodríguez de la Fuente

Ilustración de la portada: Laura Rollán García

Maquetación de la portada, lomo y contraportada: Darío Rodríguez Prieto

A mis padres y mi hermano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS Y SIGLAS 1

INTRODUCCIÓN GENERAL 7

1.- EL GÉNERO *Trichoderma* 7

1.1.- Morfología y sistemática 7

1.2.- Ecología 8

1.3.- *Trichoderma* como agente de control biológico 9

1.3.1.- Micoparasitismo 9

1.3.2.- Antibiosis 11

1.3.3.- Competición con el patógeno 12

1.3.4.- Promoción del crecimiento vegetal 13

1.3.5.- Aumento de la resistencia frente a estreses bióticos 14

1.3.6.- Incremento de la tolerancia frente a estreses abióticos 17

1.4.- *Trichoderma* como fuente de genes 18

1.5.- Otras aplicaciones de *Trichoderma* 20

2.- BRASSICACEAE 21

MATERIALES Y MÉTODOS 25

1.- ORGANISMOS UTILIZADOS 25

1.1.- Plantas 25

1.1.1.- Mutantes de arabidopsis 25

1.2.- Microorganismos 25

1.3.- Mutantes de *Trichoderma* 27

1.4.- Vectores empleados 27

2.- CRECIMIENTO VEGETAL 27

2.1.- Siembra 27

2.2.- Crecimiento 28

3.- MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS 29

3.1.- Medios de cultivo 29

3.2.- Cultivos bacterianos 29

3.3.- Cultivo de *Trichoderma* 30

3.3.1.- Recogida de esporas 30

3.3.2.- Cultivo para la obtención de micelio 30

3.4.- Inoculación con *Trichoderma* 30

3.5.- Aplicación de los hongos micorrícicos 31

3.6.- Infecciones fúngicas 31
3.6.1.- *B. cinerea* 31
3.6.2.- *P. lingam* 31
3.7.- Conservación de cepas fúngicas 32
4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS 32
4.1.- Extracción de ADN genómico 32
4.1.1.- *A. thaliana* y tomate 32
4.1.2.- *B. napus* 32
4.2.- Extracción de ARN total 33
4.3.- Cuantificación 34
4.4.- Obtención de ADN complementario: Transcriptasa inversa 34
4.5.- Electroforesis 34
4.5.1.- ADN 34
4.5.2.- ARN 35
4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 35
4.6.1.- Técnica de PCR 35
4.6.2.- PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) 36
4.6.3.- Oligonucleótidos utilizados 38
4.6.4.- Diseño de oligonucleótidos 39
4.6.5.- Cuantificación relativa de biomasa fúngica 39
4.7.- Cálculo del número de copias de un gen por PCR 40
4.8.- Secuenciación de fragmentos de ADN 41
5.- MICROSCOPÍA CONFOCAL DE BARRIDO 41
6.- LOCALIZACIÓN DE CALOSA EN CORTES HISTOLÓGICOS 42
6.1.- Fijación 42
6.2.- Deshidratación 42
6.3.- Cortes histológicos 42
6.4.- Desparafinación 42
6.5.- Tinción 42
6.6.- Observación 43
7.- OBTENCIÓN DE ENDÓFITOS SISTÉMICOS 43
8.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS 43
8.1.- Clonación por tecnología Gateway 43
8.2.- Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación 45
8.3.- Extracción de plásmidos de *A. tumefaciens* 45
8.4.- Transformación de *B. napus* por inmersión floral de *A. tumefaciens* 45

8.4.1.- Selección de semillas transgénicas 46
8.4.2.- Caracterización molecular de las plantas transgénicas 47
8.5.- Transformación de raíces de *B. napus* por *A. rhizogenes* 47
9.- ENSAYOS DE GERMINACIÓN 48
10.- PRODUCTIVIDAD VEGETAL 48
10.1.- Productividad en arabidopsis 48
10.2.- Productividad en colza 48
10.2.1.- Semillas 48
10.2.2.- Biomasa aérea 49
10.2.3.- Biomasa radicular 50
11.- ENSAYOS DE ESTRESES ABIÓTICOS 50
11.1.- Salino 50
11.2.- Sequía 51
12.- OBSERVACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN 51
12.1.- Tinción de raíces de *A. thaliana* con azul de tripán 51
12.2.- Tinción de raíces de colza con 'tinta china' 51
13.- ESTUDIOS *in silico* 52
14.- ACTIVIDAD MIROSINASA 52
15.- ANÁLISIS METABOLÓMICOS 53
15.1.- Extracción de las muestras 53
15.2.- Instrumentación y condiciones 54
15.2.1.- Análisis de metabolitos polares 54
15.2.2.- Análisis de metabolitos no polares 54
15.2.3.- Espectrometría de masas 54
15.2.4.- Procesamiento de datos 55
16.- ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS 55

CAPÍTULO I:

Papel del ácido salicílico en la interacción entre el hongo beneficioso *Trichoderma harzianum* y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* 57
INTRODUCCIÓN 59
1.- ARABIDOPSIS COMO PLANTA MODELO 59
1.1.- Ciclo de vida 59
1.2.-Características genéticas 59
1.3.- Su elección como planta modelo 60
1.4.- Transformación génica y hallazgos importantes 60
2.- COLONIZACIÓN RADICULAR POR *Tricoderma* spp. 62

3.- EL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) 64
3.1.- Biosíntesis 65
3.1.1.- Ruta PAL 65
3.1.2.- Ruta IC 66
3.2.- Modo de acción 69
3.3.- Papel del SA en la resistencia frente a patógenos 71
3.4.- Papel del SA en la tolerancia frente a estreses abióticos 74
3.5.- Relación del SA con otras hormonas 75
3.6.- Papel del SA en la colonización radicular por microorganismos beneficiosos 76
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 78
RESULTADOS 79
1.- COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ POR *T. harzianum* 79
1.1.- Análisis visual por microscopía confocal 79
1.2.- Cuantificación de la colonización 80
2.- RESPUESTA HISTOLÓGICA DE LA PLANTA 81
3.- RESPUESTA GÉNICA DE LA PLANTA 82
4.- EFECTO DE *T. harzianum* EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA PLANTA 83
DISCUSIÓN 87
CAPÍTULO II:
El gen *ThKel1* de *Trichoderma harzianum* como herramienta en Biotecnología Vegetal 91
INTRODUCCIÓN 93
1.- EL GEN *Thkel1* DE *Trichoderma* 93
2.- LA COLZA (*Brassica napus*) 94
2.1.- Producción 95
2.2.- Aceite y otros productos 99
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 100
RESULTADOS 101
1.- PLANTAS DE *A. thaliana* QUE EXPRESAN EL GEN *Thkel1* DE *T. harzianum* 101
1.1.- Productividad de plantas Kel2 en condiciones de invernadero 101
1.2.- Productividad de plantas Kel2 frente a estrés salino 101
1.3.- Respuesta de plantas Kel2 frente a estrés biótico 102
1.3.1.- Expresión de genes de defensa en plantas Kel2 102
1.3.2.- Patogenicidad *in vitro* 104
1.3.3.- Patogenicidad *in planta* 106
1.4.- Interacción con *Trichoderma* 107

1.4.1.- Colonización radicular *in vitro* 107
1.4.2.- Productividad en invernadero 108
1.4.3.- Interacción con *T. parareesei* 109
1.4.3.1.- Colonización radicular 109
1.4.3.2.- Genes de defensa 110
1.4.3.3.- Productividad 111
1.5.- Estudio con transformantes de *T. harzianum* con el gen *Thkel1* silenciado 112
1.5.1.- Colonización radicular 112
1.5.2.- Genes de defensa 114
1.5.3.- Productividad 115
2.- ESTUDIO CON LOS TRANSFORMANTES DE *Trichoderma* SILENCIADOS EN EL GEN *Thkel1* SOBRE PLANTAS DE TOMATE 116
2.1.- Colonización radicular 116
2.2.- Genes de defensa 116
3.- PRESENCIA DEL GEN *Thkel1* EN PLANTAS DE *B. napus* 117
3.1.- Determinación del número de copias del transgén 118
3.2.- Estudios de germinación 119
3.2.1.- Germinación en MS 119
3.2.1.- Germinación bajo estrés salino 121
3.3.- Productividad en condiciones de invernadero 123
3.4.- Productividad frente a estrés salino 126
3.5.- Productividad frente a estrés de sequía 128
3.6.- Respuesta frente a estrés biótico 130
3.7.- Interacción con *Trichoderma* 132
3.7.1.- Colonización radicular 132
3.7.2.- Productividad en invernadero 132
3.7.3.- Interacción con *T. parareesei* 135
3.7.3.1.- Colonización radicular 135
3.7.3.2.- Productividad en invernadero 136
3.8.- Estudio con transformantes de *T. harzianum* con el gen *Thkel1* silenciado 138
3.8.1.- Colonización radicular 139
3.8.2.- Producción en invernadero 139
DISCUSIÓN 143

CONCLUSIONES 149

BIBLIOGRAFÍA 251

ABREVIATURAS Y SIGLAS

χ	Media aritmética
+B	Plantas infectadas con *Botrytis cinerea*
+G	Plantas inoculadas con AMFs
+K4 o +K5	Plantas inoculadas con transformantes silenciados de *T. harzianum* en *Thkel1*
+KT	Plantas inoculadas con el control de transformación de silenciamiento de *T. harzianum* en *Thkel1*
+T o +T34	Plantas inoculadas con *T. harzianum*
+T6	Plantas inoculadas con *T. parareesei*
µM	Micromolar
17 y 20	Líneas transgénicas de colza con una copia y dos copias del gen *Thkel1*, respectivamente
1-MeO-I3M	1-metoxi-3-indolmetilo
2-PE ITC	Isotiocianato 2-feniletilo
4-MeO-I3M	4-metoxi-3-indolmetilo
6-PP	6-pentil-α-pirona
ABA	Ácido abscísico
ACB	Agente de control biológico
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
ADP	Adenosín difosfato
AIS	*Arabidopsis Information Service*
ALA	Ácido α-linolénico
AMFs	Hongos micorrícicos arbusculares
AOX	Oxidasa alternativa
ARN	Ácido ribonucleico
At	*Arabidopsis thaliana*
ATAF	Factor transcripcional de *Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosín trifosfato
BA	Ácido benzoico
BA_2H	Ácido benzoico 2-hidrolasa
BAS	Estructuras ramificadas de absorción
Bn	*Brassica napus*
BRCA2	Proteína cáncer de mama 2A
BRs	Brasinoesteroides
bZIP	Dominio básico de cremallera de leucina
Ca^{2+}	Ión calcio
CaM	Calmodulina

CAMTA3	Activador transcripcional 3 de unión a CaM
CANOLA	Canadian Oil Low Acid (aceite canadiense bajo en ácido)
CBNAC	Proteína NAC de unión a CaM
CBP60g	Proteína de unión a CaM 60g
CDPKs	Proteínas kinasas dependientes de Ca^{2+}
CH_3COONH_4	Acetato de amonio
CK	Citoquinina
cm	centímetro
CM	Corismato mutasa
coi1-30	*Coronatine Insensitive 1* (mutante de arabidopsis deficiente en JA)
COL	Ecotipo silvestre de *Arabidopsis thaliana*, Col-0
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ct	Ciclo umbral
CUC	Proteína del cotiledón en copa
CWDEs	*Cell Wall Degrading Enzymes* (enzimas degradadoras de la pared celular)
Cys	Cisteína
D.O.	Densidad óptica
Da	Dalton
DAMPs	*Damage-Associated Molecular Patterns* (patrones moleculares asociados a daño)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
E	Einstein
ech	Endoquitinasa
EDS1	*Enhanced Disease Susceptibility* (proteína de aumento de la susceptibilidad a la enfermedad)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIN2	Proteína 2 de insensibilidad a ET
ERR	Elongación radicular relativa
ESI	Ionización por electroespray
ESPs	Proteínas epitioespecíficas
ET	Etileno
ETI	*Effector-Triggered Immunity* (inmunidad activada por efector)
ETI	Inmunidad provocada por efector
eV	Electrónvoltio
FAA	Formalin-aceto-alcohol
FMO1	*Flavin Containing Monooxygenase 1* (gen de flavina con monooxigenasa 1)
g	Gramos
GA	Giberelina
GFP	*Green Fluorescent Protein* (proteína verde fluorescente)

GPC	Glicerofosfocolina
GSLs	Glucosinolatos
h	Hora
$H_2PO_4^-$	Ión dihidrogenofosfato
HA	Harzianum A
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Respuesta hipersensible
IAA	Ácido indol acético
IC	Isocorismato
ICS	Isocorismato sintasa
IG	Índice de germinación
ihpRNA	ARN "horquillados" autocomplementarios
IPL	Isocorismato piruvato liasa
IS	Patrón interno
ISR	*Induced Systemic Resistance* (resistencia sistémica inducida)
ITCs	Isotiocianatos
ITS	*Internal Transcribed Spacer* (espaciador intergénico transcrito)
JA	Ácido jasmónico
K4 y K5	Transformantes de *T. harzianum* silenciados del gen *Thkel1*
Kan	Kanamicina
KEL	Línea transgénica de *A. thaliana* con dos copias del gen *Thkel1* de *T. harzianum*
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico
KOH	Hidróxido de potasio
KT	Control de transformación de *T. harzianum* para el silenciamiento del gen *Thkel1*
L	litros
LAR	Resistencia adquirida local
LB	Medio Luria-Bertani
LC/MS	Cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas
M	Molar
MAMPs	*Microbe-Associated Molecular Patterns* (patrones moleculares asociados a microorganismo)
MAPAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MAPKs	Proteínas kinasa activadas por mitógeno
MAs	Micorrizas arbusculares
Mbp	*Megabase Pair* (par de megabases)
MBP	Proteína de unión a mirosinasa
MBPs	Proteínas de unión a mirosinasa
MEA	Extracto de malta y agar
MES	Éster metílico
MeSA	Metil salicilato

MeSAG	Metil salicilato O-β-glucósido
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MQ	*Milli-Q* (ultrapura)
MS	Medio Murashige and Skoog
MTI	*MAMP-Triggered Immunity* (inmunidad activada por MAMP)
MyAPs	Proteínas asociadas a mirosinasa
N	Nitrógeno
NAC	NAM, ATAF1 y 2, CUC2
NaCl	Cloruro sódico
NAM	Proteínas de falta de meristemo apical
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NBS-LRR	*Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat* (sitio de unión a nucleótidos - repetición rica en leucina)
NF	Factor de normalización
ng	Nanogramo
NH_4^+	Amonio
NIMIN1	Proteína 1 de interacción con NPR1
NO_3^-	Nitrato
NPR	Genes no expresivos relacionados con patogénesis
NRPs	*Nonribosomal Peptides* (péptidos no ribosómicos)
NSPs	Proteínas nitrilo específicas
ºC	Grados centígrados o Celsius
ORF	Marco de lectura abierta
P	Fósforo
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PDA	Patata dextrosa agar
PDB	Caldo de patata dextrosa
PEN2	Mirosinasa dependiente de penetración
PGPRs	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
PGR	Porcentaje de germinación relativa
Phe	Fenilalanina
Pi	Fósforo inorgánico
PKs	policétidos
PMV	*Pepper Mottle Virus* (virus del moteado del pimiento)
PR1	Gen 1 relacionado con la patogénesis
PRR	*Pattern Recognition Receptors* (receptores de reconocimiento de patrones)

PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PSII	Fotosistema II
PTI	*PAMP-Triggered Immunity* (inmunidad activada por PAMP)
PTI	Inmunidad provocada por PAMPs
Q	Cantidad relativa del gen
qPCR	PCR cuantitativa
ROS	Especie reactiva de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RQ	*Relative Quantify of transcript* (Cuantificación relativa del transcrito)
RUBISCO	1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
seg	Segundos
SA	Ácido salicílico
SABP2	Proteína 2 de unión a SA
SAD1	Deficiente de resistencia adquirida 1
SAG	SA O-β-glucósido
SAGT	SA glucosiltransferasa
SAMT	SA metiltransferasa
SAR	*Systemic Acquired Resistance* (resistencia sistémica adquirida)
SGE	Éster de saliciloil glucosa
sid2	*Salicylic Acid Induction Deficient 2* (mutante de arabidopsis deficiente en SA)
SIGnAL	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
SINV	Virus de la Fiebre Sindbis
Sl	*Solanum lycopersicum*
SMs	Metabolitos secundarios
Spec	Espectinomicina
SR1	Proteína de respuesta a la señal 1
SSNI1	Supresor inducible 1 de NPR1
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TBS	Solución Tris salina tamponada
***t*-CA**	ácido *trans*-cinámico
T-DNA	ADN de transferencia
TE	Tris-EDTA
tef	Factor de elongación de la transcripción
TFPs	Proteínas formadoras de tiocianatos
UE	Unión Europea
UPLC-QTOF-MS	*Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry* (espectrometría de masas de tiempo de vuelo de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento-cuadrupolo)

UV	Ultravioleta
VA	Volumen del ensayo
VE	Volumen enzimático
VPE	*Vacuolar Processing Enzyme* (enzima de procesamiento vacuolar)
ε	Coeficiente de extinción de la sinigrina
µL	Microlitro

INTRODUCCIÓN

1.- EL GÉNERO *Trichoderma*

1.1.- Morfología y sistemática

El género *Trichoderma* agrupa hongos filamentosos anamórficos (mitospóricos) pertenecientes a la División Deuteromicota, y a su vez a la Clase de los Hifomicetos (Gams et al., 1987). Se reproducen de forma asexual alternando la formación de micelio y esporas (conidios), éstos últimos formados a partir de células desnudas (Webster, 1980). No obstante, en algunos aislamientos se ha descrito el estado perfecto, sexual o teleomórfico (meiótico) dentro del género *Hypocrea*, mientras que el estado asexual (anamórfico o mitospórico) se denomina *Trichoderma*; así, se han identificado *Hypocrea virens* como el teleomorfo de *Trichoderma virens* (Chaverri et al., 2001), *Hypocrea atroviridis* de *Trichoderma atroviride* (Dodd et al., 2003) e *Hypocrea lixii* de algún genotipo de *Trichoderma harzianum* (Chaverri et al., 2003). En el año 1996, un estudio molecular demostró que las especies del género *Trichoderma* son derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar su ciclo sexual (Kuhls et al., 1996).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* se desarrollan rápidamente sobre sustratos muy diversos y producen grandes cantidades de conidios, generalmente verdes, o excepcionalmente hialinos, formados a partir de células conidiógenas enteroblásticas fialídicas (Kirk et al., 2001). Los conidióforos de *Trichoderma* son muy ramificados (asemejándose a arbustos con forma piramidal), están tabicados y sus células contienen más de un núcleo. Los conidios son ovoides, con pared normalmente lisa y con un solo núcleo. Bajo determinadas condiciones de estrés, en el micelio se diferencian clamidosporas, unas mitosporas de pared engrosada que son capaces de resistir condiciones ambientales desfavorables. Estas estructuras son globosas, con pared rugosa y más oscura que la de los conidios, y tiene gran importancia en la supervivencia del hongo (Lewis & Papavizas, 1984). El número de cromosomas por núcleo varía de tres a siete (Goldman et al., 1998) y varía también el tamaño del genoma, aproximadamente entre 34 y 39 Mbp (Martínez et al., 2008; Kubicek et al., 2011).

El género *Trichoderma* se describió hace 224 años (Persoon, 1794). Sin embargo, debido a la similitud de sus especies, la taxonomía basada en criterios morfológicos (Rifai, 1969; Bissett, 1991) fue ardua hasta la disponibilidad de las técnicas moleculares.

En los últimos 20 años, la utilización de secuencias de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacers) y de genes que codifican el factor de elongación de la transcripción 1α (tef1α) o la endoquitinasa 42 (ech42) han permitido desdoblar en nuevos genotipos el complejo de especies *T. harzianum* (Grondona et al., 1997), identificar cepas de biocontrol en grupos taxonómicos determinados (Hermosa et al., 2000), establecer taxones moleculares en el género (Kubicek et al., 2003), describir especies como *T. asperellum* o *T. parareesei* (Lieckfeldt et al., 1999; Atanasova et al., 2010), relacionar especies con su forma sexual (Chaverri et al., 2003), o distinguir formas patogénicas de hongos cultivados, como el champiñón (Hermosa et al., 2000; Mazín et al., 2017).

1.2.- Ecología

Trichoderma incluye hongos de rápido crecimiento que, aunque más aislados en suelos forestales y agrícolas (Klein & Eveleigh, 1998), se han encontrado en todos los continentes (Hermosa et al., 2004). Los hongos de este género se desarrollan en una gran variedad de sustratos y bajo un amplio intervalo de temperaturas, aunque muestran preferencia por los suelos ácidos y ricos en materia orgánica (Klein & Eveleigh, 1998; Druzhinina et al., 2011). En los trabajos más recientes, algunos basados en datos de metagenómica, se ha observado que el número de especies por ecosistema es bajo (Sadfi-Zouaoui et al., 2009; Friedl & Druzhinina, 2012; Debbi et al., 2018).

Estos hongos, habitantes del suelo, en principio degradadores de materia orgánica muerta, también actúan como micoparásitos. Un análisis comparativo de los genomas de *Trichoderma reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* ha demostrado que el micoparasitismo es la forma de vida ancestral del género *Trichoderma* y que, posteriormente, surgió la colonización de la rizosfera, hecho que se habría visto favorecido por la presencia en el suelo de patógenos y exudados de la raíz de las plantas (Kubicek et al., 2011). Varios estudios han mostrado que la colonización de la raíz por *Trichoderma* se limita a los espacios intercelulares sin alcanzar los vasos (Yedidia et al., 1999; Chacón et al., 2007; Samolski et al., 2012; Carrero-Carrón et al., 2018), y que el hongo se beneficia de los exudados de las raíces de la planta y de la protección del nicho a colonizar (Woo & Lorito, 2007; Rubio et al., 2012). Además, algunas de las especies de *Trichoderma* tienen como hábitat tejidos de las plantas, donde se desarrollan como endófitas sin causar daños aparentes (Bailey et al., 2006, 2008; Bae et al., 2009). Otro aspecto a destacar es la resistencia relativa de varias especies de *Trichoderma* a fungicidas de tipo bencimidazol (Mukherjee et al., 2003), muy utilizados en agricultura. Esta condición, junto con su

velocidad de crecimiento y su fácil adaptación a diversas condiciones climáticas y edáficas confieren a *Trichoderma* ventaja sobre otros muchos hongos filamentosos en la colonización de suelos tras la aplicación de estos tratamientos, y hacen de estos hongos unos excelentes candidatos a agentes de control biológico (ACB).

1.3.- *Trichoderma* como agente de control biológico

El control biológico es el uso de organismos beneficiosos para reducir los efectos negativos producidos por agentes fitopatógenos y para promover respuestas positivas en las plantas. El biocontrol no solo se limita a controlar las enfermedades de las plantas, sino que también se relaciona con los beneficios directos que algunos microorganismos ejercen sobre las mismas (Shoresh et al., 2010).

En la actualidad, se reconocen varios mecanismos de acción de *Trichoderma* como ACB: micoparasitismo, antibiosis, competencia con el patógeno, promoción del crecimiento de la planta, incremento de su tolerancia frente a estreses abióticos y estimulación de sus defensas contra patógenos (Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010; Shoresh et al., 2010; Hermosa et al., 2012).

1.3.1.- Micoparasitismo

El micoparasitismo es el tipo de simbiosis en la que un hongo parásito se beneficia de otro, el huésped, del que obtiene los nutrientes necesarios para completar su crecimiento y reproducción pudiéndole causar perjuicio o incluso la muerte. Cuando ocurre esto último el parasitismo se denomina necrotrofo para diferenciarlo del parasitismo biotrofo, en el que la interacción solo puede tener lugar con las células vivas del huésped.

En el caso de *Trichoderma*, el micoparasitismo es un proceso complejo que conlleva una serie de eventos secuenciales. Primero, *Trichoderma* localiza al patógeno y crece orientado hacia él por quimiotropismo (Lu et al., 2004). Esta detección a distancia conlleva la expresión secuencial de enzimas que degradan la pared celular (CWDEs). Aunque las diferentes cepas de *Trichoderma* pueden seguir distintos patrones de inducción de CWDEs, parece seguro que una exoquitinasa extracelular, producida de forma constitutiva a bajos niveles, podría estar implicada en este proceso. Esta exoquitinasa determina la liberación de ciertos oligómeros de la pared del hongo diana, que inducen la expresión de genes que codifican endoquitinasas (Brunner et al., 2003; Harman, 2006; Liu et al., 2017), cuya liberación y difusión determinan que *Trichoderma*

comience el ataque al hongo diana antes de que se haya producido el contacto físico (Viterbo et al., 2002).

Una vez que los hongos parásito y huésped establecen contacto, las hifas de *Trichoderma* pueden enroscarse alrededor de la hifa de su presa y formar estructuras especializadas de tipo apresorio (Figura 0.1), desde las que se produce la penetración en el interior de las hifas del patógeno. Esta unión parece estar mediada por la interacción entre carbohidratos (generalmente galactosa o fucosa) de la pared celular de *Trichoderma* y lectinas del hongo diana (Inbar & Chet, 1996; Rocha-Ramírez et al., 2002; Reithner et al., 2005; Zeilinger et al., 2005). Una vez en contacto, *Trichoderma* produce varias CWDEs y antibióticos, como se ha comprobado con los peptaiboles, que formarán poros en la pared celular del hongo parasitado (Schirmböck et al., 1994; Mukherjee et al., 2010).

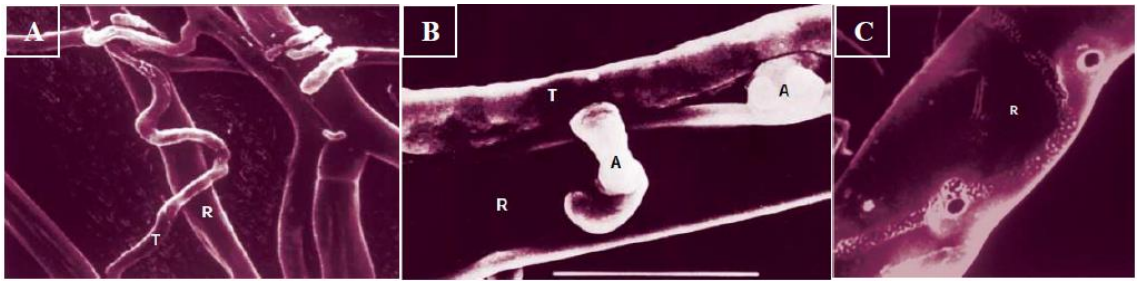


Figura 0.1: Vista a microscopio electrónico de barrido del micoparasitismo ejercido por *Trichoderma* sobre *Rhizoctonia solani*. (A) Hifa de *Trichoderma* (T) enroscándose en una hifa de *R. solani* (R). **(B)** Apresorios formados en la interacción *Trichoderma-Rhizoctonia* (la barra equivale a 10 μm). **(C)** Hifa de *R. solani* (de la que se ha retirado la hifa de *Trichoderma*) con los poros provocados por el micoparásito. Adaptado de Harman et al. (2004).

Finalmente, *Trichoderma* digiere el contenido intracelular del hongo. Esta fase del micoparasitismo va acompañada de algunos cambios morfológicos como vacuolización, pérdida de citoplasma y desintegración de las hifas del huésped (Benhamou & Chet, 1996). En algunos casos, también se ha observado la esporulación de *Trichoderma* tras la completa digestión del hongo atacado (Elad et al., 1984).

El mecanismo micoparasítico de *Trichodema* implica la acción de diversas CWDEs, entre las que destacan quitinasas, glucanasas y proteasas, y celulasas en el caso de los oomycetos (Sanz et al., 2004).

Por otro lado, aunque no puede denominarse micoparasitismo, la capacidad de diferentes especies de *Trichoderma* de actuar como parásitos de nematodos sigue un proceso similar al aquí mostrado. En este sentido, se ha observado que diferentes especies

de *Trichoderma* producen proteasas y quitinasas capaces de facilitar la destrucción de huevos y matar formas juveniles y adultos de distintas especies de nematodos (Suárez et al., 2004; Rajinikanth et al., 2016; Contina et al., 2017).

1.3.2.- Antibiosis

La antibiosis consiste en la inhibición del crecimiento de un organismo por los metabolitos secundarios (SMs) producidos por otro, sin que medie contacto físico entre ellos. Los SMs son moléculas no esenciales para el crecimiento del organismo, pero que tienen un importante papel en la señalización, desarrollo e interacción con otros organismos (Keller et al., 2005; Hoffmeister & Keller, 2007; Osbourn, 2010), y son frecuentemente sintetizados cuando se detiene el crecimiento activo o bajo determinadas condiciones de cultivo, generalmente relacionadas con situaciones de estrés (Keller et al., 2005). *Trichoderma* representa una de las más grandes diversidades metabólicas encontradas dentro del Reino Fungi. Se ha descrito que es capaz de producir miles de SMs distribuidos en más de 120 estructuras moleculares (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998; Degenkolb et al., 2008; Reino et al., 2008; Vinale et al., 2012). Entre ellos, los más estudiados son los peptaiboles (ej. trichokoninas y alametacina), pequeños péptidos no ribosómicos (NRPs) (ej. gliotoxina y sideróforos), policétidos (PKs) (ej. aspinolidas y trichodermacetonas), terpenos (trichotecenos) (ej. harzianum A y trichodermina) y pironas (ej. 6-pentil-α-pirona, 6-PP) (Mukherjee et al., 2013; Hermosa et al., 2014).

Algunos SMs de *Trichoderma* han mostrado múltiples aplicaciones en terapia humana como anticancerígenos, supresores de inmunidad o agentes reductores de colesterol (Keswani et al., 2014). También se ha observado actividad antimicrobiana de algunos SMs contra patógenos humanos, bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Vizcaíno et al., 2005; Tijerino et al., 2011; Leelavathi et al., 2014); e incluso se ha descrito potencial entomopatógeno para algunos de ellos (Vargas et al., 2014; Ganassi et al., 2016). Además, cabe destacar el efecto de los SMs contra nematodos, no sólo fitopatógenos como *T. harzianum* frente a *Meloidogyne incognita* (Madaure & Mashela, 2017; Singh et al., 2017), sino también de interés veterinario, destacando el efecto nematicida de *T. virens* sobre el gusano intestinal de los perros (*Toxocara canis*) (de Souza et al., 2017), o contra virus como es el caso de los tricotecenos de *T. albotutescens* contra el virus del moteado del pimiento (PMV) (Ryu et al., 2017) o de la enzima L-lisina-α-oxidasa contra virus de la Fiebre Sindbis (SINV), causante de la encefalitis transmitida por garrapatas en humanos (Larichev et al., 2017).

Estudios de genómica comparada han revelado que *T. atroviride* y *T. virens* poseen un repertorio de genes que codifican NRP sintasas y PK sintasas superior al de cualquier otro hongo filamentoso (Kubicek et al., 2011; Mukherjee et al., 2012). Se ha observado, en ensayo *in vitro*, que algunos SMs de *Trichoderma* poseen actividad antimicrobiana contra patógenos de interés agrícola pertenecientes a géneros tan diversos como *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phythophthora*, *Pythium*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Stachybotrys*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Guignardia* o *Gaeumannomyces* (Jamali et al., 2016; de Lima et al., 2017). Recientemente, la obtención de mutantes de *T. parareesei* silenciados en *Tparo7*, gen que codifica la corismato mutasa (enzima de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos), ha demostrado que los metabolitos tirosol, 2-feniletanol y SA, se forman en esta ruta y contribuyen a la actividad antifúngica del hongo (Pérez et al., 2015).

Como se detallará más adelante, en los últimos años se ha descrito que SMs de *Trichoderma* tienen capacidad para inducir respuestas de defensa en plantas y/o promover su crecimiento (Viterbo et al., 2007; Mukherjee et al., 2012; Vinale et al., 2012, Malmierca et al., 2015a; 2015b; Garnica-Vergara et al., 2016). Sin embargo, pocos de esos SMs han demostrado capacidad para contribuir por si solos al control de una determinada enfermedad bajo condiciones de campo (Keswani et al., 2014; Li et al., 2014).

1.3.3.- Competición con el patógeno

Se entiende por competencia el desigual comportamiento de dos o más organismos por un mismo requerimiento o recurso, de manera que la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para los demás. Estos requerimientos o recursos pueden ser nutrientes, oxígeno, espacio físico, luz, etc. (Paulitz, 1990).

Es difícil determinar hasta qué punto *Trichoderma* es capaz de ejercer su acción antagonista solo a través de la competición o si, otros mecanismos como el micoparasitismo o la antibiosis preparan el escenario para que la competición se lleve a cabo de una forma más eficaz (Harman, 2006). Aún así, existen varios ejemplos en los que la captación de nutrientes es el mecanismo de competición directo de *Trichoderma* frente algunos patógenos (Howell & Stipanovic, 1995; Handelsman & Stabb, 1996; Lo et al., 1996).

La competición por carbono, nitrógeno y hierro juega un papel importante durante la interacción entre hongos beneficiosos y perjudiciales. *Trichoderma* es capaz de movilizar

y absorber nutrientes del suelo más eficientemente que otros hongos (Vinale et al., 2008). También se ha relacionado la mayor capacidad de *T. asperellum* para movilizar hierro con su mayor capacidad para combatir enfermedades causadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Segarra et al., 2010).

1.3.4.- Promoción del crecimiento vegetal

Las especies de *Trichoderma* son capaces de promover el crecimiento y el desarrollo de las raíces laterales de las plantas (Chang et al., 1986; Yedidia et al., 2001; Pelagio-Flores et al., 2017), con el consiguiente incremento de la productividad en los cultivos (Harman et al., 2004; 2006). Para explicar este hecho se han sugerido varios mecanismos como son: la producción de factores de crecimiento y vitaminas, el control de patógenos menores, o la conversión de material no utilizable (metales como Fe, Zn, Mn y Cu) en formas que puedan ser utilizadas por las plantas (Altomare et al., 1999). Sin embargo, no todas las especies y/o cepas de *Trichoderma* estimulan el desarrollo de las plantas (Hermosa et al., 2012). Este hecho está condicionado por el genotipo vegetal (Tucci et al., 2011) y por la especie de *Trichoderma* en cuestión (Rubio et al., 2012). De hecho, algunas especies de *Trichoderma* causan efectos negativos sobre el crecimiento de la planta, como es el caso de *Trichoderma brevicompactum*, cuyos efectos adversos se han asociado con la producción de trichodermina (Tijerino et al., 2011).

Trabajos llevados a cabo con mutantes de plantas y/o transformantes de *Trichoderma* han demostrado que algunas especies pueden producir ácido indol acético (IAA), provocando la regulación de los niveles de esta hormona en la rizosfera (Contreras-Cornejo et al., 2009; Hoyos-Carvajal et al., 2009; Nieto-Jacobo et al., 2017); incrementar la capacidad fotosintética de las plantas (Vargas y col., 2009); o modificar la arquitectura de la raíz, aumentando el número de raíces secundarias y pelos radicales, para aumentar la captación de nutrientes (Samolski et al., 2012). Además, la capacidad de *Trichoderma* para reducir la disponibilidad de etileno (ET) en las plantas, promueve el crecimiento de las mismas, ya que disminuye los niveles de su molécula precursora mediante la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa o ACC desaminasa (Viterbo et al., 2010). En este mismo sentido, SMs purificados de algunas cepas de *Trichoderma* como 6-PP, koningina, harzianopiridona, cerinolactona, aspinolidas o ácido harziánico, así como mutantes afectados en la producción de pironas como 6-PP y trichotecenos como harzianum A (HA), han demostrado que estos compuestos son capaces de promover el crecimiento de plantas como tomate, arabidopsis, trigo, guisante o azalea (Vinale et al.,

2008; 2012; Malmierca et al., 2012; 2013; 2015a; 2015b; Garnica-Vergara et al., 2016; Mutawila et al., 2016). Parece que en esas respuestas de la planta a *Trichoderma* se engloban componentes del transporte y señalización de auxinas, además de la proteína 2 de insensibilidad a ET (EIN2), regulador central de la señalización por ET (Garnica-Vergara et al., 2016).

1.3.5.- Aumento de la resistencia frente a estreses bióticos

Durante muchos años, la capacidad de cepas de distintas especies de *Trichoderma* para proteger a la planta contra patógenos de raíz se atribuyó a un efecto directo sobre el patógeno (Chet et al., 1998). Sin embargo, se ha demostrado que, al colonizar las raíces de la planta, dichas cepas estimulan los mecanismos de defensa de la misma (Yedidia et al., 1999; Korolev et al., 2008; Segarra et al., 2009; Hermosa et al., 2012; Hermosa et al., 2013) (Figura 0.2), lo que conlleva a un incremento de su resistencia contra varios microorganismos fitopatógenos e incluso nematodos (Monte, 2001; Harman et al., 2004), gracias a una respuesta SAR y a la producción radicular de ET, como en el caso de *T. harzianum* y el nematodo *Meloidogyne incognita* en plantas de tomate (Leonetti et al., 2017; Singh et al., 2017), activación defensiva heredada por la progenie, como se ha comprobado en plantas de tomate procedentes de semillas de plantas inoculadas con *T. atroviride* que fueron resistentes frente a *Meloidogyne javanica* (de Medeiros et al., 2017).

Está demostrado que *Trichoderma* inicialmente coloniza la superficie de las raíces de la planta para, posteriormente, penetrar en las primeras capas de células de la epidermis (Yedidia et al., 1999; Chacón et al., 2007), donde permanece como un microorganismo simbionte no patogénico (Harman et al., 2004; Woo et al., 2006), induciendo cambios en la arquitectura de la raíz (Samolski et al., 2012) y otros cambios sistémicos que influyen sobre su capacidad de defensa contra patógenos y estreses abióticos (Hermosa et al., 2012; Hermosa et al., 2013). Además, mediante estudios transcriptómicos, se ha observado que en las primeras horas de interacción de *Trichoderma* con la planta tiene lugar, en ésta, una bajada en la expresión de genes de defensa relacionados con las rutas de señalización de SA y JA, hecho que permitiría a *Trichoderma* colonizar la raíz (Morán-Diez et al., 2012).

A su vez, en el establecimiento de la interacción con la planta, *Trichoderma* produce una gran variedad de MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) y algunos DAMPs (Damage-Associated), como la endopoligalacturonasa ThPG1 (Morán-Diez et

al., 2009), que activan la MTI (MAMP-Triggered Immunity) (Hermosa et al., 2012). Entre los MAMPs que se han identificado hay desde xilanasas (Rotblat et al., 2002) y celulasas (Martínez et al., 2001) hasta ceratoplataninas (Djonovic et al., 2006; Seidl et al., 2006), e incluso metabolitos secundarios como 6PP y otros que, a bajas dosis, pueden actuar como MAMPs (Vinale et al., 2008; Vinale et al., 2012; Garnica-Vergara et al., 2016).

Parece ser que debido a la producción de esa variedad de MAMPs, algunos poco comunes, la MTI desencadenada por *Trichoderma* es más fuerte que la PTI (PAMP-Triggered Immunity) determinada por los patógenos (Lorito et al., 2010). Aunque solo se ha podido identificar una asociación MAMP-PRR (Pattern Recognition Receptors), la de la xilanasa EIX de *T. viride* con el receptor LeEix2 (Ron & Avni, 2004), los genomas de *Trichoderma* son ricos en proteínas de unión a quitina con dominios de lisina, tipo LysM (Kubicek et al., 2011) y, por tanto, capaces de suprimir la respuesta PTI de la planta ya que secuestran quito-oligosacáridos susceptibles de ser reconocidos por receptores PRR como el LysM-CERL1 (de Jonge et al., 2010).

Las respuestas de la planta a la colonización por *Trichoderma* incluyen la secreción de peroxidasas (Howell et al., 2000), la biosíntesis de compuestos terpénicos (Howell, 2006), y la modificación de los niveles de JA, SA y ET (Harman et al., 2004; Lorito et al., 2010; Hermosa et al., 2013). Aunque también se sabe que *Trichoderma* es capaz de suprimir la producción de fitoalexinas (Masunaka et al., 2011) o degradar exudados fenólicos de la planta (Chen et al., 2011).

Por otro lado, y de forma similar a lo que ocurre con los fitopatógenos, *Trichoderma* puede producir efectores, también volátiles, que activan una respuesta ETI (Effector-Triggered Immunity) en la planta, pero en este caso de tipo “priming”. Varios trabajos han demostrado la existencia de “priming” por *Trichoderma* en ausencia de patógeno, es decir, predisponer a la planta para responder de forma más rápida y más intensa frente a un ataque posterior de un patógeno (Shoresh et al., 2005; Djonovic et al., 2007; Segarra et al., 2007; Tucci et al., 2011; Malmierca et al., 2012; 2015a; 2015b; Martínez-Medina et al., 2017). En este sentido, en *T. harzianum* y *T. atroviride* se han identificado proteínas homólogas a los efectores Avr4 y Avr9 de *Cladosporium fulvum* (Harman et al., 2004), y se han descrito receptores NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat) en plantas de judía en interacción con *T. atroviride* y en plantas de maíz en interacción con *T. harzianum* (Marra et al., 2006; Shoresh & Harman, 2008). Por tanto, las respuestas

defensivas provocadas por *Trichoderma* en la planta parecen cumplir también un modelo de “zig-zag” (Lorito et al., 2010).

Al contrario de los fitopatógenos, que activan la SAR señalizada por SA y asociada con un incremento en la expresión de genes PR en la planta, *Trichoderma*, al igual que otros hongos y bacterias beneficiosos, generalmente activa la ISR que culmina en la acumulación de compuestos asociados a las rutas de JA y ET como son la fenilamonio liasa y la peroxidasa (Shoresh et al., 2005; Contreras-Cornejo et al., 2017; Sharma et al., 2017). Sin embargo, también se han descrito respuestas de tipo SAR inducidas por *Trichoderma longibrachiatum* (Martínez et al., 2001), *T. virens* (Howell, 2006), *T. asperellum* (Segarra et al., 2007) y *T. harzianum* (Morán-Diez et al., 2009). Y, además, se ha confirmado que plantas tratadas con *Trichoderma* pueden desencadenar la respuesta SAR durante largos periodos de tiempo pero que, cuando son posteriormente infectadas por un patógeno, pueden inducir genes de la ruta del JA que dan lugar a la represión de genes del patógeno y que desencadenan una respuesta ISR prolongada en el tiempo (Tucci et al., 2011; Malmierca et al., 2012; 2013; 2015a; 2015b). Por tanto, la separación de respuestas ISR y SAR no parece estar claramente delimitada, debido a que cada día obtenemos más información que clarifica que no estamos ante dos términos absolutos.

La interacción entre *Trichoderma* y la planta es un proceso dinámico en el que, según la cepa de partida, la concentración de inóculo aplicada, el tipo de material vegetal, el estado de desarrollo de la planta y el momento y duración de la interacción, se pueden solapar la expresión de genes señalizados por las rutas de JA/ET y/o SA (Hermosa et al., 2012; Mendoza-Mendoza et al., 2018) (Figura 0.2). Además, ese diálogo no se puede separar de las respuestas defensivas de la planta contra estreses medioambientales, formando una red interconectada en la que fitohormonas como IAA, ABA y GAs desempeñan también un papel importante (Pieterse et al., 2009; Hermosa et al., 2013). Y, estudios transcriptómicos han demostrado también que *Trichoderma* induce de forma activa cambios sistémicos en la fisiología de la planta, modulando la expresión de genes relacionados con estreses bióticos y abióticos (Alfano et al., 2007; Morán-Diez et al., 2012).

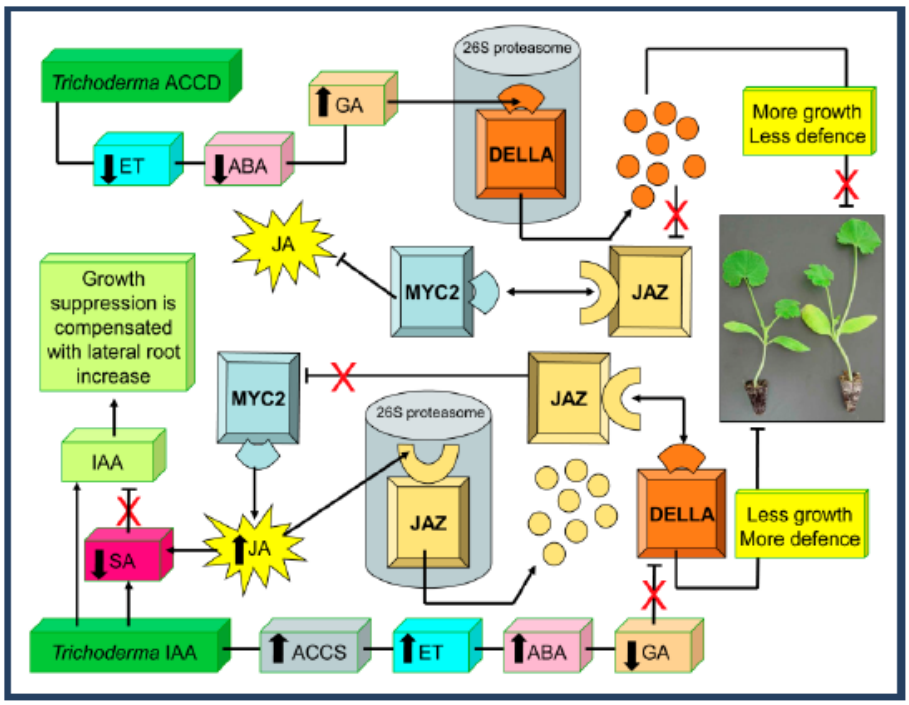


Figura 0.2: Modelo hipotético de interacción fitohormonal *Trichoderma*-planta. El descenso en la cantidad de etileno (ET), provocado por acción de la ACC-desaminasa del hongo, y la producción de ácido indol acético (IAA), producen cambios en la red hormonal de la planta que determinan el equilibrio crecimiento/defensa de la misma. **ABA**: ácido abcísico, **GA**: giberelinas, **JA**: ácido jasmónico, **ACCD**: 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminasa, **ACCS**: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa, **MIYC2**: factor de transcripción de genes de respuesta a JA, **DELLA**: reguladores negativos de la señalización de GA, y **JAZ**: proteínas "jasmonate ZIM domain", reguladores negativos de la señalización de JA. Extraída de Hermosa et al. (2013).

1.3.6.- Incremento de la tolerancia frente a estreses abióticos

Los efectos beneficiosos de *Trichoderma* en plantas sometidas a estreses abióticos están bien documentados (Donoso et al., 2008; Bae et al., 2009; Shoresh et al., 2010; Kashyap et al., 2017; Mishra et al., 2017), aunque muchos de los factores que controlan el estrés en las plantas son todavía desconocidos.

Mastouri et al. (2010) publicaron que el tratamiento de semillas de tomate con *T. harzianum* acelera su germinación, incrementa el vigor de las plántulas y aminora los efectos provocados por estreses térmico, osmótico, salino e hídrico, ya que induciría cambios fisológicos en la planta contra los daños oxidativos. Algo también observado por Ghorbanpour et al., (2018) en tomates sometidos a bajas temperaturas, o por Yasmeen & Siddiqui (2018) en maíz y arroz sometidos a salinidad, también observado en tomates (Rubio et al., 2017). Estas respuestas son comparables a los efectos provocados por

Serendipita indica (o *Piriformospora indica*) durante la simbiosis que establece con la planta (Vadassery et al., 2009). Un mecanismo común a través del cual los hongos beneficiosos y las bacterias PGPR aumentan la tolerancia de éstas a los estreses abióticos, sería la disminución del daño causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocurre en las plantas estresadas (Mastouri et al., 2010).

1.4.- *Trichoderma* como fuente de genes

Teniendo en cuenta los distintos mecanismos de biocontrol, queda claro que existen muchos genes y productos génicos implicados en dichos procesos, que son susceptibles de ser aislados y clonados para producir cultivos transgénicos resistentes a enfermedades. Estos genes constituyen una fuente importante para el desarrollo de la biotecnología agrícola (Lorito et al., 1998; Hermosa et al., 2000; Vizcaíno et al., 2006; Hermosa et al., 2011b; Nicolás et al., 2014).

Un estudio pionero demostró que genes de *Trichoderma* podían ser funcionalmente expresados en plantas para conferirles características beneficiosas, principalmente en el control de enfermedades. En este estudio, se consiguieron altos niveles de expresión del gen *chit42* de la endoquitinasa de *T. harzianum* en diferentes tejidos de la planta, lo cual confirió resistencia a líneas transgénicas de patata y tabaco frente a patógenos foliares como *Alternaria alternata*, *A. solani* y *Botrytis cinerea*, además del patógeno de raíz *Rhizoctonia solani* (Lorito et al., 1998). Posteriormente, la introducción de este gen en otros cultivos demostró resistencia frente a distintos patógenos, como es el caso de la resistencia a *Venturia inaequalis* en manzanos (Bolar et al., 2001), a *Alternaria brassicicola* en brócoli (Mora & Earle, 2001), o a *Phoma tracheiphila* y *B. cinerea* en limoneros (Gentile et al., 2007; Distefano et al., 2008). Además, también se expresaron en plantas diferentes genes relacionados con la actividad quitinasa, como el gen *chit42* de *T. virens*, que confiere resistencia a *R. solani* en arroz (Shah et al., 2009); el gen *Tv-ech1* de *T. virens*, que aumenta la resistencia del algodón a *A. alternata* y *R. solani* (Emani et al., 2003; Kumar et al., 2009) (Figura 0.3); o el gen *chit36* de *T. harzianum*, que es capaz de propiciar una mayor tolerancia en zanahoria frente a los patógenos *A. radicina* y *B. cinerea* (Baranski et al., 2008).

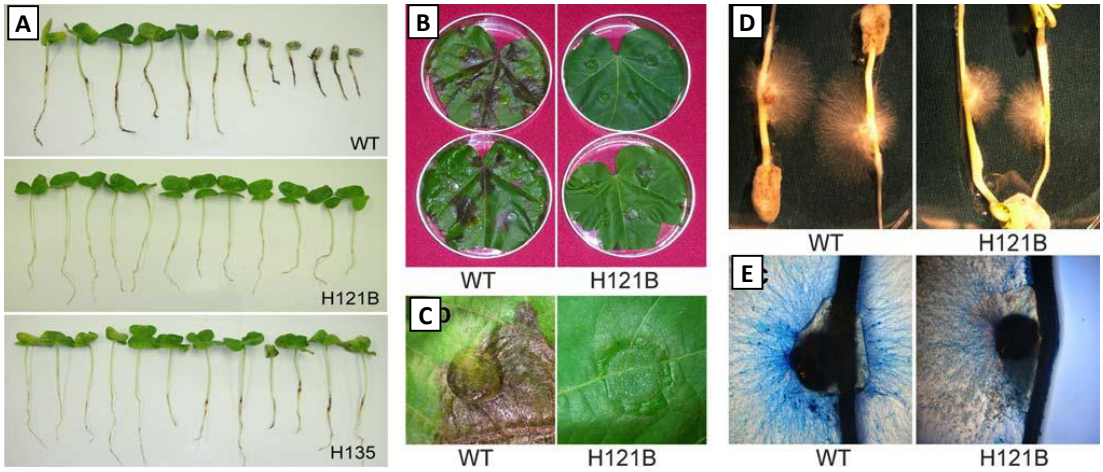


Figura 0.3: Resistencia frente a *R. solani* de algodón transgénico que expresa una endoquitinasa de *T. virens*. A: Severidad de la enfermedad en el ecotipo silvestre (WT) y plántulas transgénicas después de 6 días; **B:** Hojas de WT y línea transgénica infectadas con el hongo; **C:** Aumento del área infectada; **D:** Inhibición del crecimiento del micelio del hongo a través de la raíz de línea transgénica; **E:** Una imagen más ampliada del micelio teñido con lactofenol. Extraído de Kumar et al. (2009).

Otros estudios se han basado en la expresión simultánea de varios genes de *Trichoderma* en la planta, con muy buenos resultados, como son la resistencia frente a *R. solani* y *Magnaporthe grisea* en arroz por la presencia de varios transgenes que codificaban dos quitinasas (*ech42* y *nag70*) y una β-1,3-glucanasa (*gluc78*) de *T. atroviride* (Liu et al., 2004).

Adicionalmente, la expresión de los genes *chit33* y *chit42* de *T. harzianum* en tabaco fue capaz de generar una respuesta defensiva innata en la planta y una mayor tolerancia frente a estrés salino (Dana et al., 2006), lo cual abre la posibilidad de que estas quitinasas puedan actuar sobre hongos endófitos, haciendo que liberen quito-oligosacáridos que actúan como inductores generales de la respuesta defensiva frente a distintos tipos de estrés (Hermosa et al., 2012).

Por otro lado, una importante ventaja biotecnológica ha sido la expresión del gen *hsp70* de *T. harzianum* en arabidopsis, induciendo resistencia a altas temperaturas, alta salinidad y sequía, sin disminución del crecimiento vegetal o presencia de alteraciones en el desarrollo (Montero-Barrientos et al., 2010). O la transformación de plantas de tabaco con un gen del mismo hongo que codifica para una aquagliceroporina, mejorando el uso eficiente del agua de esas plantas y aumentando su tolerancia a la sequía (Vieira et al., 2017).

1.5.- Otras aplicaciones de *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* poseen características que las dotan de un gran interés no solo para la agricultura, sino también para las industrias biotecnológicas (alimentaria, textil, farmacéutica y ambiental). La capacidad de algunas cepas de especies de *Trichoderma* de secretar gran cantidad de proteínas, las convierte en una alternativa como fábricas celulares para la producción de proteínas con diferentes fines biotecnológicos, y para las cuales, ya se dispone de sistemas de transformación eficaces (Cardoza et al., 2006; Steiger et al., 2011; di Cologna et al., 2017; Kidwai & Nehra, 2017). El mejor ejemplo de especies de *Trichoderma* con interés industrial es *T. reesei*, cuya eficiente maquinaria de producción y secreción de celulasas ha dirigido su explotación comercial hacia áreas tan diversas como las fermentaciones alcohólicas, los detergentes para el lavado de ropa, la producción de ropa vaquera (denim) rota, el blanqueo del papel, la alimentación animal o la producción de combustible (Schuster et al., 2012; Druzhinina & Kubicek, 2017; Ellilä et al., 2017; Gao et al., 2017; Li et al., 2017; Lin et al., 2017; Wang et al., 2017). Aplicaciones parecidas se han encontrado posteriormente para *T. harzianum* (Libardi et al., 2017), *T. viride* (Taha, 2017) y *T. atroviride* (Oszust et al., 2017).

Pero estas especies de interés industrial de *Trichoderma* también son capaces de producir otras muchas enzimas y compuestos con numerosas aplicaciones. Por ejemplo, enzimas lacasas con actividad biodegradante y detoxificante de colorantes (Bagewadi et al., 2017; Shanmugam et al., 2017); xilanasas para el blanqueamiento natural de pulpa de papel (Korkmaz et al., 2017; Nathan et al., 2017; de Oliveira et al., 2017); u otras enzimas para la producción de etanol a partir de residuos vegetales (Manavalan et al., 2017; de Silva-Delabona et al., 2017; Souza et al., 2017). Además, en la actualidad se encuentra en constante avance el escalado industrial de producción de diferentes compuestos por parte de *Trichoderma*, como es el caso del ácido galactárico por *T. reesei* (Paasikallio et al., 2017).

Algunas especies de *Trichoderma* se han registrado para su aplicación comercial como productos fungicidas en agricultura (Monte, 2001). En España, están registrados en el MAPAMA, como productos pioneros, dos formulados a base de *Trichoderma*: TUSAL® (*T. atroviride* T11 + *T. asperellum* T25) y Bioten® (*T. asperellum* ICC012 + *T. gamsii* ICC080). E incluso como fungicida de aplicación foliar (Oros & Naár, 2017). Más recientemente se ha registrado Trianum® (*T. afroharzianum* T22). Las materías

activas de estos tres productos comerciales registrados en España son de las pocas cepas de *Trichoderma* con registro europeo para su venta.

También, las especies de *Trichoderma* se usan en la biorremediación de los suelos (Cao y col., 2008; Hoseinzadeh et al., 2017). Se ha demostrado que cepas de *T. harzianum, T. atroviride* y *T. asperellum* son capaces de aliviar la fitotoxicidad de plantas de lechuga y espinaca irrigadas con agua contaminada con arsénico (Caporale y col., 2014; Su et al., 2017) o de garbanzo al conjugar este contaminante con complejos orgánicos (Tripathi et al., 2017), y que una glicoproteína de *T. harzianum* podría tener un alto potencial biotecnológico para eliminación de fosfatos en el suelo (Souza y col., 2016). Por otro lado, se ha observado como la inoculación de plantas de arroz con diferentes cepas de *Trichoderma* mejora su tolerancia frente a la presencia de Cd en el suelo (Nongmaithem et al., 2017), o como *T. asperellum* reduce la fitotoxicidad provocada por Cu en cebolla (Vargas et al., 2017). También se ha identificado a *T. harzianum* como un bioabsorbente efectivo de fluoruros (Koshle y col., 2016), y Cr (Smily et al., 2017) para la descontaminación de aguas subterráneas, o como biorremediador de suelos contaminados con hidrocarburos (Cuaical & David, 2016).

Otras aplicaciones industriales muy interesantes del género *Trichoderma* son, por ejemplo, la producción de biodiesel a partir de aceite sintetizado por *T. reesei* (Bharathiraja et al., 2017), la utilización de peptaibióticos secretados como sustrato de celdas de combustible microbianas (Ray et al., 2017), su uso en la fermentación de salvado de trigo para alimentar pollos (Elmasry et al., 2017) o de cáscaras de bananas para alimentar a animales monogástricos (Katongole et al., 2017).

2.- BRASSICACEAE

La Familia Brassicaceae, incluye a las plantas brasicáceas, también llamadas crucíferas (Cruciferae) por los pétalos en forma de cruz de sus flores, se caracteriza por tener una gran diversidad e incluir entre sus miembros numerosas especies de interés agrícola, con una producción anual en Europa de más de 70 millones de toneladas. Esta familia se sitúa dentro del Orden Brassicales, su origen se sitúa en el Mediterráneo y Asia Menor (actual Turquía asiática), donde siguen creciendo de forma silvestre, y por selección natural o mutación, han dado lugar a las especies actualmente cultivadas. El cultivo de brasicáceas comenzó 2.500 años a.C., cuando el repollo, la coliflor y el brócoli

no eran utilizados como alimento, sino como plantas medicinales (Jansen et al., 2001; Cafferty & Jarvis, 2002; Avato & Argientieri, 2015).

Las características principales de las especies cultivadas de crucíferas son:

- Herbáceas.
- Dicotiledóneas.
- Ciclos de vida cortos, de 3 a 10 meses.
- Sistema radicular pivotante, con raíces que pueden servir como órgano de almacenamiento.
- Tallo cilíndrico y ramificado.
- Inflorescencias en racimos, con flores hermafroditas, actinomorfas y con cuatro sépalos alternando con los cuatro pétalos.
- Polinización generalmente cruzada, por insectos polinizadores.

La Familia Brassicaceae consta de aproximadamente 4.000 especies dentro de unos 400 géneros. El género *Brassica* es el mayoritario y más importante, al incluir unas 30 especies e híbridos de gran interés agronómico y económico, de distribución mundial, debido a su alta capacidad de adaptación. La relevancia de las plantas brasicáceas radica en que presentan diferentes órganos comestibles, como las raíces (nabo), las hojas (col de Bruselas, repollo), las flores (coliflor, brócoli) y las semillas (colza, mostaza). Además, estas partes comestibles se consideran como alimentos funcionales que ayudan a prevenir el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, como la hipertensión, la arterioesclerosis, algún tipo de cáncer o la diabetes, al aportar a su consumidor caretonoides, clorofilas, vitamina C, compuestos fenólicos y glucosinolatos (Vallejo et al., 2002; Heimler et al., 2006; Avato & Argientieri, 2015; Wu et al., 2017).

Aunque existen muchas especies, la importancia económica real de estas plantas se centra prácticamente en exclusiva en seis especies y sus variedades (Arias-Carmona, 2009).

ESPECIE	VARIEDAD	NOMBRE COMÚN
Brassica oleracea	*acephala*	Berza
	costata	Asa de cántaro
	capitata capita alba	Repollo de hojas lisas
	capitata capitata rubra	Lombarda
	capitata sabauda	Repollo de hojas rizadas (col de Milán)
	gongylodes	Colirrábano
	botrytis botrytis	Coliflor
	botrytis italica	Bróculi
	gemmifera	Col de Bruselas
Brassica rapa	*oleífera*	Nabina
	rapifera o rapa	Nabo, nabiza, grelo
	pekinensis	Repollo chino
	chinensis	Col china
Brassica nigra		Mostaza negra
Brassica juncea		Mostaza india
Brassica carinata		Mostaza etíope
Brassica napus	*oleífera*	Colza
	rapifera o napobrassica	Colinabo o rautabaga
	pabularia	Nabicol

Figura 0.4: Especies y variedades del género *Brassica* con importancia económica. Extraído de Arias-Carmona (2009).

Las seis especies reunidas en la Figura 0.4 están filogenéticamente relacionadas entre ellas, y fue el investigador japonés Nagharu U quien en el año 1935 describió por primera vez estas relaciones en el denominado "triángulo U" (Figura 0.5), donde en los vértices se sitúan las tres especies diploides y en las aristas las otras tres especies anfidiploides, resultando de cruces entre las especies diploides (Arias-Carmona, 2009; Poveda, 2017)

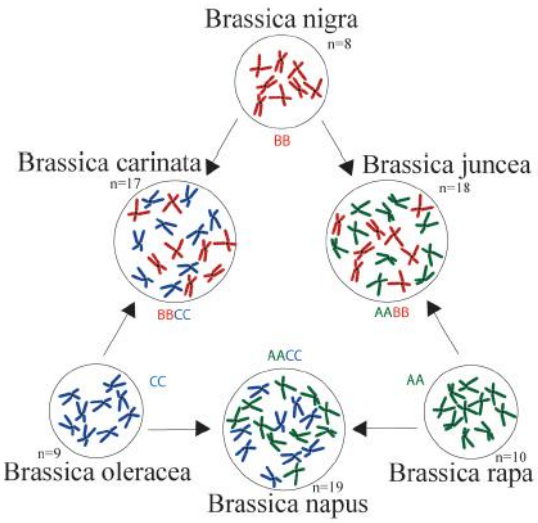


Figura 0.5: Triángulo U del género *Brassica*. Extraído de Obregón-Cano (2016).

En el vértice superior nos encontramos con la especie *Brassica nigra*, con 16 cromosomas (2n=16; n=8), mientras que en el vértice inferior-izquierda se sitúa la especie *Brassica oleraceae*, con 18 cromosomas (2n=18; n=9). La hibridación de estas dos

especies por polinización cruzada da como resultado la especie *Brassica carinata* con 34 cromosomas (2n=34; n=8+9) (Poveda, 2017).

En el vértice inferior-derecha se localiza la especie *Brassica rapa*, con 20 cromosomas (2n=20; n=10). Por lo tanto, el cruce de las especies de los vértices inferiores dará como resultado una especie con 38 cromosomas (2n=38; n=9+10), denominada *Brassica napus*. Mientras que el cruce del vértice superior con el inferior-derecha resultará en una especie con 36 cromosomas (2n=36; n=8+10), denominada *Brassica juncea* (Poveda, 2017).

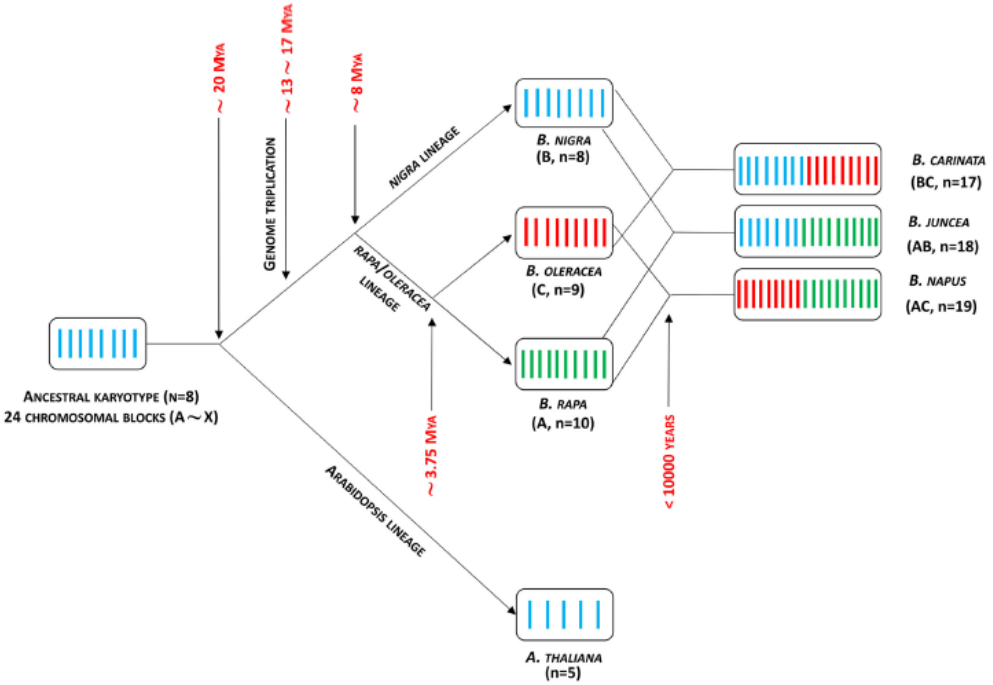


Figura 0.6: Modelo de la evolución en los genomas de *Brassica*. Extraído de Borpatragohain et al. (2016).

Los géneros *Brassica* y *Arabidopsis* se separaron evolutivamente hace 20-45 millones de años (Figura 0.6). Las comparaciones genéticas entre *Arabidopsis thaliana* y las especies diploides del género *Brassica* indican que los genomas de estas últimas han evolucionado a partir de la anterior, con extensas duplicaciones, seguidas de fragmentaciones y ordenamientos. Por otro lado, la comparación con el anfidiploide *B. napus* reveló que existen 21 bloques génicos compartidos con arabidopsis y que, si son duplicados y reorganizados, representan el 90% del genoma de *B. napus* (Sivasubramanian et al., 2015; Yu et al., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- ORGANISMOS UTILIZADOS

1.1.- Plantas

En la realización de este trabajo se han empleado semillas de la especie *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0), que forma parte de la colección *Arabidopsis Information Service* (AIS), la cual se ha integrado dentro de la colección europea del *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) (*http://arabidopsis.info/BrowsePage*).

Además, se han usado semillas de la especie *B. napus* (colza) variedad de primavera Jura, adquirida a la empresa Euralis Semillas (Sevilla). Y de *Solanum lycopersicum* (tomate), variedad Marmande raf de Semillas Batlle (Barcelona).

1.1.1.- Mutantes de arabidopsis

Para evaluar el papel del SA se utilizó el mutante de inserción de ADN-T, At1g74710 (SALK_088254), incapaz de sintetizar la hormona, denominado *sid2* (*Salicylic Acid Induction Deficient 2*), cedido amablemente por la Dra. García-Agustín (Universidad Jaime I, Castellón).

Para evaluar el papel del JA en la falta de micorrización por parte de arabidopsis se utilizó el mutante *coi1-30* (*Coronatine Insensitive 1*) insensible a JA, cedido amablemente por el laboratorio del Dr. Roberto Solano (Centro Nacional de Biotecnología-CSIC).

Trabajos previos en nuestro laboratorio habían comprobado estos dos mutantes con los oligonucleótidos específicos de cada gen.

1.2.- Microorganismos

Los microorganismos empleados a lo largo de la experimentación han sido las bacterias *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*, y los hongos *T. harzianum*, *T. parareesei*, *Botritys cinerea*, *Phoma lingam* y cinco especies de la micorriza *Rhizophagus* (anteriormente *Glomus*). Las distintas cepas utilizadas junto con sus características más relevantes, uso y origen o referencia bibliográfica, se detallan en la Tabla 1.

Para los análisis de microscopia confocal se utilizó una cepa de *T. harzianum* que expresaba el gen GFP (proteína verde fluorescente) de *Aquarea victoria*, cedida amablemente por la Dra. Ana Rincón (Universidad de Sevilla) (Chacón et al., 2007).

Las células competentes de la cepa ARqua-1 de *A. rhizogenes* fueron facilitadas por el grupo de Paredes Celulares y Crecimiento Vegetal de la Universidad de Salamanca. Mientras que el fitopatógeno *P. lingam* fue cedido amablemente para fines de investigación en nuestro grupo por el Centro Regional de Diagnóstico de la Junta de Castilla y León (Aldearrubia, Salamanca).

Tabla 1: Cepas *de E. coli* (E), *A. tumefaciens* (A), *A. rhizogenes* (R) *T. harzianum* (H), *T. parareesei* (T), *P. lingam* (P) y *B. cinerea* (B), y especies del género *Glomus* (en la actualidad, género *Rhizophagus*), utilizadas en el trabajo.

Cepa/Especie	Características	Uso	Referencia/ Origen
DH5α (E)	F^-, ϕ80d*lac*ZΔM15, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17(r_K^-, m_K^+), *sup*E44, *deo*R, *rel*A1, Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169	Subclonación de fragmentos de ADNc. Células competentes.	Hanahan, 1983
C58C1 (A)	*Rif^r, contiene plásmido binario pGV2260, cb^r*	Transformación de *A. thaliana* y *B. napus*. Células competentes.	Deblaere et al., 1985
ARqua-1 (R)	*$Strep^r$,contiene el plásmido pRiA4b*	Transformación de raíces de *B. napus*. Células competentes.	Quandt et al., 1993
CECT 2413 T34 (H)	Cepa utilizada para ensayos *in vitro* e *in planta*	Inoculación de plantas de *A. thaliana*, *B. napus* y *S. lycopersicum*	Colección Española de Cultivos Tipo
IMI 113135 T6 (T)	Cepa utilizada para ensayos *in planta*	Inoculación de plantas de *A. thaliana*, *B. napus* y *S. lycopersicum*	International Mycological Institute
CRD 13/125/99 (P)	-	Infección de *B. napus*	Aislada de campo cultivo de colza (Palencia)
B05.10 (B)	Utilizada como cepa modelo en numerosos estudios, siendo la única cepa de este hongo cuyo genoma está secuenciado.	Infección de *A. thaliana*.	Aislada de campo cultivo de vid (Cádiz)
Glomus mosseae, G. microaqreatum, G, etunicatum, G. intraradices y *G. claroideum*	Formulado de hongos endomicorrízicos de aplicación en agricultura.	Micorrización de plantas.	MIRATEXT 02 (M2)

1.3.- Mutantes de *Trichoderma*

Para los estudios basados en el papel del gen *Thkel1* en la colonización de la planta por parte de *T. harzianum* se utilizó un mutante de silenciamiento basado en la generación de un intrón que contenía ARN "horquillados" autocomplementarios (ihpRNA). Este mutante fue obtenido dentro de nuestro grupo de investigación (Hermosa et al., 2011a).

1.4.- Vectores empleados

Los vectores utilizados en este trabajo se muestran en la Figura 0.7, donde se detallan los mapas correspondientes y se indican sus características más destacables (Tabla 2).

Tabla 2: Vectores utilizados.

Plásmido	Resistencia	Utilización	Referencia
pDONR201	Kan^r	Clonación directa de productos de PCR y posterior secuenciación.	Invitrogene
pKGWFS7	Spec^r	Construcciónes para la transformación de plantas de *A. thaliana* y *B. napus*.	Karimi et al., 2002

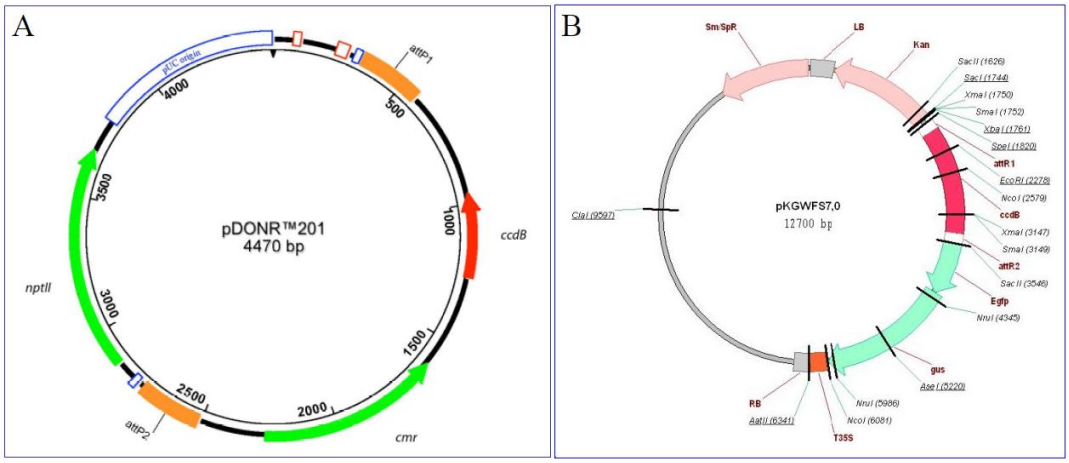


Figura 0.7: Mapa del vector pDONOR201 (A) y pKGWFS7 (B).

2.- CRECIMIENTO VEGETAL

2.1.- Siembra

Las semillas de *B. napus, A. thaliana* y *S. lycopersicum* se esterilizaron superficialmente mediante un lavado de entre 20-30 min con etanol al 70% y Tritón X-100 al 1% en agitación. A continuación, se realizó un lavado de 10 min con hipoclorito

sódico al 2,5% y Tritón X-100 al 0,005%. Finalmente, las semillas se lavaron exhaustivamente en agua estéril, repitiendo el proceso cuatro veces.

Estas semillas se sembraron en medio MS (4.9 g/L) (Murashige & Skoog, 1962) preparado comercialmente por Duchefa Biochemie (Harlem, Holanda), con sacarosa al 1%. El pH se ajustó a 5,7 con KOH antes de esterilizarlo en el autoclave. Para obtener MS sólido se añadió agar al 1%. La germinación de las semillas obtenidas de plantas transgénicas se realizó en presencia de kanamicina (50 mg/L), de acuerdo a la resistencia incluida en el plásmido para su selección, y de cefotaxima (400 mg/L), con el fin de impedir el crecimiento de posibles células de *A. tumefaciens*. Los antibióticos se añadieron después de esterilizar el medio.

La siembra se realizó en placas Petri, con todo el material estéril, en cabina de flujo laminar horizontal. Habitualmente se sembraron 30 semillas de colza por placa y 45 de tomate, tomando las semillas con una pinza y depositándolas una a una en la superficie del medio de cultivo. Una vez sembradas, las placas Petri se precintaron con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, que constituye una barrera efectiva para cualquier partícula, pero no impide el intercambio de aire y gases con el exterior. Se colocaron en una cámara iluminada (Fitotron AGP-1400-HR, Radiber SA, España), con un fotoperiodo de 16 h de luz (80-100 E/m^2/seg) y 8 h de oscuridad a temperatura de 22ºC y una humedad relativa del 40-50%.

En los ensayos realizados en cultivo hidropónico la siembra de semillas de *A. thaliana* se llevó a cabo en cajas Phytatray II (Sigma), en cuyo interior se colocó una lámina de acero inoxidable con una gasa estéril. A cada caja se añadieron 50 mL de MS líquido y se depositaron 200 semillas antes de precintarla, con esparadrapo quirúrgico Micropore Scotch 3M, y guardarla en agitación (90 rpm) en una cámara iluminada con las mismas condiciones mencionadas anteriormente (Alonso-Ramírez et al., 2015).

2.2.- Crecimiento

Las plántulas de *A. thaliana* germinadas *in vitro* en medio sólido MS durante 10-12 días, se pasaron a alveolos para su crecimiento en sustrato, que contenía turba (Sustrato profesional TREF, Moerdijk, Holanda) y vermiculita exfoliada en la proporción 3:1. En el caso de las plantas de colza, se pasaron al sustrato a los 7 días, mientras que los tomates se traspasaron a los 16 días.

Las bandejas de alveolos estuvieron sometidas a irrigación continua para mantener un nivel de humedad adecuado. Cada alveolo se destinó al cultivo de una sola planta, trasplantada desde una placa Petri en la que había permanecido durante los primeros días de su ciclo de vida. Las plántulas completaron su desarrollo en invernadero.

3.- MANIPULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

3.1.- Medios de cultivo

- Medio Luria-Bertani (LB): bactotriptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%, pH 7 (ajustado con NaOH). En caso de su utilización en sólido se añadió agar al 1,5%.
- Extracto de Malta y Agar (MEA): peptona micológica OXOID (1%), extracto de malta (1,5%) y agar (1,5%).
- Patata Dextrosa Agar (PDA): Sigma, se resuspendieron 39 g en 1 L de agua destilada y agar (1,5%).
- Caldo de Patata Dextrosa (*Potato Dextrose Broth*, PDB): medio con patata sin agar de Sigma, se resuspendieron 324 g en 1 L de agua destilada.

Todos los medios se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en autoclave 20 min a 120ºC, manteniéndolos a 4ºC hasta su utilización.

3.2.- Cultivos bacterianos

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37ºC y en agitación constante (225 rpm) en un agitador orbital. Para estimar el crecimiento de los cultivos, se midió la D.O. a 600 nm. Se siguió el mismo procedimiento en el caso de *A. tumefaciens*, salvo que se incubó a 28ºC. Mientras que para *A. rhizogenes* se realizó un cultivo en placa a 28ºC.

Cuando fue necesaria la selección de clones por resistencia a antibióticos, los medios se suplementaron con espectinomicina (Spec) (50 mg/mL), kanamicina (Kan) (50 mg/mL), o rifampicina (Rif) (0,14 mg/mL), preparados en agua y esterilizados por filtración a través de filtros estériles de 0,45 µm de diámetro de poro (Albet); del mismo modo se preparó la cefotaxima utilizada para eliminar las cepas de *Agrobacterium* tras la transformación.

3.3.- Cultivo de *Trichoderma*

3.3.1.- Recogida de esporas

Para la obtención de esporas, *Trichoderma* se cultivó en medio PDA a 25-30ºC durante 5-7 días, tiempo suficiente para que toda la superficie de la placa estuviera cubierta de esporas. Éstas se recogieron añadiendo 5 mL de agua destilada estéril por placa y raspando la superficie de la misma con la propia punta de la pipeta. A continuación, se filtró la suspensión de esporas en un tubo eppendorf a través de lana de vidrio para eliminar restos de micelio. Las esporas se almacenaron a 4ºC hasta su uso.

3.3.2.- Cultivo para la obtención de micelio

Se utilizaron matraces de 1 L que contenían 400 mL de medio PDB, inoculados con esporas de *Trichoderma* a una concentración final de 10^6 esporas/mL, que se incubaron a 28ºC durante 48 h y en agitación (250 rpm). La biomasa obtenida se recogió mediante filtración por vacío a través de papel de filtro. El micelio se lavó con agua destilada estéril y se utilizó inmediatamente (Apartado 3.4).

3.4.- Inoculación con *Trichoderma*

Para la inoculación de las plantas con *Trichoderma* se midió la concentración de esporas obtenidas por recuento en cámara de Thoma. Para facilitar la observación de las esporas se diluyó la suspensión inicial en una proproción 1:100. Tras ello, se procedió a la observación en microscopio óptico añadiendo 100 µL de la suspensión en la cámara y determinando el número de esporas por cuadrante. La concentración de esporas de la suspensión inicial se halló aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas/mL} = \chi \times 25 \times 10^4 \times 10^2$$

Siendo χ la media aritmética de las esporas contadas en cada cuadrante, y 10^2 el factor de dilución.

Cada planta de *A. thaliana* en tierra se inoculó con 1 mL de solución de esporas a una concentración de 2×10^7 esporas/mL. La inoculación se realizó introduciendo la pipeta en la tierra y procurando soltar las esporas lo más cerca posible de la raíz principal.

Para la inoculación de las plántulas obtenidas en las cajas Phytatray II se utilizó micelio de *T. harzianum* (Apartado 3.3.2).

3.5.- Aplicación de los hongos micorrícicos

Para los ensayos de micorrización, antes del paso de las plántulas al sustrato de crecimiento, se realizaron en los alveolos agujeros de unos 5 cm de profundidad, donde se añadió 1 g de producto de micorrización, que contenía aproximadamente 1.000 esporas, se tapó con el sustrato, y se depositaron las plántulas encima con ayuda de unas pinzas, una a una. Las bandejas se cubrieron con plástico los primeros 4-5 días, con el fin de mantener niveles altos de humedad.

3.6.- Infecciones fúngicas

3.6.1.- *B. cinerea*

Los ensayos de infección con el hongo necrotrofo *B. cinerea* se realizaron sobre hojas de *A. thaliana* Col-0 y la línea transgénica Kel2, con y sin micorrizas, en papel de filtro sobre placas Petri que se saturaron de agua, con el fin de mantener una humedad en el microambiente cercana al 90%, sellando además las placas con parafilm.

La infección se llevó a cabo colocando en la supericie de las hojas una gota de 5 µL que contenía 1.000 esporas de *Botrytis* en solución de germinación (glucosa 20 mM, KH_2PO_4 20 mM, pH 6,5 ajustado mediante KOH). Las placas se llevaron a una cámara iluminada (Fitotron AGP-1400-HR, Radiber SA, España), con un fotoperiodo de 16 h de luz (80-100 E/m^2/seg) y 8 h de oscuridad a temperatura de 22ºC y una humedad relativa del 40-50%.

Para la infección *in planta* la metodología es similar, salvo que se mantienen las plantas junto con los alveolos en compartimentos de plástico transparentes aislados y con alta humedad, también dentro del fitotrón.

3.6.2.- *P. lingam*

La infección de hojas de colza con el patógeno *P. lingam* se realizó depositando un disco de agar, proveniente de un cultivo de 7-10 días en PDA, sobre las quintas y sextas hojas, cortadas cuando comenzaba a salir la octava. Las hojas de colza se pusieron, al igual que las de arabidopsis, sobre un papel de filtro saturado de agua en una placa Petri que se selló con parafilm. Las placas se mantuvieron en cámara iluminada (Fitotron AGP-1400-HR, Radiber SA, España), con un fotoperiodo de 16 h de luz (80-100 E/m^2/seg) y 8 h de oscuridad a temperatura de 22ºC y una humedad relativa del 40-50%.

3.7.- Conservación de cepas fúngicas

Las cepas de *Trichoderma* y de los hongos fitopatógenos se conservaron en placas de PDA. Las placas se inocularon depositando en el centro cilindros de agar, procedentes de cultivos anteriores, o con suspensiones de esporas, y se incubaron a temperaturas de 25-30ºC. Una vez que los cultivos habían crecido, las placas se conservaron a 4ºC selladas con parafilm durante períodos inferiores a un mes.

Los formulados de los hongos micorrícicos fueron mantenidos en cámara fría a una temperatura de 4ºC.

4.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1.- Extracción de ADN genómico

4.1.1.- *A. thaliana* y tomate

La extracción del ADN genómico se realizó mediante el protocolo descrito por Amani et al. (2011). El material de partida fueron 50 mg de tejido vegetal que se homogeneizaron con nitrógeno líquido. El homogeneizado obtenido se resuspendió en 500 µL del buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%) y se trituró en un Silamat S5 (Ivoclar Vivadent, Madrid) durante 5 seg. Con el fin de romper las células completamente, los tubos se incubaron a 60ºC durante 30 min. A continuación, se añadió a cada tubo un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezclaron y se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 5 min y a 4ºC. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se mezcló con un volumen igual de isopropanol y se incubó a -20ºC durante 30 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min. Tras secar el sedimento, se lavó con 100 µL de buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Finalmente, para la precipitación del almidón y otros polisacáridos insolubles, los tubos se mantuvieron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante resultante contenía el ADN y se almacenó a 4ºC hasta su uso.

4.1.2.- *B. napus*

El ADN genómico se obtuvo con el kit “ADN from Plant Tissue (Mini)” (Quiagen) siguiendo la técnica standard descrita por el proveedor. El material de partida fueron 100 mg de tejido vegetal que se homogeneizaron con nitrógeno líquido. El homogeneizado obtenido se resuspendió en 400 µL del buffer de lisis (AP1), al que se añadieron 4 µL de

RNasa A y se incubó durante 10 min a 65ºC. A continuación, se añadieron 130 µL del buffer de precipitación (AP2), la mezcla se incubó en hielo durante 5 min con el objetivo de precipitar detergentes, polisacáridos y proteínas. Pasado este tiempo, el lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. El sobrenadante resultante se transfirió a una columna QIAsheder, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min. Posteriormente, el sobrenadante recogido se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadieron 1,5 volúmenes de buffer de unión (AP3/E), con el fin de precipitar el ADN. La mezcla se transfirió a una columna DNeasy minispin, y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µL del buffer de lavado (AW), y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min. Este último paso se repitió pero centrifugando durante 2 min, para secar totalmente la membrana de la columna, eliminando los posibles restos de etanol. Finalmente se añadieron 100 µL del buffer de elución (AE) y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 min para recuperar el ADN. El sobrenadante resultante se almacenó a 4ºC hasta su uso.

4.2.- Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN de plantas de *A. thaliana, B. napus* y *S. lycopersicum* se utilizó el reactivo de aislamiento en un solo paso TRI Reagent (Ambión), siguiendo las instrucciones del suministrador. El material de partida para la extracción fueron 100 mg de tejido congelado en nitrógeno líquido, que se disgregó en un tubo eppendorf utilizando una varilla estéril. Se colocó en N_2 líquido para mantener congelado el tejido, se añadió 1 mL de “TRI Reagent” por cada 100 mg de tejido y se trituró en un Silamat S5 durante 5-10 seg. A continuación, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 200 µL de cloroformo agitando en un vórtex durante 20 seg y se incubó 15 min nuevamente a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C, se recogió la fase acuosa y se le añadieron 500 µL de isopropanol agitando de nuevo en vortex durante 10 seg. La mezcla se dejó incubando durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4ºC, se descartó el sobrenadante y se le añadió 1 mL de etanol frío al 70%, se agitó en vortex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar durante 5 min y se resuspendió en 20-50 µL de agua tratada con DEPC.

4.3.- Cuantificación

La determinación de las concentraciones de ácidos nucleicos presentes en las diferentes muestras se realizó utilizando el equipo Nanodrop Technologies Inc. Se trata de un espectrofotómetro ultrasensible de medición de ácidos nucleicos, que, a través de un programa informático, proporciona los ng/µL de ADN o ARN presentes en la muestra. Al mismo tiempo proporciona la medida de diferentes D.O.

Como valores de D.O. 260/280 y 260/230 indican el grado de contaminación en proteínas y azúcares, respectivamente, sólo se utilizaron las muestras con relación $D.O._{260}/D.O._{280}$ igual a 2.

El sistema de utilización del Nanodrop fue mediante estandarización de un blanco con el buffer TE o el agua MQ en el que estaba resuspendido el ADN, para lo cual se suspendió 1 µL del mismo en el soporte específico. De la misma manera se fueron suspendiendo las diferentes muestras, obteniéndose así cada una de las medidas. En el caso del ARN y del ADNc se utilizaron como blanco agua con DEPC y agua MQ, respectivamente.

4.4.- Obtención de ADN complementario: transcriptasa inversa

Para la síntesis de la primera cadena de ADNc a partir de ARN se empleó el kit comercial PrimeScript RT reagent de Takara-Clontech (Francia).

La transcripción inversa se realizó a partir de 1 µg de ARN total obtenido de plántulas de arabidopsis. A la muestra de ARN se le añadieron buffer 5X PrimeScript, Oligo dT Primer (50 µM) y el mix que contenía la enzima (PrimeScript RT Enzyme Mix I). La mezcla se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 20 µL y se incubó durante 15 min a 37ºC para que se produjera la transcripción inversa. A continuación, se llevó a 85ºC durante 5 seg para inactivar la reacción y finalmente se dejó en hielo. El ADNc resultante se almacenó a -20°C hasta su utilización posterior como molde en las reacciones de RT-qPCR (Apartado 5.6.2).

4.5.- Electroforesis

4.5.1.- ADN

Los fragmentos de ADN se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 1% (relación peso/volumen).

En primer lugar, se añadió la cantidad adecuada de agarosa al volumen necesario de buffer TAE 1X (Tris/acetato 40mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) y se fundió la mezcla hasta ebullición en un microondas. Tras ello, se dejó enfriar hasta unos 50-60ºC y se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final aproximada de 1 µg/mL. Posteriormente se vertió el gel en el molde y se dejó solidificar. Una vez solidificado, se introdujo en la bandeja de electroforesis llenándola de TAE 1X hasta cubrir el gel. En cada uno de los pocillos formados por el peine en el gel se introdujeron 10 µL de la muestra preparada de la siguiente forma: 1 µL del frente de carga 6X, 1 µL de ADN problema y 8 µL de agua MQ. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje aproximado de unos 90 V, incluyendo marcadores de ADN de pesos moleculares conocidos. Cuando podía observarse que las bandas de color en el gel se habían separado lo suficiente se procedió a visualizarlas con luz UV (BioDoc-It Imagin System, Analytik Jena, Alemania), y se fotografió el gel.

4.5.2.- ARN

Para la electroforesis de muestras de ARN, los buffers se prepararon en agua tratada con DEPC. El resto del material necesario (cubetas, peines, bandejas) se mantuvo en NaOH 0,2M durante, al menos, 30 min, y posteriormente se lavó con agua destilada tratada con DEPC.

El proceso seguido es el mismo que en el apartado anterior, salvo que el agua de las muestras que se introducen en los pocillos lleva DEPC en lugar de agua MQ.

Se consideró que el ARN extraído era de calidad cuando pudieron apreciarse, clara y nítidamente, las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S.

4.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

4.6.1.- Técnica de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para amplificar clones o fragmentos de ADN comprendidos entre dos regiones de secuencia conocida. Para ello se precisan dos oligonucleótidos de diferente secuencia y complementarios al extremo 3’ de cada una de las hebras del ADN molde.

La mezcla de amplificación, para un volumen final de 50 µl, contenía ADN molde (<1 µg), 100 pmol de cada uno de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse*), dNTPs 200

µM, buffer de la polimerasa 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM) y Taq polimerasa (2,5-5 U).

En la reacción, el ADN a amplificar se desnaturalizó previamente por calor en presencia de un exceso molar de los oligonucleótidos y de los cuatro dNTPs, y después la mezcla se enfrió hasta una temperatura adecuada para el anillamiento de la secuencia. La temperatura de anillamiento se calculó con el programa Oligo 4.05, dependiendo de la longitud y composición de los oligonucleótidos utilizados, siguiendo la fórmula: 2(A+T) + 4(G+C). Una vez producido el anillamiento, los oligonucleótidos fueron extendidos con la polimerasa, que sintetiza el nuevo ADN en dirección 5'- 3', utilizando un termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR Systems 2700. El tiempo de extensión aproximado fue de 30 seg por kb. Las condiciones de temperaturas y tiempos empleados en las distintas reacciones de PCR fueron diferentes dependiendo de cada caso, y se detallan en los apartados correspondientes.

4.6.2.- PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La PCR a tiempo real de las muestras de DNA se llevó a cabo utilizando Kapa Sybr Fast qPCR Kit Master Mix (2x) ABI Prism (Kapa Biosystems, Darmstadt, Alemania) y el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems). El principio de esta técnica consiste en la detección de la molécula Sybr Green I, que emite fluorescencia al unirse a las moléculas de DNA de doble cadena durante la amplificación. La posterior medida de la intensidad de la fluorescencia emitida nos permite determinar la cantidad de producto de PCR amplificado para esa muestra.

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µL, con la concentración final que se indica:

- Kapa Sybr Fast qPCR Kit Master Mix (2x) ABI Prism (1x)
- Oligo *forward* (200 nM).
- Oligo *reverse* (200 nM).
- 20 ng de DNA molde de la reacción.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de activación enzimática a 95ºC durante 3 min, seguido de 40 ciclos que incluían: 3 seg a 95ºC (desnaturalización) y 20 seg a la temperatura establecida empíricamente para cada pareja de oligonucleótidos (anillamiento). Se realizó una medida continua de la fluorescencia

emitida en un rango de 60-95ºC aumentando la temperatura 0,2ºC por seg. Finalmente, las muestras se mantuvieron a 4ºC.

El análisis de los datos obtenidos se realizó siguiendo el método de comparación de Ct (Bustin, 2000; Pfaffl, 2001) que permite llevar a cabo una cuantificación relativa del nivel de expresión del gen de interés respecto de un gen control endógeno cuya expresión es constitutiva. En este trabajo se utilizó el gen de la actina de los diferentes organismos utilizados, como gen control endógeno. Es necesaria una eficiencia de amplificación del gen de interés y del gen endógeno estadísticamente similares para poder aplicar de un modo fiable este método de cuantificación (Pfaffl, 2001).

El ciclo umbral (Ct, *threshold cycle*) de la reacción se define como el primer ciclo de amplificación en el que la señal de fluorescencia detectada es mayor que el límite de detección mínimo, establecido por un umbral que está asociado con el inicio del crecimiento exponencial de la curva de amplificación del producto de PCR. De esta forma, una muestra que presente mayor contenido de ADN llegará antes a la fase exponencial y tendrá un Ct más bajo que otra muestra con menor cantidad de ADN.

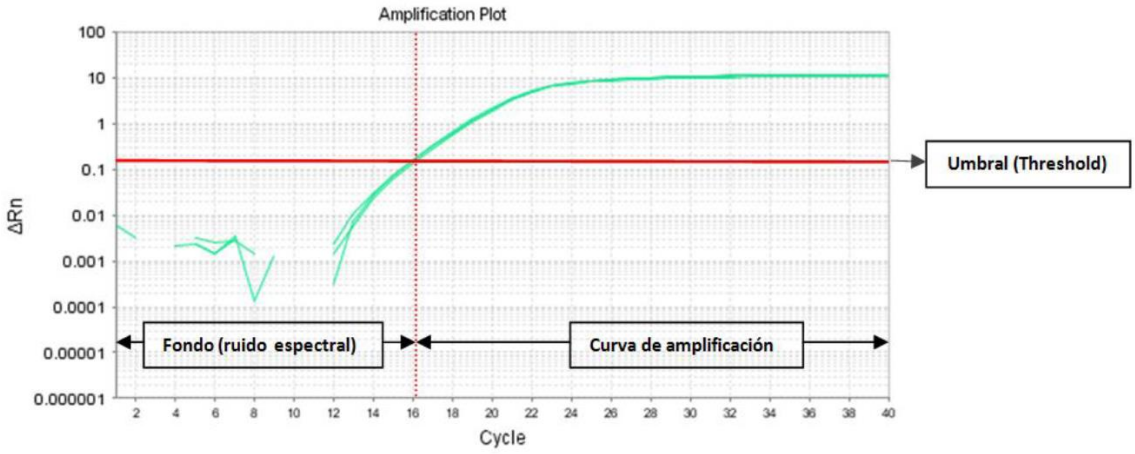


Figura 0.8: Curva de amplificación en PCR cuantitativa. El Ct se indica con una línea punteada vertical de color rojo. El umbral se indica con una línea continua horizontal de color rojo.

El método de comparación de Ct incluye los valores de Ct de interés en la siguiente fórmula matemática para así conocer la cantidad relativa de transcrito o RQ (*Relative Quantify of transcript*):

$$\mathbf{RQ} = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ siendo } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra referencia}}$$

Donde ΔCt en cada caso es la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen control endógeno.

La muestra referencia es aquella sobre la que se calibran todas las muestras problemas y a la que se asigna de forma arbitraria un valor RQ = 1.

Todos los análisis de PCR cuantitativa realizados en este trabajo se llevaron a cabo con muestras de al menos tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de síntesis de ADNc, realizando las reacciones por triplicado para su análisis en el termociclador, de modo que al menos hubo 18 reacciones de PCR para cada muestra analizada, siguiendo las indicaciones de de Vega-Bartol et al. (2013).

Para los cálculos de Ct, eficiencia de amplificación y análisis estadísticos se utilizó el programa informático complementario del termociclador (StepOne Software V2.3, Applied Biosystems) y el programa Statistix 8.0.

4.6.3.- Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma LifeScience, y se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3: Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia
35S-GTW F	CTTCGCAAGACCCTTCCTCT
Thkel1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCATGGCCGCTTCCATCATCT
Thkel1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACAAAAAGTCCAACCTCC
ActAraF	CTCCCGCTATGTATGTCGCC
ActAraR	TTGGCACAGTGTGAGACACAC
Ara-Ics1-F	GATCTAGCTAACGAGAACGG
Ara-Ics1-R	CATTAAACTCAACCTGAGGGAC
Ara-PR1-F	GGCTAACTACAACTACGCTG
Ara-PR1-R	GGCTCTGGTTCACATAATTC
Ara-Lox1-F	GTAAGCTCTGATGTTACTGATTC
Ara-Lox1-R	CTGCGGTTAACGACGTGATTG
Ara-VSP2-F	GTTAGGGACCGGAGCATCAA
Ara-VSP2-R	TCAATCCCGAGCTCTATGATGTT
ActColzF	CCCTGGAATTGCTGACCGTA

ActColzR	TGGAAAGTGCTGAGGGATGC
ThKelQF	ACGGCACAAGCTCCACTTG
ThKelQR	TGCGGGACGAGGGATAGAC
GlomusF	CTTTCGATGGTAGGATAGAGG
GlomusR	ACAACTTTAATATACGCTATTGGA
Act-Tri-F	ATGGTATGGGTCAGAAGGA
Act-Tri-R	ATGTCAACACGAGCAATGG
Act-Tom-F	CACCACTGCTGAACGGGAA
Act-Tom-R	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT
Tom-Ics1-F	GTTCCTCTCCAAGAATGTCC
Tom-Ics1-R	TCCTTCAAGCTCATCAAACT
Tom-PR1-F	CCTCAAGATTATCTTAACGCTC
Tom-PR1-R	TACCATTGCTTCTCATCAACC
Tom-Lox1-F	GCCTCTCTTCTTGATGGAG
Tom-Lox1-R	GTAGTGAGCCACTTCTCCAA
Tom-Ein2-F	GTTGCTAAGTGATGCTGTA
Tom-Ein2-R	CGCTCAAGCATGCTGGGCC
attB1 F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGC
attB2 R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
Seq-Gate.L1.F	TCGCGTTAACGCTAGCATGCATGGATCTC
Seq-Gate.L2.R	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

4.6.4.- Diseño de oligonucleótidos

El diseño de oligonucleótidos se llevó a cabo con el programa *PearlPrimer*. La búsqueda de marcos de lectura abierta (ORF) sobre las secuencias de ADN se realizó mediante el programa *EditSeq*, que forma parte del paquete informático *Lasergene* (DNASTAR, Madison, EE.UU.).

4.6.5.- Cuantificación relativa de biomasa fúngica

La cuantificación de biomasa fúngica (tanto de *Trichoderma*, como de los hongos micorrícicos) durante la colonización de plantas de arabidopsis, tomate y colza se llevó a cabo mediante una estimación de la cantidad relativa de ADN del hongo respecto al ADN de la planta utilizando reacciones de PCR cuantitativa.

Para la detección y cuantificación del ADN fúngico se utilizaron las parejas de oligonucleótidos que amplifican regiones específicas del gen de la actina de *Trichoderma* y del ARNr 18S de los hongos micorrícicos (Lee et al., 2008) (descritos en la Tabla 3),

ambos genes tienen copia única en el genoma de los hongos. En el caso de las plantas se utilizaron cebadores para amplificar una región del gen de la actina (descritos en la Tabla 3), también de copia única, que fue utilizado como gen control endógeno.

El número de muestras en cada ensayo se describe en el pie de figura de cada resultado en el apartado de Resultados de cada capítulo, los componentes de la reacción y el perfil térmico utilizados en esta cuantificación son las descritas anteriormente en este mismo apartado de Materiales y Métodos, utilizando en este caso como molde ADN genómico procedente de plantas inoculadas y no ADNc. Se añadieron a la reacción 100 ng de ADN genómico.

La cantidad de producto amplificado se determinó como ya se detalló anteriormente, en el apartado 4.6.2.

4.7.- Cálculo del número de copias de un gen por PCR

Para determinar el número de copias del transgén integrado dentro del genoma de *B. napus* se utilizó la metodología recopilada por Hoebeeck et al. (2007).

Esta metodología se basa en primer lugar en relativizar las copias del transgén frente a un gen endógeno, el de la actina, con unos calibradores de número de copias conocidas del transgén, en nuestro caso, las tres líneas de arabidopsis transformadas con el gen *Thkel1*: Kel1 (1 copia), Kel2 (2 copias) y Kel3 (3 copias).

El gen endógeno de referencia utilizado en las muestras de colza fue también el de la actina. El siguiente paso fue calcular la cantidad relativa de gen (Q):

$$Q = 2^{(Ct_{calibrador} - Ct_{muestra})}$$

Donde se deben coger los Ct correspondientes a cada gen que se esté calculando, tanto endógenos como de interés.

Posteriormente se debe utilizar el denominado factor de normalización (NF), que sería la Q correspondiente al gen endógeno, en nuestro caso, la comparación del gen de la actina de arabidopsis y colza, multiplicándolo por las Q obtenidas para el gen *Thkel1* en cada una de las muestras problema, obteniendo de esta forma el número de copias relativizado al del calibrador.

Se siguió la misma metodología con los tres calibradores diferentes, dando por correctos únicamente los resultados que diesen igual número de copias en las muestras problema de forma relativa respecto al número de copias de cada uno de los calibradores.

4.8.- Secuenciación de fragmentos de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN de interés se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca que dispone de un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El procedimiento seguido para la secuenciación es el descrito por Sanger et al. (1977), en el que se utilizan fluorocromos que son discriminados por un lector óptico.

Los fragmentos de ADN y los plásmidos a secuenciar fueron aislados y purificados con los kits de purificación NucleoSpin Gel and PCR Clean-up y NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Hoerdt, Francia), respectivamente, siguiendo las indicaciones del fabricante.

La concentración de las muestras se estimó mediante un espectofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Para la secuenciación de amplicones de PCR se utilizaron 100 ng de ADN para fragmentos de 1 kb. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 8 µL que incluyó el cebador correspondiente a una concentración final de 3,2 pM.

5.- MICROSCOPÍA CONFOCAL DE BARRIDO

Las raíces de las plántulas de arabidopsis que estuvieron en contacto con *T. harzianum* durante 3 días en las cajas Phytatray II (cultivo hidropónico) se visualizaron en un microscopio confocal Leica SP5. Para ello, se cortaron las raíces, se lavaron bien con agua destilada estéril para eliminar todo el hongo externo y se montaron en porta-objetos. Las muestras se guardaron a -20ºC hasta su uso. La longitud de onda de excitación utilizada fue de 488 nm (láser argón/criptón) y las longitudes de onda de emisión fueron de 500-550 nm. Las imágenes se visualizaron con un objetivo de 40x y se procesaron con el software *LSM Image Browser* de Leica.

6.- LOCALIZACIÓN DE CALOSA EN CORTES HISTOLÓGICOS

Para la localización de los depósitos de calosa, se realizaron cortes histológicos de raíces de plántulas de arabidopsis, previamente fijado e incluido en parafina (Paraplast Embedding Media; Sigma, USA).

6.1.- Fijación

Se cortaron piezas de aproximadamente 3 mm de longitud de la raíz principal de las plantas de *A. thaliana* que habían permanecido en contacto con *T. harzianum* en cultivo hidropónico durante tres días. El proceso de fijación se realizó incubando las piezas durante 30 min a temperatura ambiente en la solución de fijación FAA (formalin-aceto-alcohol: 90 mL de etanol 50%, 5 mL de ácido acético y 5 mL de formaldehído al 37% v/v) y con aplicación de vacío, para facilitar la penetración del fijador en el tejido. Se renovó el fijador y se mantuvieron 24 h a 4ºC.

6.2.- Deshidratación

Después de dos lavados de 1 h con etanol 50% en agua destilada estéril. Las muestras se deshidrataron mediante sucesivos lavados de 1 h con etanol 70%, 80% y 90% en agua destilada estéril, seguidos de tres lavados de 1 h con etanol 100%. Posteriormente, se realizaron lavados de 1 h con xilol 15%, 25%, 50% y 75% en etanol y se finalizó con otros tres lavados de 1 h en xilol 100%. Las muestras se mantuvieron en parafina toda la noche a 60ºC. Al día siguiente se hicieron dos cambios de parafina, a intervalos de 3-4 h, manteniendo las muestras a 60ºC. Cada pieza fue incluida en un bloque de parafina, que una vez solidificado se almacenó a 4°C hasta su utilización.

6.3.- Cortes histológicos

Se hicieron cortes histológicos de 12 μm utilizando un microtomo HM 310 (Microm, Alemania), recogiendo las secciones en un portaobjetos con poli-L-lisina al 0,04%.

6.4.- Desparafinación

Los cortes histológicos mantenidos a 37°C durante al menos 12 h, se desparafinaron realizando tres lavados de 10 min con xilol 100%, seguidos de dos lavados de 10 min en una mezcla de xilol:etanol 1:1. Posteriormente se rehidrataron en una serie decreciente de etanol: tres lavados de 10 min en etanol 100% seguidos de un lavado de 5 min con cada una de las soluciones de etanol 90%, 80%, 70%, 60%, 50% y 30% en agua destilada. Una vez desparafinados, los cortes se mantuvieron durante 15 min en buffer TBS (Tris base 0,1 M a pH 7,5 conteniendo NaCl 0,1 M).

6.5.- Tinción

La tinción de los cortes histológicos se realizó cubriendo los portas con unas gotas de una solución de azul de anilina (Sigma) al 0,005% en agua durante 2 min. A

continuación, se retiró el exceso de colorante, y se procedió a una deshidratación de los tejidos mediante dos lavados con etanol 70% y 90% durante 3 min, un lavado en etanol absoluto durante 4 min y un lavado en xilol 100% durante 5 min. Finalmente, los cortes se montaron utilizando la solución de montaje Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania), dejándose secar un par de horas antes de su visualización.

6.6.- Observación

Para la observación y fotografía de los cortes se utilizó un microscopio DMLS2 (Leica, Wetzlar, Alemania), equipado con una cámara Canon Power Shot S50.

7.- OBTENCIÓN DE ENDÓFITOS SISTÉMICOS

Con el fin de determinar la presencia a nivel foliar de *T. harzianum* en las plantas de *A. thaliana* en cultivo hidropónico, se recogieron diferentes hojas tres días después la inoculación fúngica y para ello se desinfectaron superficialmente con etanol al 60%, Tritón X-100 al 1% e hipoclorito sódico al 1%, durante 10 min en agitación. Posteriormente, las hojas se depositaron en en placas de PDA que se incubaron a 24ºC.

8.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

8.1.- Clonación por la tecnología Gateway

Esta tecnología permite introducir un inserto de interés en un vector sin tener que cortar con enzimas de restricción y ligar.

En primer lugar, se realizó el diseño de los oligonucleótidos para amplificar el fragmento a clonar introduciendo los sitios de recombinación attB1 en el extremo 5’ y attB2 en el extremo 3’ (Tabla 3). Una vez realizada la PCR, se introdujo por recombinación el fragmento obtenido en el plásmido pDONOR201 por la Gateway BP Clonase II Enzime mix (Invotrogen), que introduce segmentos de ADN con sitios attB en un vector donante con sitios attP, incubando la mezcla toda la noche a 25ºC, pasando a denominarse el plásmido pENTR201. La reacción se paró añadiendo proteinasa K (digiere la keratina) durante 10 min a 37ºC.

Posteriormente, se hizo la transformación de las células competentes DH5α con la mezcla de recombinación, por electroporación. Para ello, se colocó una alícuota de las células DH5α junto con la mezcla en una cubeta (de 0,1 cm de ancho), y se puso en el electroporador (1,8 kV, 1 kW y 25 μF). Tras ello, las bacterias recuperadas de la cubeta

se pasaron a medio LB, donde se incubaron a 37ºC en agitación a 250 rpm durante 1 h, para que se regenerasen. Pasado ese tiempo, se sembraron en placas con medio LB suplementado con el antibiótico (Kan), manteniendo las placas a 37ºC toda la noche. De las colonias que crecieron, se seleccionaron algunas de ellas, con las que se inocularon medios líquidos de LB suplementados con el mismo antibiótico, y se mantuvieron 24h en agitación (250 rpm) y a 37ºC para la obtención del plásmido.

La extracción del plásmido se realizó con el kit NucleoSpin Plasmid, siguiendo las instrucciones del suministrador. Este método está basado en la utilización de columnas diseñadas para la extracción de los plásmidos y centrifugación de las mismas. Posteriormente, se determinó la concentración de los plásmidos purificados en el Nanodrop y se visualizaron en un gel de agarosa.

Los plásmidos obtenidos se enviaron a secuenciar, utilizando los oligos Seq-Gate.L1.F y Seq-Gate.L2.R (Tabla 3), diseñados para los sitios de recombinación attL1 y attL2 que se generan en el vector pENTR201 y que flanquean la secuencia de ADN introducida.

Una vez se tuvo el pENTR201 con la secuencia correcta, se procedió a introducirlo en un plásmido DESTINITY (con el borde derecho e izquierdo de *A. tumefaciens*). El plásmido utilizado en este proceso fue el pKGWFS7. La recombinación de los plásmidos pENTRY y los pDEST se realizó con la clonasa LR (introduce un gen de interés flanqueado por sitios attL de un vector ENTRY en un vector de destino con sitios attR), incubando la mezcla toda la noche a 25ºC. La reacción se paró añadiendo proteinasa K durante 10 min a 37ºC.

Posteriormente, se transformaron células competentes DH5α con la mezcla de recombinación por electroporación (1,8 kV), sembrando esta vez las bacterias obtenidas en medio LB suplementado con Spec, ya que es la resistencia que presenta el plásmido de destino. Tras seleccionar las colonias transformadas se realizaron tres PCRs distintas para confirmar la presencia del fragmento clonado, y que éste se encuentre en la dirección correcta y en el vector adecuado, para ello se utilizaron los oligos attB1 y attB2, Seq-Gate.L1 y Seq-Gate.L2, un oligo del fragmento clonado y otro del vector de destino. Los productos de PCR obtenidos se comprobaron en un gel de agarosa, observándose banda solamente en la primera y tercera PCRs.

Por último, se realizó la purificación de los plásmidos con el kit NucleoSpin Plasmid, cuantificando el producto al Nanodrop y comprobándolo por electroforesis en gel de agarosa.

8.2.- Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación

Las células competentes de *A. tumefaciens* se transformaron con la construcción pKGWFS7-*Thkel1* por electroporación (Dower et al., 1988). Para ello, se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm de ancho, las condiciones fueron de 2 kV, 1 kW y 25 µF. A una suspensión de 0,4 mL células competentes se le añadieron entre 0,1-0,5 µg del plásmido recombinante. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió a las células 1 mL de medio SOC (bactotriptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, pH 7,0, MgCl2 10mM y glucosa 20 mM) y se incubaron a 28ºC durante 2-3 h. Los transformantes se seleccionaron en placas con medio LB sólido suplementado con Spec (50µg/mL).

8.3.- Extracción de plásmidos de *A. tumefaciens*

Para confirmar que las células transformadas contenían la construcción adecuada, se realizó una extracción de plásmidos a partir de un cultivo saturado de las cepas transformadas en medio LB con espectinomicina. Las células presentes en 1 mL del cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µL de buffer de lisis (glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, lisozima 4 mg/mL). La suspensión se agitó vigorosamente durante 10 min y se incubó a temperatura ambiente durante otros 30 min, al cabo de los cuales se añadieron 150 µL de acetato sódico 3M (pH 4.8), se mezcló y se incubó en hielo durante 5 min. Tras centrifugar a 1.200 rpm durante 5 min, al sobrenadante se le añadió un volumen igual de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló mediante agitación, después de una última centrifugación, el precipitado se resuspendió en 50 µL de agua.

8.4.- Transformación de *B. napus* por inmersión floral de *A. tumefaciens*

La transformación de *B. napus* mediada por *A. tumefaciens* se realizó por el método de infiltración *in planta* (Clough & Bent, 1998). Este procedimiento ofrece varias ventajas frente a los métodos que requieren un proceso de cultivo *in vitro*. La transformación de plantas enteras no requiere regeneración, lo que evita la variación somaclonal, además, se reduce el tiempo requerido para obtener individuos transformados.

Se utilizó un cultivo en fase estacionaria, de *A. tumefaciens* para inocular 200 mL de medio LB (3:200). Este cultivo se incubó a 28ºC durante 24 h, las células se recogieron por centrifugación (3.000 rpm, 15 min a 4ºC) y se resuspendieron en 400 mL de solución de infiltración (sacarosa 5%, detergente Siwet L-77 0,03% (v/v), medio MS 0,5x, BAP (benzilaminopurina) 0,044 µM y acetosiringona (16 mg/L).

Las plantas de *B. napus* que iban a ser infiltradas, se crecieron en macetas en condiciones ya descritas (Apartado 2.2), hasta que desarrollaron los primordios florales. Para la inoculación de las plantas con *A. tumefaciens*, se colocaron 400 mL de la suspensión bacteriana en un vaso de precipitado, donde se fueron introduciendo uno a uno los racimos de los primordios florales de las ramas de cada planta durante 2 min, cubriéndolos posteriormente con una bolsa de plástico con el fin de mantener la humedad durante 2-3 días.

Cuando la bacteria se pone en contacto con los primordios florales de *B. napus*, ésta infecta al tejido. En este período de contacto, la bacteria transfiere al tejido el ADN-T del plásmido Ti, que se integra en el material genético de la planta, transcribiéndose más tarde como si fuera un gen propio.

Cuando las silicuas estuvieron secas se recogieron las semillas. El siguiente paso consistió en seleccionar las semillas transgénicas y llevarlas a homocigosis.

8.4.1.- Selección de semillas transgénicas

Tras esterilizar la superficie de las semillas (apartado 2.1), se eliminó la dormición por estratificación durante 72 h a 4ºC, y se colocaron en placas con medio MS suplementado con Kan (50 µg/mL). Estas placas se incubaron a 22ºC, con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, y una humedad del 50% hasta que las plántulas tuvieron los cotiledones completamente abiertos (7 días). En este momento ya se pueden diferenciar plántulas transformadas de las que no, porque estas últimas presentaban un color predominante morado por la acumulación de antocianinas (Figura 0.9A). Las plántulas aparentemente transformadas se transplantaron a tierra, donde al cabo de unos días, se descartaron las no resistentes a Kan, obviadas en el paso anterior, ya que sus hojas primarias emergían blancas o moradas (Figura 0.9B).

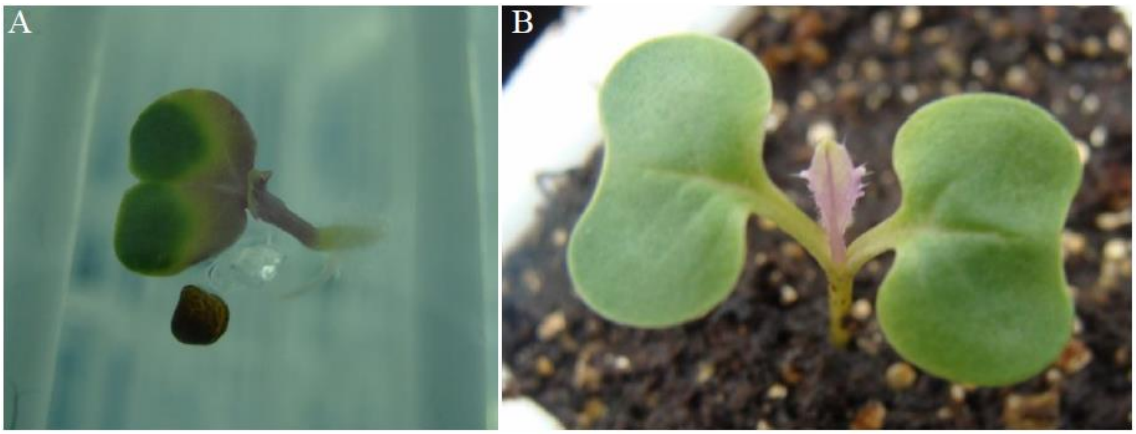


Figura 0.9: Plántulas de *B. napus* de 7 días (A) y traspasada a tierra (B), sensibles a kanamicina.

8.4.2.- Caracterización molecular de las plantas transgénicas

Las plantas correspondientes a las líneas T1 se utilizaron para comprobar por medio de PCR la presencia del gen *Thkel1* en el genoma de esas líneas. Para ello, se utilizó DNA genómico junto con oligonucleótidos específicos de la contrucción con el transgén (35S-GTW-F y Thkel1-R). Posteriormente, se prosiguió con las plantas confirmadas hasta la homocigosis.

8.5.- Transformación de raíces de *B. napus* por *A. rhizogenes*

Se utilizó la cepa de *A. rhizogenes* denominada Arqua-1. Tanto para la transfomación mediante electroporación como para la extracción de los plásmidos, se utilizaron las mismas técnicas de los apartados 8.2 y 8.3, respectivamente; destacando que, en este caso, la bacteria es resistente al antibiótico Strep y que se crece en placa de LB a una concentración de este antibiótico de 100 mg/L, con el fin de evitar contaminaciones.

Como material de partida se utilizaron semillas esterilizadas de colza germinadas en placas Petri invertidas de MS. Cuando las raíces emergentes de las semillas tuvieron un tamaño aproximado de 1 cm se cortó la punta de las mismas, y se llevaron a una placa sobre la que se había extendido un ‘césped’ de *A. rhizogenes* transformada previamente con el gen de interés. Una vez infectadas, las plántulas se depositaron en placas cuadradas verticales con MS en una cámara de luz a las condiciones normales de crecimiento.

Al cabo de dos semanas, tras la infección con *A. rhizogenes*, tiempo suficiente para que comenzara el desarrollo de las raíces transformadas, se pasaron las plántulas a nuevas placas con medio MS suplementadas con Kan, sólo sobrevivieron las transformadas, ya

que fueron las únicas portadoras de la resistencia. Pasada una semana, las plántulas supervivientes se traspasaron a tierra, mediante un proceso de aclimatación del contenido en humedad ambiental, donde también pudieron desecharse varias plantas que manifestaron los síntomas de la no resistencia al antibiótico.

9.- ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Una vez se obtuvieron plantas transgénicas de colza con el gen *Thkel1* se realizaron diferentes estudios de germinación *in vitro* de las semillas.

Tras su esterilización superficial y una estratificación de 3 días, las semillas de colza se colocaron en placas Petri con diferente composición, en función del ensayo. Las condiciones a las que se sometió a las semillas fueron medio nutritivo MS y el mismo suplementado con NaCl 250 mM, con el fin de causar un estrés salino.

Las placas se mantuvieron en el fitotrón tapadas con papel de aluminio, intentando imitar las condiciones de enterramiento del suelo, donde no hay luz, durante 5 días, tras los cuales se midieron diferentes variables. En primer lugar, se calculó el porcentaje de germinación relativo (PGR), basado en la división del porcentaje de semillas que habían germinado en la línea transgénica frente al control (línea comercial transformada), multiplicado por 100. Posteriormente se midió la longitud de las radículas surgidas y se calculó la elongación de radícula relativa (ERR), dividiendo el dato de la línea transgénica frente al control, multiplicándolo por 100. Por último, se realizó el cálculo de índice de germinación (IG), basado en multiplicar el PGR por la ERR y dividirlo entre 100.

10.- PRODUCTIVIDAD VEGETAL

10.1.- Productividad en arabidopsis

La capacidad productiva de *A. thaliana* se midió mediante la cuantificación del número de silícuas totales producidas por planta.

10.2.- Productividad en colza

10.2.1.- Semillas

La capacidad productiva de *B. napus* a nivel de semillas oleaginosas se realizó mediante la recogida y cuantificación del número total de silícuas producidas por planta. Posteriormente, se abrió cada una de las silícuas recogidas de forma individual y se tomaron datos del número de semillas formadas en cada silicua. Los datos de peso por

semilla fueron tomados mediante el pesaje de grupos de 10 semillas en balanza de precisión. Por último, se realizó el cálculo del peso de semillas producido por cada planta, multiplicando todos los datos obtenidos con anterioridad.

10.2.2.- Biomasa aérea

Con el fin de determinar si realmente la micorrización de la línea transgénica de colza le estaba proporcionando a la planta algún tipo de beneficio nutricional y, por lo tanto, de desarrollo de biomasa vegetal, planteamos un ensayo basado en la metodología utilizada por Xin et al., (2017) de mallas de nylon con orificios de 35 µm, los cuales permiten el paso del hongo micorrícico, pero no de las raíces.

Figura 0.10: Proceso seguido en el ensayo de efectividad nutricional de la micorrización de colza. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: crecimiento de las plántulas; momento en el cual las plantas dejaron de suplementarse con MS y se añadieron las diferentes condiciones; ocupamiento radicular del hueco dejado para las diferentes condiciones; momento de adición de las condiciones (en este caso, turba con hongos micorrícicos), manteniendo la separación con la malla de nylon; primera semana sin suplementación con MS, en este caso, con la condición de la adición de tomate y turba.

En primer lugar, crecimos plántulas de colza en macetas llenas de vermiculita, dejando un hueco de 300 mL de volumen, lugar donde se situarán con posterioridad las diferentes condiciones. Durante un mes, las plantas se suplementaron cada tres días con una solución de MS al 1% en peso (1 g/L), ya que la vermiculita es un medio inerte que

no aporta nutrientes a la planta. Al cabo de ese mes, las raíces de las plantas habían ocupado por completo el hueco que se había dejado, por lo tanto, procedimos a añadir cada una de las condiciones, que se habían preparado en recipientes con el mismo volumen del hueco, siempre forrados internamente con la malla de nylon. Las condiciones que se utilizaron fueron: vermiculita, vermiculita más hongos micorrícicos, turba, turba más hongos micorrícicos, tomate en turba, y tomate en turba más hongos micorrícicos. Estas condiciones se mantuvieron durante dos semanas, ya que la falta total de aporte nutritivo en las plantas a las que únicamente se les añadió vemiculita empezaba a ser letal en los controles, tras las cuales se recogió y midió el peso fresco de biomasa formada (tanto de las colzas como de los tomates) y el peso seco tras un secado de 3 días a 65ºC en estufa (Figura 0.10). El material vegetal obtenido en este apartado se utilizó para la medición nutricional del apartado 15.

10.2.3.- Biomasa radicular

Para cuantificar la biomasa radicular producida por las diferentes plantas de colza en diferentes condiciones se recogieron las plantas en el momento de la formación de los primordios florales, lavando vigorosamente las raíces, con el fin de eliminar al máximo cualquier residuo de sustrato. Posteriormente, las raíces se secaron en estufa a 65ºC durante 3 días y se pesó individualmente cada una de ellas.

11.- ENSAYOS DE ESTRESES ABIÓTICOS

11.1.- Salino

Las plantas de *A. thaliana* ecotipo silvestre Col-0 y la línea transgénica Kel-2 con y sin micorrizas, se regaron individualmente con 5 mL de NaCl 200 mM, cada dos días, una vez desarrollaron las primeras hojas verdaderas. Según aumentaba el tamaño de éstas se aumentó el volumen de riego a 10, 15 y 20 mL, sucesivamente hasta el final de su ciclo de desarrollo.

En el caso de las plantas de colza, el riego con NaCl 200 mM comenzó en el momento en el que la planta desarrolló la tercera hoja verdadera con 15 mL cada dos días. Según aumentaba el tamaño de las plantas se aumentó el volumen de riego a 30, 50 y 100 mL, sucesivamente hasta el final de su ciclo de desarrollo.

11.2.- Sequía

El estrés por sequía se provocó en las plantas de colza mediante una reducción progresiva del riego, tanto en cantidad como en tiempos entre las irrigaciones, desde que la planta comenzó el desarrollo de la tercera hoja verdadera hasta que empezó en crecimiento de su tallo floral, momento en el que el riego ya fue nulo.

12.- OBSERVACIÓN DE LA MICORRIZACIÓN

Para la tinción de las raíces de *A. thaliana* y colza con el fin de observar la presencia de micorrizas se utilizaron dos técnicas distintas.

12.1.- Tinción de raíces de *A. thaliana* con azul de tripán

Las raíces de *A. thaliana* se sumergieron en una solución de KOH al 10% durante 20-60 min a 90ºC con el fin de aumentar la permeabilidad de sus paredes celulares. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el KOH, y se sumergieron en una nueva solución de HCl al 2% (v/v) durante 15 min. Una vez eliminado el HCl sin necesidad de lavar con agua destilada, las raíces se mantuvieron en una solución de azul de tripán al 0,05% en lactoglicerol durante 20-60 min a 90ºC. Por último, se desechó el exceso de tinte y se aclararon las raíces con agua destilada, donde se mantuvieron hasta su observación a la lupa (Vierheilig et al., 2005).

12.2.- Tinción de raíces de colza con 'tinta china'

Las raíces de *B. napus* se sumergieron en una solución de KOH al 10% durante 10 min a 70-80ºC con el fin de aumentar la permeabilidad de sus paredes celulares. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar el KOH y uno más con una nueva solución de ácido acético al 2% (v/v). A continuación, las raíces se pasaron a una solución con la 'tinta china' SheafferSkrip (5% de tinta en ácido acético al 2%) durante 10 min a 90ºC. Por último, se desechó el exceso de tinta y se aclararon las raíces con agua destilada, donde se mantuvieron hasta su observación a la lupa (Vierheilig et al., 2005).

En ambas tinciones las observaciones y fotografías de las raíces micorrizadas se realizaron en un microscopio estereoscópico Leica M205 FA equipado con cámara fotográfica Leica DFC 495.

13.- ESTUDIOS *in silico*

Para los estudios *in silico* con el gen *Thkel1* utilizamos los siguientes softwares (Tabla 4):

Tabla 4: Softwares utilizado en los estudios *in silico*.

Nombre	Uso	Dirección web
BLASTX	Obtención de la secuencia de aminoácidos que conforma una proteína partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen que la codificaría	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
BLASTP	Obtención de proteínas homólogas	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
TAIR	Base de datos genéticos y moleculares de *A. thaliana*	https://www.arabidopsis.org/
PAIR	Obtención del interactoma (todas las proteínas con las que podría unirse) de arabidopsis, partiendo de la nomenclatura de una proteína según el TAIR	http://www.cls.zju.edu.cn/pair/

14.- ACTIVIDAD MIROSINASA

La metodología llevada a cabo para el análisis de la actividad mirosinasa fue el descrito previamente por Charron & Sams (2004), basado en la medida de la disminución de la D.O. a 227 nm en un espectrofotómetro, como consecuencia de la hidrólisis enzimática del sustrato de la reacción, la sinigrina.

Como material de partida se utilizaron 300 mg de material vegetal congelado en nitrógeno líquido, homogeneizado y pulverizado lo máximo posible. A este material se le añadió 1 mL de buffer citrato-fosfato 30 mM a pH 7, que contenía EDTA 1 mM, y se centrifugó a 16.400 rpm durante 4 min a 4ºC, recuperando el sobrenadante.

La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 1,5 mL añadiendo 1,35 mL del anterior buffer citrato-fosfato, 50 µL de extracto y 100 µL de sinigrina 37,5 mM, mezclando bien todos los componentes con un vórtex durante 5 seg. La reacción de referencia se basó en la misma mezcla, sustituyendo la sinigrina por agua.

La actividad mirosinasa se calculó como unidades (U) de actividad, basadas en la cantidad de enzima por centímetro cúbico que causa la desaparición de 1 μmol de sinigrina por minuto. Para ello, se utilizó la fórmula descrita por Li & Kushad (2004):

$$Ucm^{-3} = \frac{\Delta A * VA * 10^3}{\Delta t * \varepsilon * VE}$$

Donde ΔA es el incremento de la D.O., VA es el volumen total del ensayo (1,5 cm^3), Δt es el incremento en el tiempo (5 min), ε es el coeficiente de extinción molar de la sinigrina (6784 M^{-1} cm^{-1}), y VE el volumen de la solución de enzima (0,1 cm^3).

15.- ANÁLISIS METABOLÓMICOS

Todos los análisis metabolómicos sobre las muestras radiculares y de semillas de colza se realizaron en colaboración con el grupo de Ecofisiología y Biotecnología de la Universidad Jaume I de Castellón. A nivel radicular se midió la acumulación de compuestos químicos relacionados con la falta de micorrización en colza, mientras que en las semillas se analizó su perfil oleico y otros posibles compuestos de interés.

15.1.- Extracción de las muestras

Para cada réplica de muestra de raíz, se añadieron 500 μL de metanol al 70% suplementado con biochanina A a 1 mg/L (patrón interno, IS) a 5 mg de tejido vegetal liofilizado en polvo. Después de 10 min de ultrasonidos, las muestras se centrifugaron a 9.450 g durante 10 min a 4°C. Antes del análisis de espectrometría de masas UPLC-QTOF-MS (Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry), los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de jeringa de pluritetrafluoruroetileno (PTFE) de 0,2 μm (Whatman International Inc., Maidstone, Reino Unido). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo la metodología del metabolito polar que se describe a continuación.

Las muestras de semillas se pesaron (50 mg) y se trituraron usando un molino de bolas y perlas de vidrio. La pasta oleosa resultante se mezcló con 300 μL de metanol puro (grado cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas o LC/MS) complementado con la isoflavona biochanina A a 1 mg/L. La extracción se llevó a cabo esencialmente como en las muestras de raíz, pero los extractos metanólicos se combinaron con 400 μL de agua MQ y 200 μL de cloroformo. La capa superior de agua se recuperó para los análisis de metabolitos polares, mientras que la capa orgánica inferior se secó al vacío y

posteriormente se reconstituyó en n-butanol puro (grado LC/MS) para análisis de metabolitos no polares.

15.2.- Instrumentación y condiciones

Las separaciones cromatográficas se realizaron en un sistema Acquity SDS (Waters Corp. Ltd., Milford, USA) interconectado a un QTOF Premier de Micromass Ltd (UK) a través de una fuente de ESI. Para todas las separaciones, se usó una columna Luna Omega 1.6u Polar C18 de 100 mm x 2,1 mm i.d., 1,6 µm (USA). Durante la adquisición de datos, la columna se mantuvo a 40ºC y las muestras a 12ºC para frenar la degradación.

15.2.1.- Análisis de metabolitos polares

Las muestras se inyectaron en el sistema UPLC en alícuotas de 10 µL usando la opción de llenado de bucle parcial. El programa de elución en gradiente usado fue 0-2 min, 95% de solvente isocrático A [agua con 0.1% de ácido fórmico (v/v)] y 5% de solvente isocrático B [acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (v/v)]; 2-17 min, gradiente 5-95% de B; 17-20 min, regreso a las condiciones iniciales; 20-25 min, período de reequilibrio. Durante la adquisición de las muestras, la velocidad de flujo fue constante a 300 µL/min.

15.2.2.- Análisis de metabolitos no polares

Las muestras se inyectaron en el sistema UPLC en alícuotas de 5 µL utilizando la opción de llenado parcial de bucle. El programa de elución en gradiente fue 0 min, 100% de A [agua: ácido acetonitrilo, 15:85 (v / v) con ácido fórmico al 0,01% y CH_3COONH_4 0,5 mM] y 0% de B [n-butanol con ácido fórmico al 0,01% y 0,5 mM CH_3COONH_4]; 0-3 min, 0-10% de B; 3-6 min, gradiente 10-55% de B; 6-9 min, gradiente 55-60% de B; 9-11 min, gradiente 60-70% de B; 11-13 retorno a las condiciones iniciales; y reequilibrio. Durante la adquisición, la velocidad de flujo fue constante a 300 µL/min.

15.2.3.- Espectrometría de masas

Las muestras se analizaron en modos de ionización tanto negativos como positivos. Se establecieron dos funciones en el instrumento: en la función 1, se adquirieron datos en el modo de perfil de 50 a 1.000 Da, utilizando un tiempo de exploración de 0,2 seg y una energía de colisión de 2 eV; en la función 2, el rango de exploración fue el mismo, pero se estableció una rampa de colisión entre 4 y 65 eV. Durante todas las mediciones, el voltaje capilar de electrospray se ajustó a 4 kV, y el voltaje del cono se ajustó a 25 V. La

temperatura de la fuente se mantuvo a 120°C, y la temperatura del gas de desolvatación se ajustó a 350°C. Se usó argón como gas de colisión y se usó nitrógeno como nebulizador, así como gas de desolvatación a 60 y 800 L/h, respectivamente. Se proporcionaron mediciones de masa exactas controlando el compuesto de referencia leucina-encefalina usado para la calibración lock mass.

15.2.4.- Procesamiento de datos

Los datos se procesaron utilizando Masslynx v.4.1. Raw. Los archivos de datos se convirtieron al formato netCDF utilizando el puente de datos de la aplicación de Masslynx y se procesaron utilizando el paquete xcms. La detección cromatográfica de picos se realizó utilizando el algoritmo MatchFilter 9, aplicando las siguientes configuraciones de parámetros: snr = 3, fwhm = 15 s, step = 0.01 D, mzdiff = 0.1 D, y profmethod = bin. La corrección del tiempo de retención se logró en tres iteracciones aplicando los parámetros minfrac = 1, bw = 30 s, mzwid = 0.05 D, span = 1, y missing = extra = 1 para la primera iteración; minfrac = 1, bw = 10 s, mzwid = 0.05 D, span = 0.6, y missing = extra = 0 para la segunda iteración; y minfrac = 1, bw = 5 s, mzwid = 0.05 D, span = 0.5, y missing = extra = 0 para la tercera iteración. Después de la agrupación máxima final (minfrac = 1, bw = 5 s) y el llenado de las características faltantes utilizando la rutina fillPeaks del paquete xcms, se obtuvo una matriz de datos que consiste en la característica × muestra.

16.- ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS

Las representaciones gráficas se han realizado con el programa Microsoft Excel XP para hojas de cálculo y realización de gráficas.

A lo largo de toda la memoria, las referencias en el texto se ordenan cronológicamente, siguiéndose un orden alfabético para autores de artículos publicados en el mismo año.

En la escritura se ha procurado seguir las normas gramaticales del Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española [Vigésimo segunda edición (2001), Espasa Calpe, Madrid] y el Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales [Tercera edición (1996), Espasa Calpe, Madrid].

Las abreviaturas empleadas en esta memoria para referirse a unidades de medida se corresponden con las del Sistema Internacional. Se ha procurado aplicar la normativa de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en lo referente a la formulación química y a las denominaciones de los compuestos empleados en este trabajo.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en los ensayos fue realizado mediante el programa informático Statistix 8.0.

CAPÍTULO I

Papel del ácido salicílico en la interacción entre el hongo beneficioso *Trichoderma harzianum* y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

INTRODUCCIÓN

1.- ARABIDOPSIS COMO PLANTA MODELO

A. thaliana es una planta herbácea de pequeño tamaño, perteneciente a la familia Brassicaceae (crucíferas), siendo la principal planta modelo en investigación sobre biología molecular, genética y fisiología vegetal. Su tamaño es de aproximadamente 10-30 cm, con hojas basales formando una roseta alrededor del tallo y pequeñas hojas aisladas a lo largo del mismo. Las inflorescencias se acumulan en racimos al final de los tallos, de las cuales saldrán flores hermafroditas con cuatro pétalos en forma de cruz. Los frutos están conformados por silicuas tabicadas donde se acumulan las semillas ovoideas (0,5 mm de diámetro) en hileras. En la naturaleza puede encontrarse a lo largo de todo el hemisferio norte (Koorneef & Scheres, 2001; Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

1.1.- Ciclo de vida

Aunque es arriesgado generalizar en este sentido, pues todo va a depender del genotipo de la planta y de las condiciones en las que se esté desarrollando, se puede decir que la planta comienza la formación de los primordios florales dos semanas después del inicio de la germinación, la fecundación tiene lugar una semana después, y para la recogida de las semillas deben transcurrir otras 2-3 semanas. La progenie producida por la planta es el resultado, casi exclusivamente, de un proceso de autopolinización (Koornneef & Scheres, 2001; Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

En condiciones de laboratorio, se llegan a obtener hasta 6 generaciones al año, aunque en la naturaleza se dé solo una, floreciendo entre primavera y verano, y siendo necesario un periodo de latencia en las semillas que impide el desarrollo de más generaciones anuales. Su distribución geográfica de forma natural, con respecto a los genotipos, es bastante localizada, pues no existe un proceso activo de dispersión de semillas, y la nueva progenie suele germinar a los pies de su madre (Koornneef & Scheres, 2001; Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

1.2.-Características genéticas

El genoma de arabidopsis es de aproximadamente 130 Mpb, organizadas en cinco cromosomas y con un número total de genes alrededor de 25.000 (Koornneef & Scheres, 2001; Sivasubramanian et al., 2015).

1.3.- Su elección como planta modelo

La primera referencia de arabidopsis como planta modelo se debe a Fiedrich Laibach en 1943, debido a las facilidades de esta planta para el análisis genético, al tener un tamaño de genoma pequeño y un ciclo de vida corto. A pesar de ello, no se hizo popular inmediatamente, pues presentaba enormes inconvenientes para la época, como el pequeño tamaño de sus cromosomas que impedía el estudio citológico, la dificultad de regeneración de plantas completas a partir de cultivos celulares, y su falta de interés comercial (Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

No fue hasta principios de la década de 1980, cuando se lograron tres avances importantísimos que impulsarían totalmente la utilización en ciencia de esta planta. Se logró identificar por mutación y mapeo, gran cantidad de genes en los cromosomas de la planta, que simultáneamente con el descubrimiento de la importancia del análisis genético, permitieron caracterizar importantes procesos bioquímicos. Por último, se determinó que la cantidad de ADN presente en el genoma de arabidopsis era la más pequeña encontrada en cualquier planta de semilla descrita hasta el momento. En las siguientes tres décadas, numerosos investigadores de todo el mundo centraron sus estudios en esta planta, logrando un enorme aumento en el conocimiento científico vegetal (Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

Por lo tanto, la elección de *A. thaliana* como planta modelo en biología vegetal se basa en siete características principales: su pequeño tamaño y fácil manejo, su corto tiempo de generación, su autopolinización y número de semillas producidas (>1000 semillas por planta), su pequeño genoma y su número reducido de cromosomas (Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

1.4.- Transformación génica y hallazgos importantes

Arabidopsis puede ser transformada fácilmente utilizando la bacteria *A. tumefaciens* y su ADN de transferencia (T-DNA). En un principio, la metodología de transformación más ampliamente utilizada y desarrollada fue el cultivo de tejidos *in vitro*, pero se reemplazó de forma muy exitosa por el sistema de agro-infiltración. En esta técnica, se pone en contacto a las bacterias, con el gen de interés integrado, con los primordios florales en formación, siendo la bacteria capaz de infectar las células que darán lugar a los gametos formadores de las semillas. Las semillas quedan transformadas con el gen de interés y son fácilmente seleccionadas en forma de plántulas, mediante marcadores de resistencia o fenotípicos

diferenciables (Koornneef & Scheres, 2001; Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015).

El estudio génico mediante la creación de mutantes en arabidopsis ha llevado al desarrollo de numerosas e importantísimas ideas en lo que al mundo vegetal se refiere, como son los sistemas de floración, crecimiento radicular, formación de tricomas, fotorrespiración, síntesis de pared celular, síntesis lipídica, biosíntesis y modo de acción de fitohormonas, fotorrecepción, etc. (Koorneef & Scheres, 2001; Sivasubramanian et al., 2015).

Por lo tanto, la investigación con arabidopsis ha sido una importantísima fuente de conocimiento en el estudio de la biología vegetal, habiendo desarrollado y estando en continua promoción de gran cantidad de datos e información presentes en tres principales plataformas online, aunque hay muchas más (Haughn & Kunst, 2010; Sivasubramanian et al., 2015):

- TAIR (The Arabidopsis Information Resource; http://www.arabidopsis.org)
  Base de datos con el genoma completo de la planta, información respecto a genes, proteínas, metabolismo, mapas genómicos, marcadores genéticos, publicaciones, mutantes, stocks de semillas, etc.
- SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; http://signal.salk.edu/)
  Plataforma basada en la visualización de datos génicos, polimorfismos, expresión por microarrays, líneas insercionales, metilación, etc.
- NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre; http://arabidopsis.info/)
  Base de datos europea de información sobre arabidopsis, así como centro de distribución de semillas.

Por otro lado, *A. thaliana* también es una planta modelo para estudios de interacción con el medio circundante. Esto incluye la respuesta frente a estreses de tipo abiótico o el ataque producido por diferentes patógenos y plagas (Sivasubramanian et al., 2015; Andargie & Lie, 2016; Wang et al., 2016).

2.- COLONIZACIÓN RADICULAR POR *Tricoderma* sp.

Como se ha comentado anteriormente, la interacción del hongo *Trichoderma* con las raíces de plantas provoca en éstas una serie de cambios metabólicos que estimularán el crecimiento y desarrollo, las defensas frente a patógenos y la tolerancia a estreses abióticos (Harman et al., 2004; Shoresh et al., 2010; Hermosa et al., 2012). La penetración de las hifas del hongo en la raíz alcanza únicamente las capas externas sin llegar a colonizar el haz vascular. Además de la única presencia del hongo en la epidermis, cabe destacar que la penetración se limita al apoplasto, como consecuencia de la deposición de lignina y/o de glucano (Yedidia et al., 1999; Yedidia et al., 2000; Chacón et al., 2007; Velázquez-Robledo et al., 2011) (Figura 1.1).

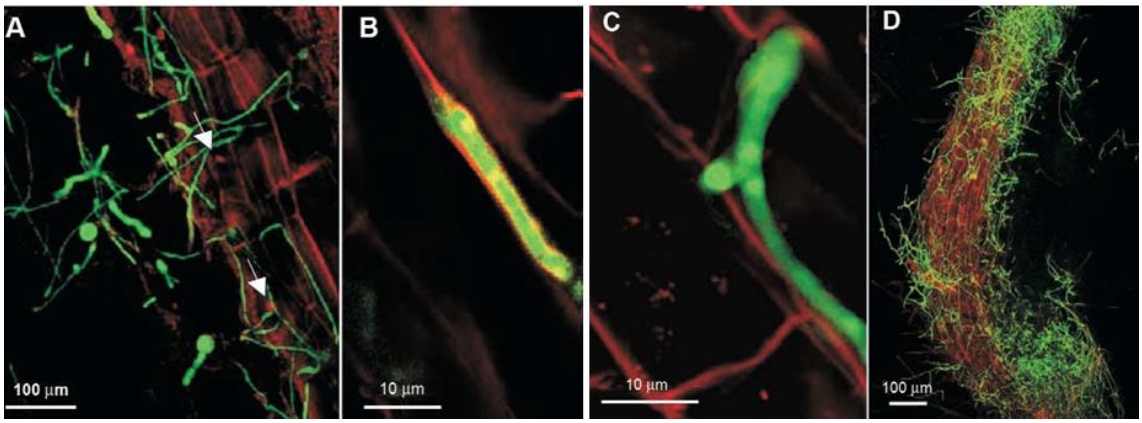


Figura 1.1: Vista a microscopio confocal de la colonización de raíces de tomate por *T. harzianum* GFP22. La fluorescencia en verde causada por la expresión de GFP indica la presencia del hongo, mientras que la fluorescencia roja causada por el yoduro de propidio muestra las células vegetales. **(A)** Las hifas han entrado en las raíces y colonizado el espacio intercelular de la epidermis 10 h después de la inoculación del hongo en plantas de 3 semanas**. (B)** Las hifas han crecido entre las células de la epidermis y están rodeadas por paredes celulares de la planta**. (C)** En algunos casos, las hifas mostraban en su extremo una punta hinchada, que fue identificada como una vesícula no septada. **(D)** Tras 24 h de la inoculación se observa una amplia colonización de la superficie de la raíz por parte del hongo. Extraído de Chacón et al. (2007).

El reconocimiento entre la planta y sus invasores implica numerosas respuestas moleculares. Un estudio pionero demostró que la colonización de la raíz por parte de *Trichoderma* iba acompañada de la elicitación de respuestas sistémicas (de Meyer et al., 1998); posteriormente estas respuestas se relacionaron con la inducción de genes de defensa a través de las rutas del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET) (Yedidia et al., 2001; Shoresh et al., 2005; Korolev et al., 2008). Numerosos estudios han puesto de manifiesto que este

hongo beneficioso es capaz de activar las defensas tanto a nivel local (Brotman et al., 2008) como sistémico (Van Wees et al., 2008; Morán-Diez et al., 2009; Soresh et al., 2010), incluso durante periodos de tiempo relativamente largos (Tucci et al., 2011), lo que sugiere que se puede producir tanto un retraso como un solapamiento en la expresión de genes relacionados con las diferentes rutas defensivas de la planta (Salas-Marina et al., 2011), que adoptan una dinámica ondulante de respuesta a los estímulos de *Trichoderma* (Rubio et al., 2014). Por tanto, parece que *Trichoderma* sería percibido como hostil por parte de la planta y la activación de las defensas limitaría la penetración del hongo a las capas celulares más externas de la raíz. Estudios transcriptómicos han demostrado que durante las primeras horas de interacción entre el hongo y la planta se produce una amplia reprogramación genética, precedida por un descenso transitorio de la respuesta inmune de la planta, lo que probablemente permite la colonización de la raíz (Morán-Diez et al., 2012; Brotman et al., 2013) (Figuras 1.2 y 1.3).

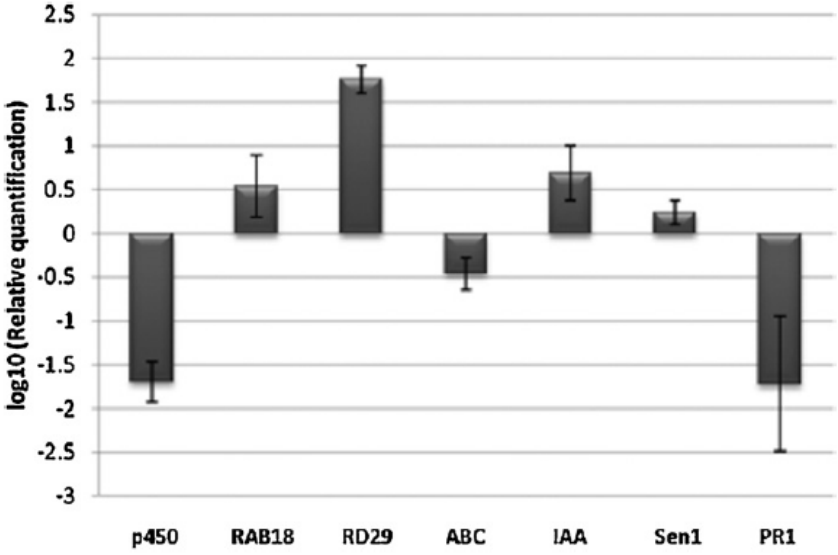


Figura 1.2: RT-PCR cuantitativa de los genes citocromo p450, RAB18, RD29, un transportador ABC, una IAA amidasa, SEN1 y PR-1, en plantas de arabidopsis, 24 horas tras a inoculación con la cepa T34 de *T. harzianum*. Los valores corresponden con las medidas relativas frente arabidopsis no inoculada con T34 ($2^{-\Delta\Delta CT}=1$). El gen de la actina de arabidospsis se usó como gen de referencia interno. Las barras representan desviaciones estándar de la media de los valores de tres réplicas biológicas. Extraído de Morán-Diez et al. (2012).

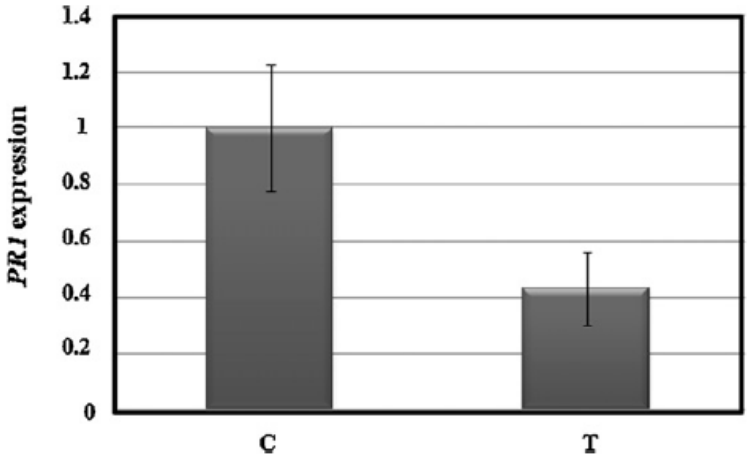


Figura 1.3: RT-PCR cuantitativa del gen *PR1* en raíces de arabidopsis inoculadas con la cepa T34 de *T. harzianum* (T) o no (C). El ARN fue extraído de plantas 6 horas tras la inoculación. El gen de la actina de arabidospsis fue utilizado como gen de referencia interno. Las barras representan desviaciones estándar de la media de los valores de tres réplicas biológicas. Extraído de Morán-Diez et al. (2012).

3.- EL ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

Las plantas deben responder y combatir frente a una gran variedad de estreses presentes en su medio circundante, muchos de los cuales amenazan a menudo su vida. Para ese fin, están equipadas naturalmente con sistemas de percepción, tolerancia, defensa y adaptación frente a estreses bióticos y abióticos, que conllevan cambios transcriptómicos, celulares y fisiológicos (Gehrmann, 2013; Kawano et al., 2013; Sánchez et al., 2013).

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona implicada en la resistencia vegetal frente a diferentes organismos, tanto a nivel sistémico como local, así como en la respuesta frente a estreses abióticos, en crecimiento y en desarrollo (Bandurska, 2013; Yusuf et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Klessig et al., 2016). Tanto la producción de SA como su modo de acción están ampliamente controlados por múltiples reguladores positivos y negativos (An & Mou, 2011; Tounekti et al., 2013; Seyfferth & Tsuda, 2014; Klessig, 2017).

El nombre de esta fitohormona proviene del sauce (*Salix helix*), árbol de cuya corteza se obtenía SA para la fabricación de fármacos antiinflamatorios naturales, hasta el siglo XIX, cuando Bayer Company (1899) sintetiza el ácido acetilsalicílico o aspirina, como agente antiinflamatorio (Bandurska, 2013; Kawano et al., 2013; Klessig et al., 2016). Su descubrimiento se le otorga a Hipócrates en el siglo IV a.C., quien lo prescribía como un

aliviador del dolor durante el parto (Sahu, 2013). En 1928, Johann Buchner aísla de la corteza del sauce un compuesto que denomina salicina o alcohol salicílico glucósido, molécula que más tarde se renombrará como ácido salicílico por Rafaele Piria en 1938 (Bandurska, 2013; Sahv, 2013; Yusuf et al., 2013). Pero no es hasta 1979 cuando se relacionan los salicilatos con las enfermedades de las plantas, demostrando como la aplicación foliar de la aspirina era eficaz contra el virus del mosaico del tabaco al inducir resistencia en dichas plantas (White, 1979; Sánchez et al., 2013).

El SA, químicamente conocido como ácido 2-hidroxi-benzoico (Figura 1.4), es un compuesto fenólico formado por un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Sahu, 2013; Tounekti et al., 2013; Yusuf et al., 2013; Seyfferth & Tsuda, 2014).

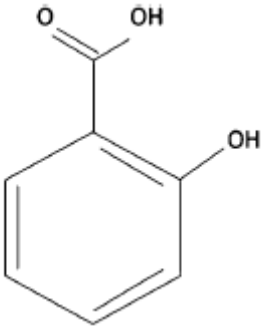


Figura 1.4: Estructura química del ácido salicílico. Extraído de Sahu (2013).

3.1.- Biosíntesis

El SA es sintetizado por las plantas a través de dos rutas diferentes, separadas físicamente, que emplean, además, distintos precursores: la ruta de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima que actúa sobre la fenilalanina (Phe), que comienza en el citoplasma; y la ruta del isocorismato (IC), que actúa a nivel de cloroplasto. Ambas rutas provienen en primer término del corismato, un producto generado en la ruta del shikimato, siendo este último un derivado del 3-deshidroshikimato, el cual proviene de un fosfoenolpiruvato producido en el ciclo de la glucólisis (Figura 1.5) (Sahu, 2013; Tounekti et al., 2013; Ding, 2014; Xu, 2015; Muthulakshmi & Lingakumar, 2017).

3.1.1.- Ruta PAL

Según han desvelado varios estudios de radiomarcaje, el SA se sintetizaría a través de esta ruta transformando la Phe en ácido *trans*-cinámico (*t*-CA) gracias a la acción de la enzima PAL, siendo este último posteriormente modificado para formar los ácidos benzoico

(BA) y *orto*-cumárico. A partir de estos dos últimos compuestos se sintetizaría el SA de forma totalmente independiente en cada caso. Por otro lado, disponer de Phe como compuesto inicial requiere la acción de la enzima corismato mutasa (CM), que transforma el corismato en Phe (Davies, 2010; An & Mou, 2011; Tounekti et al., 2013; Ding, 2014; Liu et al., 2015).

3.1.2.- Ruta IC

A través de esta ruta, el SA se sintetiza partiendo del isocorismato resultante de la acción de la enzima isocorismato sintasa (ICS) sobre el corismato. Por último, el IC es transformado en SA mediante la liberación de piruvato, por la actividad de la enzima isocorismato piruvato liasa (IPL) (Bandurska, 2013; Lovelock, 2013; Sánchez et al., 2013; Tounekti et al., 2013; Liu et al., 2015).

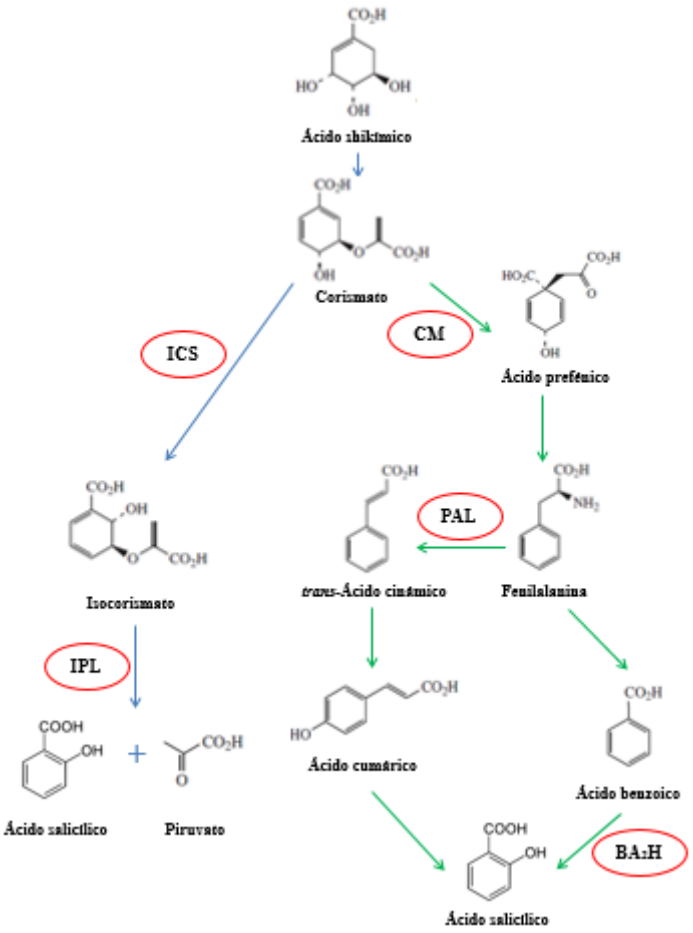


Figura 1.5: Biosíntesis del SA en plantas. **ICS**: isocorismato sintasa; **CM**: corismato mutasa; **PAL**: fenilalanina amonio liasa; **IPL**: isocorismato piruvato liasa; **BA_2H**: ácido benzoico 2-hidrolasa . Adaptado de Tounekti et al. (2013).

Como ocurre normalmente al hablar de rutas metabólicas, los compuestos que se van formando pueden seguir dentro de la misma ruta o pasar a otras distintas para llegar a formar compuestos de diferente índole. En este sentido, las rutas de síntesis del SA tienen relación con otras muy diferentes, como la síntesis de lignina o la ruta de las auxinas (Figura 1.6) (Lovelock, 2013; Sánchez et al., 2013).

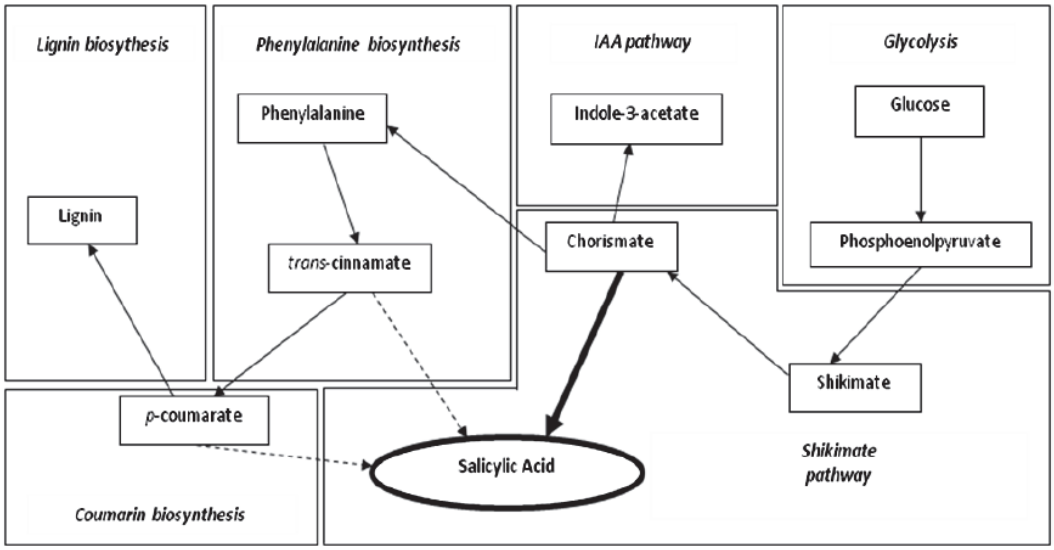


Figura 1.6: Relación de las rutas biosintéticas del SA con otras rutas anabólicas. Extraído de Lovelock (2013).

La síntesis del SA es un proceso muy regulado, ya que un exceso en su acumulación puede llegar a ser muy perjudicial para las plantas, y, en el caso de la ruta IC, la regulación transcripcional por señal de calcio de la ICS es clave (Figura 1.7). La concentración de iones calcio (Ca^{2+}) en el citosol celular va aumentando transitoriamente a través de canales de membrana según se van activando los receptores inmunes de percepción de patógeno. Este aumento en los niveles de calcio es recogido por proteínas sensibles al mismo, tales como calmodulina (CaM) y proteínas kinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs). La CaM se ligará a factores de transcripción de unión a CaM, como la proteína de unión a CaM 60g (CBP60g) y su homólogo, el deficiente de resistencia adquirida 1 (SARD1), los cuales van a controlar la transcripción de la ICS1. Por otro lado, la CaM también se une a un factor de transcripción de ICS1 negativo, con el fin de evitar que la síntesis de SA se dispare de forma incontrolada. Del mismo modo, las CDPKs provocarán fosforilación de los factores de transcripción WRKY, activando la transcripción de la ICS1. Además, la acumulación celular de Ca^{2+} va a afectar el mantenimiento de unos niveles correctos de SA mediante la regulación

transcripcional del gen del aumento de la susceptibilidad a la enfermedad (EDS1), que codifica para un regulador del bucle de retroalimentación positiva de la acumulación de SA. Este gen es reprimido gracias al activador transcripcional 3 de unión a CaM (CAMTA3), también conocido como gen de respuesta a la señal 1 (SR1) (Li, 2014; Seyfferth & Tsuda, 2014; Vidhyasekaran, 2015; Xu, 2015, Verma et al., 2016).

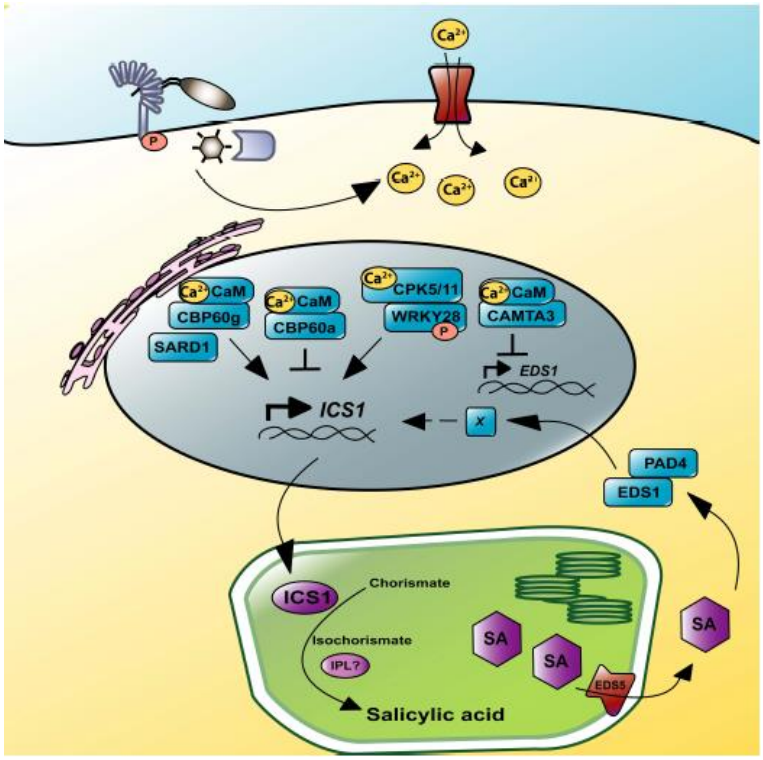


Figura 1.7: Regulación de la acumulación de SA celular por señal de calcio. Extraído de Seyfferth & Tsuda (2014).

Tras su síntesis, el SA normalmente se conjuga con glucosa y/o grupos metilo (Figura 1.8). La conjugación con glucosa en su grupo hidroxilo dará como resultado la formación de SA O-β-glucósido (SAG), mientras que si tiene lugar en un grupo carboxilo pasará a formar éster de saliciloil glucosa (SGE). Esta reacción es catalizada por la SA glucosiltransferasa (SAGT) citosólica, inducida por el ataque de patógenos. Los glucósidos de SA resultantes quedan almacenados en vacuolas de forma inactiva, a la espera de que la célula necesite la liberación del SA para transmitir una señal. Por otro lado, el SA puede ser metilado en un grupo carboxílico, formando el metil salicilato (MeSA), el cual actúa como una importante señal a larga distancia en la resistencia sistémica adquirida (SAR). Además, el MeSA puede ser glucosilado para ser almacenado como metil salicilato O-β-glucósido (MeSAG) (Davies, 2010; Sahu, 2013; Thompson et al., 2017).

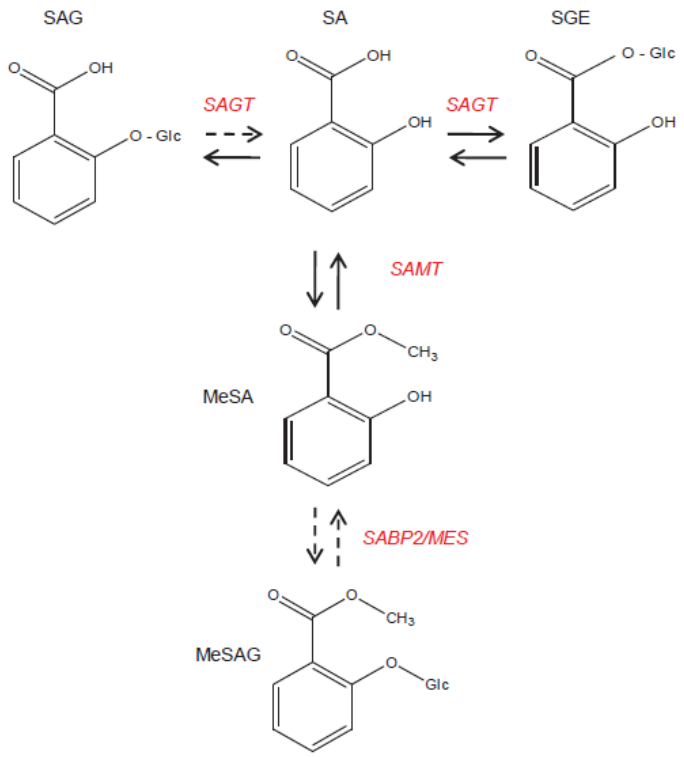


Figura 1.8: Estructura del SA y sus derivados. SAG: SA O-β-glucósido; **SGE**: éster de saliciloil glucosa; **MeSA**: metil salicilato; **MeSAG**: metil salicilato O-β-glucósido; **SAGT**: SA glucosiltransferasa; **SAMT**: SA metiltransferasa; **SABP2**: proteína 2 de unión a SA; **MES**: éster metílico. Extraído de Lovelock (2013).

3.2.- Modo de acción

La identificación del receptor/es de SA ha sido uno de los mayores intereses científicos en este campo de investigación en las últimas dos décadas. La posibilidad de que exista más de un receptor para el SA se basa en las diversas funciones que puede tener esta fitohormona en respuesta a los estreses medioambientales. Se han descrito tres miembros dentro de la familia de los genes no expresivos relacionados con patogénesis (NPR) (NPR1, NPR3 y NPR4) como posibles receptores del SA en *A. thaliana* (Ding, 2014; Seyfferth & Tsuda, 2014; Liu et al., 2015; Klessig et al., 2016; Verma et al., 2016).

NPR1 es el principal regulador transcripcional mediado por SA, funcionando como un coactivador. Es más, mutantes en *NPR1* pierden totalmente la capacidad de responder a la presencia de SA, resultando dichas plantas enormemente afectadas por patógenos (hemi)biotrofos. Para que ocurra la percepción del SA por NPR1 tiene que suceder un cambio estructural en esta proteína que permite la unión del SA (modificación redox) en unos aminoácidos residuales $Cys^{521/529}$ junto con un ión cobre (Cu^{2+}) (Figura 1.9). Pero los

residuos Cys$^{521/529}$ no se encuentran conservados en todas las especies de plantas, por lo que se han descrito dos homólogos de NPR1 como posibles receptores de SA (An & Mou, 2011; Ding, 2014; Seyfferth & Tsuda, 2014; Herrera-Vásquez et al., 2015).

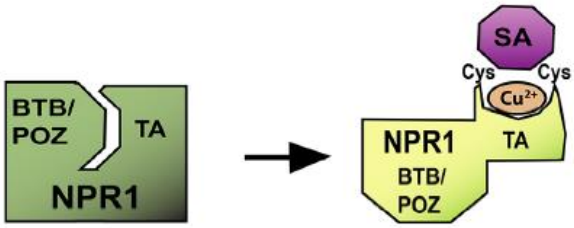


Figura 1.9: Percepción del SA por NPR1. Extraído de Seyfferth & Tsuda (2014).

Aunque NPR3 y NPR4 pueden funcionar como posibles receptores de SA y activadores de las respuestas defensivas en plantas, su papel en arabidopsis se basa de una forma más íntima en la regulación de la acumulación de NPR1 (Figura 1.10). En ausencia de SA, NPR1 es degradado vía el proteosoma 26S, y cuando el SA aumenta en respuesta al ataque de un patógeno, NPR1 es estabilizado. Sin embargo, la inducción de genes de respuesta al SA requiere también de un nivel apropiado de NPR1, por lo que la regulación de la cantidad de esta proteína es clave para la defensa mediada por SA. En este sentido, NPR3 y NPR4 interaccionan con NPR1 y son fundamentales para su degradación, siendo que NPR3 induce la degradación de NPR1 con elevados niveles de SA y NPR4 con bajos niveles de SA. Así, unos niveles aceptables de NPR1 sólo estarán presentes bajo cantidades intermedias de SA (Furniss & Spoel, 2014; Seyfferth & Tsuda, 2014; Herrera-Vásquez et al., 2015).

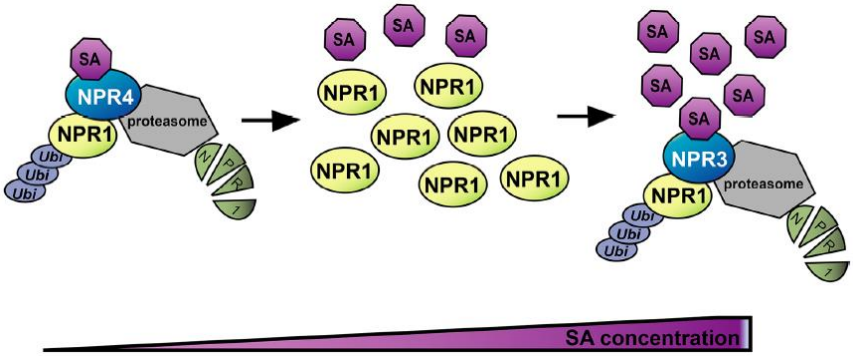


Figura 1.10: Regulación de la acumulación de NPR1 mediada por SA sobre NPR3 y NPR4. Extraído de Seyfferth & Tsuda (2014).

La acumulación nuclear de NPR1 en respuesta a una determinada concentración de SA no es suficiente para provocar los cambios transcripcionales necesarios para la expresión del

gen 1 relacionado con la patogénesis (*PR1*), sino que a este nivel se requiere, de nuevo, la presencia de SA (Figura 1.11). Al entrar en el núcleo, NPR1 se une a unos factores de transcripción con dominios cremallera de leucina básica (bZIP) denominados TGA, por su unión específica a palíndromos TGACG, impidiendo la transcripción de *PR1*; pero a este complejo de represión también debe unirse la proteína 1 de interacción con NPR1 (NIMIN1). Todo el sistema está controlado por el represor transcripcional TOPLESS o por el complejo de la proteína NAC (NAM, ATAF1 y 2, CUC2) de unión a CaM y el supresor inducible 1 de NPR1 (CBNAC-SSNI1). Una vez el SA produce un cambio conformacional de NPR1, se produce la disociación de NIMIN1 y la formación de un complejo activador de la transcripción que incluye factores TGA y proteínas reparadoras del ADN, como las denominadas SSN2, cáncer de mama 2A (BRCA2) y RAD51, que son particularmente requeridas en esta transcripción (Seyfferth & Tsuda, 2014; Herrera-Vásquez et al., 2015; Peele, 2015; Verma et al., 2016).

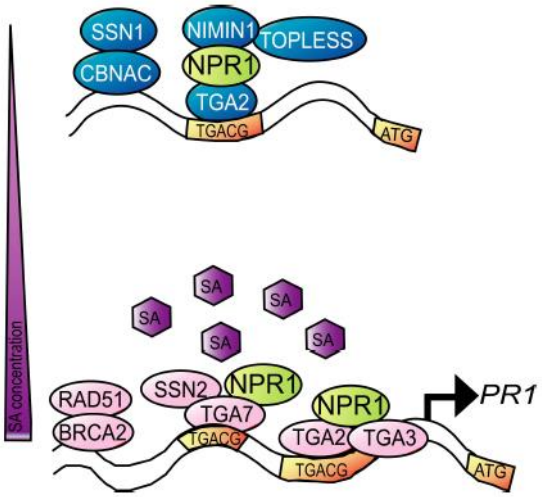


Figura 1.11: Regulación transcripcional de PR1 a través de NPR1 y mediada por SA. Extraído de Seyfferth & Tsuda (2014).

3.3.- Papel del SA en la resistencia frente a patógenos

Debido a su inmovilidad, las plantas han desarrollado mecanismos físicos y químicos para defenderse de sus atacantes, como pueden ser cutículas, paredes celulares o diferentes compuestos antimicrobianos. Sin embargo, los patógenos pueden ser capaces de sobrepasar estas barreras, momento en el que las rutas de señalización se activan, provocando la expresión de genes específicos. Debido a que las defensas de la planta son energéticamente muy costosas, la selección natural ha favorecido la evolución de mecanismos de defensa

inducibles únicamente en presencia de patógeno (Sánchez et al., 2013; Ding, 2014; Grabinski, 2014; Taiz et al., 2015; Alharthi, 2016).

Cuando el patógeno rompe las barreras de defensa exteriores de la planta, es reconocido en la superficie de cada célula por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que detectan epítopos de moléculas microbianas altamente conservadas, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a microorganismos (MAMPs), o bien oligómeros de la pared celular o fragmentos cuticulares liberados por acción hidrolítica de los atacantes sobre los tejidos de la planta, que son conocidos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). La unión de estos epítopos a PRRs dispara una cascada de transducción de señales, con activación de proteínas kinasa activadas por mitógeno (MAPKs) y la producción de factores transcripcionales con dominios WRKY (se llaman así porque tienen una secuencia de aminoácidos WRKYGQK conservada en el extremo N-terminal), que estimula lo que se conoce como inmunidad provocada por PAMPs (PTI), o en su defecto por MAMPs (MTI), incluyéndose en este último término la respuesta a DAMPs. Como resultado, se produce la apoptosis de dichas células, basada en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), con el fin de aislar al patógeno entre células muertas, evitando el ataque de las células vecinas sanas, asegurando por encima de todo, la supervivencia del organismo. Esto es lo que se conoce como respuesta hipersensible (HR), la cual provocará la activación de una resistencia adquirida local (LAR) cercana a la lesión y de la resistencia sistémica adquirida (SAR) por toda la planta, de larga duración y amplio espectro, mediante la expresión de genes relacionados con la defensa (PR), que codifican proteínas con actividad antimicrobiana. Tanto la HR como la SAR requieren de SA para poder llevarse a cabo, ya que existen hasta 13 conjuntos de proteínas PR inducidas por SA (Figura 1.12) (Gangadharan, 2014; Taiz et al., 2015; Burra, 2016; Mahesh et al., 2017; Mendoza-Mendoza et al., 2018; Ziemann et al., 2018).

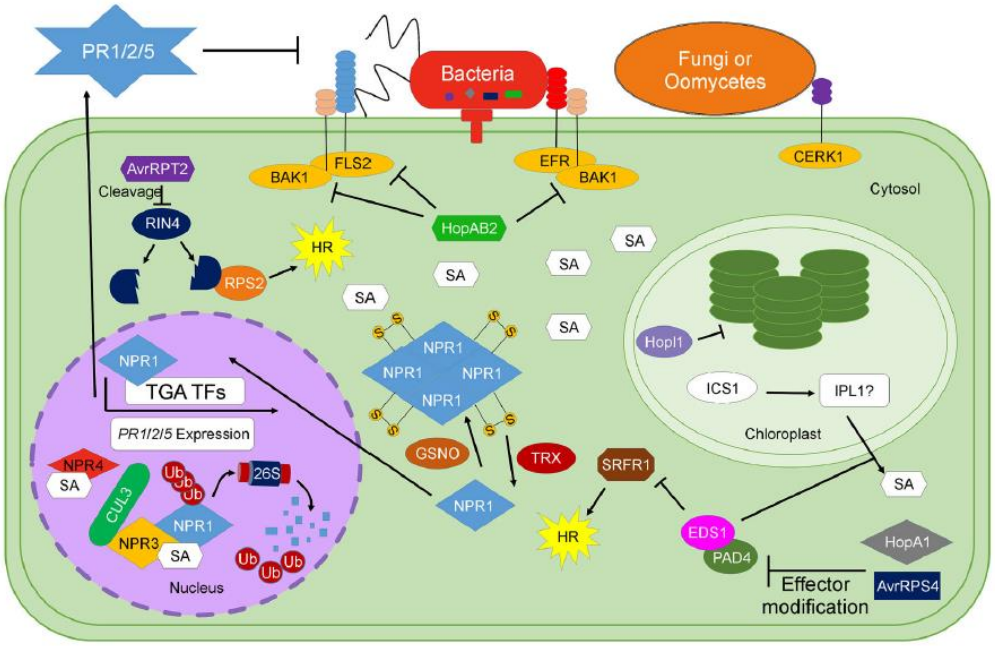


Figura 1.12: Modelo de defensa vegetal mediada por SA. Una vez los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) detectan un MAMP, comienza la acumulación de SA desde el cloroplasto, pudiendo los patógenos liberar efectores (ej. proteínas Hop, Avr) que impiden la percepción del patógeno o la síntesis del SA (defensa PTI), produciendo la denominada como inmunidad provocada por efector (ETI). Una vez se logra la acumulación celular de SA a los niveles necesarios, las proteínas PR se liberan al apoplasto celular, inhibiendo al patógeno. Extraído de Palmer et al. (2017).

Por otro lado, la SAR también presenta beneficios transgeneracionales, ya que provoca que la "memoria" inmune pueda ser heredada por la progenie. La SAR también se transmite a plantas vecinas mediante la molécula volátil MeSA, que se convierte en SA para inducir la respuesta defensiva gracias al enzima MeSA esterasa (Figura 1.13) (Kachroo & Robin, 2013; Ding, 2014).

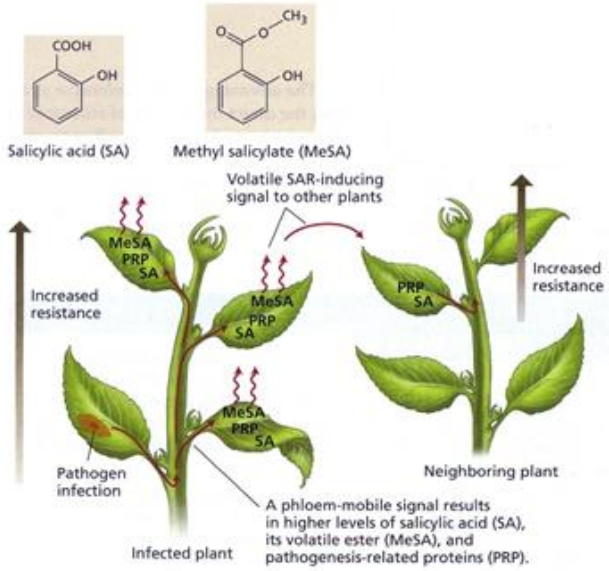


Figura 1.13: SAR mediada por SA. Extraído de Taiz & Zeiger (2010).

3.4.- Papel del SA en la tolerancia frente a estreses abióticos

Los estreses abióticos han sido reconocidos como las mayores amenazas para la producción agrícola en todo el mundo, y la actividad antropogénica agrava año tras año el problema, aumentando en los sistemas agrícolas la cantidad de metales pesados, la salinidad, el ozono, la radiación ultravioleta B, las temperaturas extremas, la sequía y tanto la deficiencia como el exceso de nutrientes. El SA guarda relación con la mejor tolerancia de las plantas a este tipo de estreses (Khan et al., 2015; Gray & Shaffer, 2017; Hasanuzzaman et al., 2017).

En el caso de los metales pesados, el SA modula diferentes componentes del sistema antioxidante de la planta, secuestrando radicales libres y ROS, además de reducir significativamente la peroxidación lipídica en la membrana celular, y es que las plantas expuestas a metales pesados generan estrés oxidativo que conduce al daño de la célula (Liu et al., 2016; Pan et al., 2017; Lu et al., 2018), algo similar a lo que ocurre frente a la salinidad, donde el SA es capaz de aumentar la concentración de compuestos osmorreguladores como la prolina, de reducir la peroxidación lipídica y de favorecer la síntesis de proteínas kinasa específicas y compartimentalizar compuestos del estrés oxidativo (Amirinejad et al., 2017; Asmaa et al., 2017; El-Beltagi et al., 2017; Faghih et al., 2017; Rubio et al., 2017), o la sequía, aminorando el estrés oxidativo, además de aumentar la actividad carboxilasa de la Rubisco y el contenido total en clorofila y ABA de las hojas (Khan et al., 2015; Sharma et al., 2017).

3.5.- Relación del SA con otras hormonas

La resistencia mediada por SA en las plantas es generalmente efectiva contra patógenos biotrofos, mientras que la mediada por ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) trabaja contra patógenos necrotrofos e insectos herbívoros. Existe un antagonismo mutuo entre las señales dependientes de SA y de JA/ET. Las auxinas son fitohormonas que afectan a casi todos los aspectos de crecimiento y desarrollo de la planta. Puesto que hay patógenos que manipulan la síntesis de auxinas para mejorar su proceso de infección, la presencia de SA inhibe la síntesis de esta hormona, pues es una señal de infección. Algo similar sucede con las citoquininas (CKs) (Figura 1.15) (An & Mou, 2011; Sánchez et al., 2013; Tanaka et al., 2014; Verma et al., 2016).

El ácido abscísico (ABA) tiene un papel fundamental en las respuestas de la planta frente a estreses abióticos, y es por eso que regula negativamente las respuestas de defensa frente a patógenos. Las giberelinas (GAs) son hormonas implicadas en el crecimiento y desarrollo vegetal que favorecen la resistencia de la planta frente a patógenos biotrofos. Los brasinoesteroides (BRs) parece que promueven la resistencia frente a patógenos biotrofos de una forma independiente a SA (Figura 1.14) (An & Mou, 2011; Verma et al., 2016).

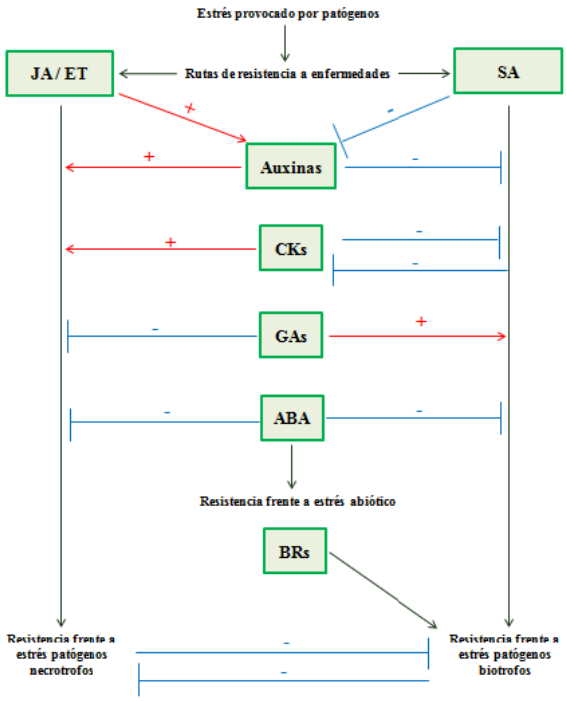


Figura 1.14: Posible modelo de interacción entre las diferentes rutas de señalización hormonal. **SA**: ácido salicílico; **JA**: ácido jasmónico; **ET**: etileno; **CKs**: citoquininas; **GAs**: giberelinas; **ABA**, ácido abscísico; **BRs**: brasinoesteroides. Elaboración propia.

3.6.- Papel del SA en la colonización radicular por microorganismos beneficiosos

Los mecanismos por los que el SA es capaz de activar las defensas a nivel radicular e impedir la infección de microorganismos patógenos son bien conocidos, pero el modo en el que actúa cuando hablamos de microorganismos beneficiosos está siendo últimamente muy revisado.

De forma similar a lo que ocurre con los fitopatógenos, los microorganismos beneficiosos también requieren evadir, al menos parcialmente, las respuestas defensivas de las plantas para establecer una asociación mutualista con ellas (Zamioudis & Pieterse, 2012; Zebire, 2017). En este sentido, el SA juega un papel fundamental en estas respuestas frente a patógenos biotrofos, que viven normalmente en los espacios intercelulares (Glazebrook, 2005) y, de esta misma forma, se requiere de una acumulación transitoria durante las primeras fases de colonización de la raíz por microorganismos mutualistas (Herrera-Medina et al., 2003).

La rizosfera es un lugar repleto de gran cantidad de microorganismos, muchos de los cuales no van a ser ni ventajosos ni perjudiciales para las plantas, pero también los hay patógenos y beneficiosos. Por lo que se refiere a las bacterias beneficiosas, existe un número muy limitado de las mismas en comparación con todo el conjunto bacteriano del suelo, y la planta debe elegir de forma muy precisa con cual merece comenzar el proceso de formación de los complejos simbióticos. En este sentido, se ha determinado que es el SA la hormona responsable de esta selección microbiana, pues mutantes deficientes en dicha hormona no llegan a beneficiarse correctamente de las relaciones simbióticas con las bacterias beneficiosas presentes (Lebeis et al., 2015). Además, se ha comprobado como las rizobacterias requieren de una supresión parcial de las respuestas de la planta al SA para poder nodular (Peleg-Grossman et al., 2009; Stacey et al., 2006), aunque puede que sólo en nodulaciones de tipo indeterminado el SA juegue un papel importante, y no en las de tipo determinado (Van Spronsen et al., 2010).

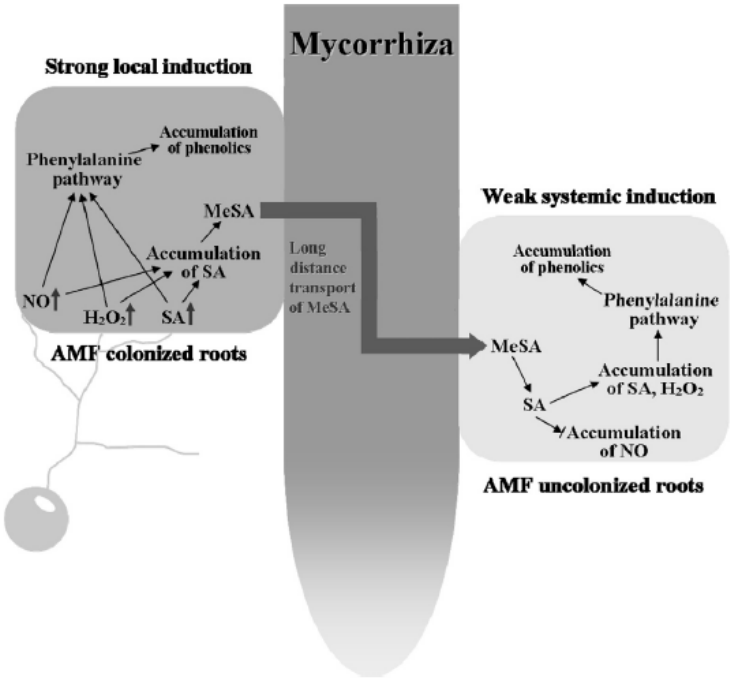


Figura 1.15: Modelo que muestra el papel del SA en la síntesis de compuestos fenólicos como resultado de la colonización radicular por hongos micorrícicos arbusculares (AMFs). Modificado de Zhu et al. (2015).

En el caso de los hongos micorrícicos, la aplicación de SA en plantas inoculadas con dichos hongos propicia un efecto sinérgico en la tolerancia frente a salinidad, mejorando la actividad radicular y su estructura (Ghazanfar et al., 2015). Por otro lado, se ha comprobado como la colonización radicular por estos hongos propicia la acumulación local y sistémica de compuestos fenólicos de defensa frente a patógenos, respuesta mediada por SA (Figura 1.15) (Zhu et al., 2015). En contraposición, se ha comprobado que para que ocurra la asociación entre micorrizas y plantas se necesita la supresión parcial de las respuestas dependientes de SA (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007; López-Ráez et al., 2010). Algo similar a lo observado durante la interacción beneficiosa entre el hongo endofítico *S. indica* (o *P. indica*) y arabidopsis (Jacobs et al., 2011).

HIPÓTESIS

La interacción entre el hongo beneficioso *T. harzianum* y la planta implica el reconocimiento molecular de los dos individuos a través de la interacción entre diferentes rutas de señalización. Este proceso conlleva la capacidad del hongo para adherirse a la raíz y penetrar en el interior de sus células, además de ser capaz de resistir el estrés oxidativo y la toxicidad de diferentes metabolitos defensivos producidos por la planta en respuesta a esta invasión. Los organismos beneficiosos tienen que ser capaces de minimizar la estimulación de las respuestas defensivas de las plantas para establecer esta asociación mutualista. Por su parte, la planta tiene que reconocer al microorganismo invasor, bien para limitar su penetración o bien para permitir esta asociación. Aunque *Trichoderma* no es un organismo patógeno para las plantas, posee MAMPs y libera moléculas efectoras, que, al menos en parte, deben ser muy parecidas a las producidas por los microorganismos patógenos, lo que explicaría por qué en ambos casos las respuestas iniciales son similares, aunque el resultado final sea completamente diferente, provocando en un caso la activación de la respuesta inmune de la planta para luchar contra la enfermedad y en el otro la simbiosis. En un análisis transcriptómico previo realizado por nuestro grupo de investigación se observó que durante las primeras horas de la interacción se produce un descenso en las defensas mediadas por SA, que a tiempos más largos se restablece. Estos datos sugieren que esta bajada de defensas permitiría y limitaría la penetración de *Trichoderma* en las capas más externas de la raíz.

OBJETIVOS

1. Analizar el nivel de colonización radicular por parte de *T. harzianum* en un mutante de *A. thaliana* incapaz de sintetizar SA (*sid2*).
2. Determinar respuestas defensivas en la planta que corroboren estos datos de colonización, así como la expresión diferencial de varios genes de defensa.
3. Comprobar desigualdades fenotípicas relacionadas con las posibles diferencias en el grado de colonización del ecotipo silvestre y *sid2*.

RESULTADOS

Uno de los principales objetivos de este capítulo es analizar el papel del SA en la interacción *Trichoderma*-raíz y tratar de averiguar por qué el hongo es incapaz de penetrar hasta el tejido vascular, limitándose a las capas más externas de la raíz. Para ello, hemos utilizado un transformante de *T. harzianum* que expresa GFP y un mutante de *A. thaliana* (*sid2*), incapaz de sintetizar SA, debido a un defecto en la enzima isocorismato sintasa 1. La observación de la interacción hongo-planta al microscopio confocal, el estudio de la acumulación de calosa, así como los cambios en la expresión de diferentes genes relacionados con la defensa nos ayudaron a comprender el papel del SA en el proceso.

1.- COLONIZACIÓN DE LA RAÍZ POR *T. harzianum*

Los estudios de colonización radicular por parte de *T. harzianum* se realizaron mediante cultivo hidropónico, gracias a una metodología desarrollada en nuestro grupo de investigación, tal y como se muestra en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos.

1.1.- Análisis visual por microscopía confocal

En primer lugar, se observó la colonización radicular por parte del hongo mediante microscopía confocal (Figura 1.16), tal y como se describe en el apartado 5 de Materiales y Métodos.

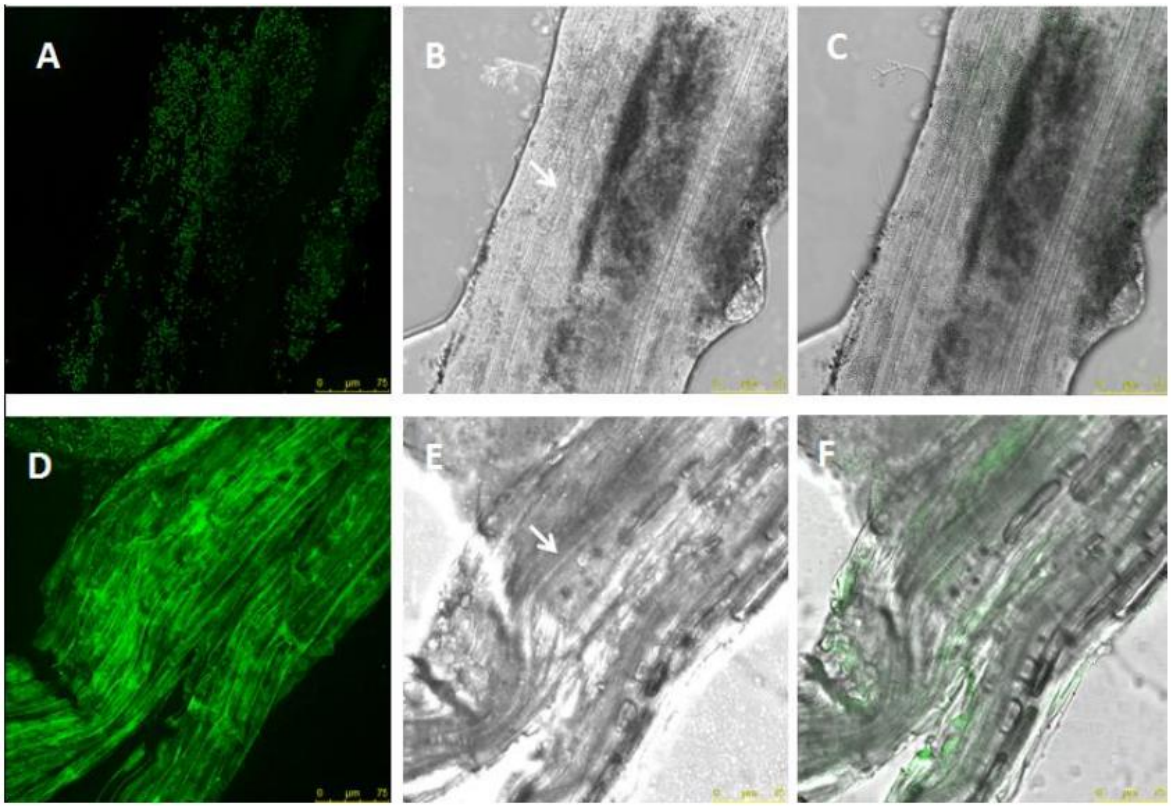


Figura 1.16: Análisis por microscopía confocal de raíces de *A. thaliana*, 17 días en cultivo hidropónico y 72 h tras la inoculación con *T. harzianum* GFP22. (A, B y C) Ecotipo Col-0. **(D, E y F)** Mutante *sid2* deficiente en SA. **(A y D)** Microscopía confocal. **(B y E)** Campo claro. **(C y F)** Ambas microscopías superpuestas. La flecha señala al haz vascular.

Como se observa en la Figura 1.16, después de tres días de interacción, *Trichoderma* es capaz de penetrar en las capas más externas de la raíz de arabidopsis. En el caso del ecotipo silvestre (Col-0*), Trichoderma* ha sufrido cambios morfológicos, pasando a formar estructuras levaduriformes, que se quedan en las capas más superficiales de la raíz. Sin embargo, en el mutante *sid2* de *Arabidopsis* el hongo es capaz de penetrar en el tejido vascular.

1.2.- Cuantificación de la colonización

Para analizar con mayor profundidad la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por parte de *Trichoderma* se hicieron ensayos de qPCR, utilizando los genes endógenos de *actina* correspondientes para cada uno de los organismos (Figura 1.17).

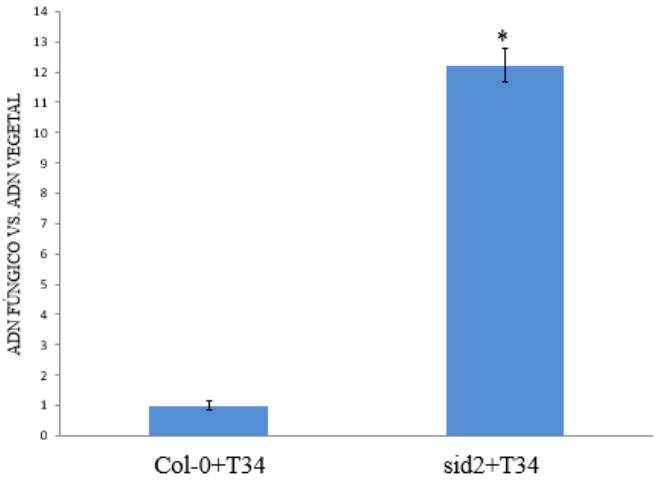


Figura 1.17: Cuantificación de *T. harzianum* GFP22 en las raíces de *A. thaliana* de ecotipo silvestre Col-0 y mutante *sid2* por qPCR. Las barras representan desviaciones estándar de los valores medios de tres repeticiones biológicas. El asterisco indica diferencias significativas mediante ($p \leq 0.05$) entre el ecotipo silvestre y el mutante *sid2*, según el *t-test*.

En la figura 1.17, se observa que en el mutante *sid2* los niveles de *actina* de *Trichoderma* son 10 veces más elevados que en el control, lo cual nos indica que hay más colonización, y nos sugiere la importancia del SA en este proceso.

2.- RESPUESTA HISTOLÓGICA DE LA PLANTA

Para tener más información acerca del papel del SA en la colonización, se observó la acumulación de calosa, una de las primeras y principales barreras defensivas de la planta, tanto en el mutante *sid2* como en el ecotipo silvestre después de la interacción con *Trichoderma*, tal cual se describe en el apartado 6 de Materiales y Métodos.

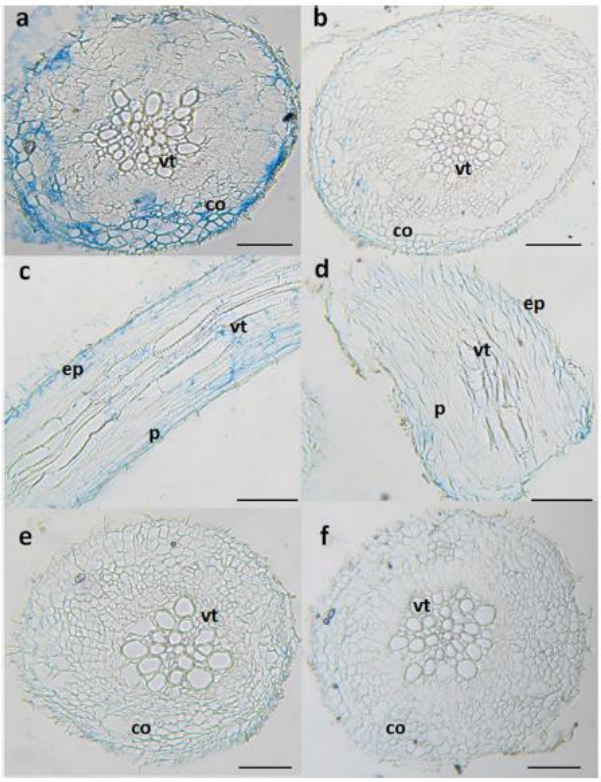


Figura 1.18: Localización de calosa en plantas de *A. thaliana*, 17 días en cultivo hidropónico, ecotipo silvestre Col-0 (a: sección transversal; c: sección longitudinal; e: control sin el hongo) y mutante *sid2* (b: sección transversal; d: sección longitudinal; f: control sin el hongo), después de 72 h tras la inoculación con *T. harianum* GFP22. ep: epidermis; **p:** parénquima; **vt:** tejido vascular; **co**: corteza. Barra = 200 μm.

Se observó que mientras en el mutante *sid2* la presencia de calosa era prácticamente indetectable, en el tipo silvestre podía observarse claramente tanto en células epidérmicas, como en la corteza y el haz vascular (Figura 1.18). Estos resultados indican que el proceso es dependiente de SA y, por lo tanto, muestran el papel crucial que esta hormona tiene en la interacción hongo-raíz.

3.- RESPUESTA GÉNICA DE LA PLANTA

Una vez observado que *T. harzianum* era capaz de colonizar el tejido vascular de la raíz del mutante *sid2* de *Arabidopsis*, y que el nivel de penetración en las raíces fue significativamente mayor en comparación con las plantas del ecotipo silvestre, se analizaron en ambas interacciones los niveles de expresión de diferentes genes de defensa relacionados con las respuestas a JA o SA (Figura 1.19), como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.

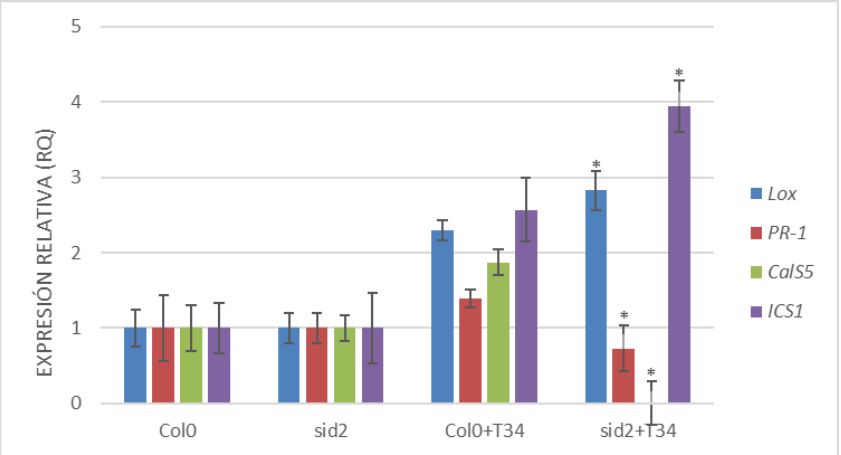


Figura 1.19: RT-qPCR de los genes *LOX1*, *PR-1*, *ICS1* y *CALS5* en raíces de arabidopsis Col-0 y mutante *sid2* colonizadas, o no, con *T. harzianum* GFP22. Los valores corresponden a las mediciones relativas frente a arabidopsis sin GFP22 (valor arbitrario = 1). Como gen de referencia interna se utilizó el gen de *actina* de arabidopsis. Las barras representan desviaciones estándar de los valores medios de tres repeticiones biológicas. El asterisco indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre el ecotipo silvestre y el mutante *sid2*.

De esta manera, hemos podido observar (Figura 1.19) que a los 3 días tras la inoculación de Col-0 con *T. harzianum* GFP22 ocurre una activación en las plantas de los genes *LOX1*, *PR-1*, *ICS1* y *CALS5*, los cuales participan en la biosíntesis de JA, el mecanismo de acción del SA, la biosíntesis de SA y, la biosíntesis de calosa, respectivamente.

En el caso del mutante deficiente en SA, tras la colonización de la raíz por *T. harzianum*, *sid2* aumentó de forma más significativa la expresión de los genes *LOX1* e *ICS1*. Dado que el mutante *sid2* es incapaz de sintetizar SA, el aumento en los niveles de expresión de *ICS1* indican que la planta intenta producir SA en respuesta a la colonización de *Trichoderma* en las raíces, pero finalmente, y debido a la mutación, la proteína correspondiente no se traduce y el SA no es producido. Por el contrario, se observó una inhibición en la expresión de *PR-1* y *CALS5*, ambos, genes de respuesta al SA.

4.- EFECTO DE *T. harzianum* EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LA PLANTA

Los resultados del ensayo in vivo mostraron claramente que hay diferencias significativas entre las plantas de arabidopsis Col-0 y *sid2*, tratadas o no con el hongo (Figura 1.20).

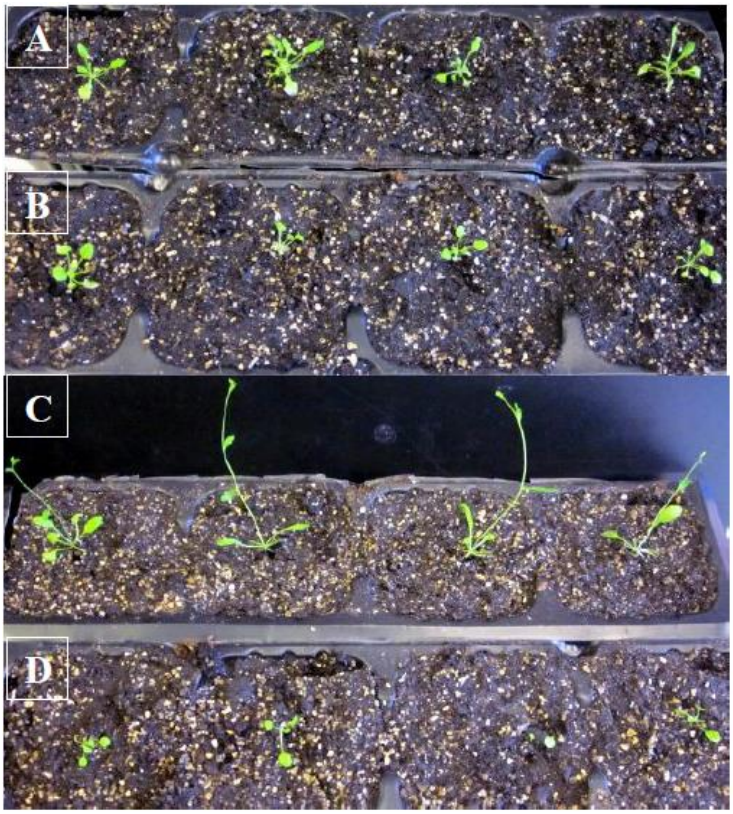


Figura 1.20: Efecto del tratamiento de plantas de arabidopsis Col-0 y *sid2* con *T. harzianum* GFP22, en un ensayo *in vivo*. Las plantas de arabidopsis se inocularon a los 17 días de estar en tierra, con agua (**A**, Col-0; **B**, *sid2*) o con *T. harzianum* GFP22 (**C**, Col-0; **D**, *sid2*). Las fotografías fueron tomadas 7 días tras la inoculación.

La altura de las plantas de Col-0 que habían sido tratadas con *T. harzianum* GFP22, fue 10 veces mayor que el de su correspondiente control (6,58 ± 1,2 cm y 0,65 ± 0,19 cm, respectivamente). Además, el tratamiento con *Trichoderma* ejerce un efecto de precocidad en las plantas Col-0, acelerando la floración, como puede observarse en la figura 1.20C (primordios florales). Por el contrario, el tratamiento del mutante *sid2* con *T. harzianum* GFP22 ejerce un efecto perjudicial en la altura de la planta (0,38 ± 0,09 cm y 0,23 ± 0,05 cm, respectivamente), llegando incluso a producir su muerte.

Estos resultados también se observaron en cultivo hidropónico (Figuras 1.21 y 1.22).

Figura 1.21: Efecto a nivel de tallos y hojas del tratamiento con *T. harzianum* GFP22 en arabidopsis Col-0 (c: plantas no tratadas; d: plantas tratadas) y el mutante *sid2* (a: plantas no tratadas; b: plantas tratadas) en cultivo hidropónico. Las fotografías fueron tomadas 10 días tras la inoculación de las plantas de 14 días de edad.

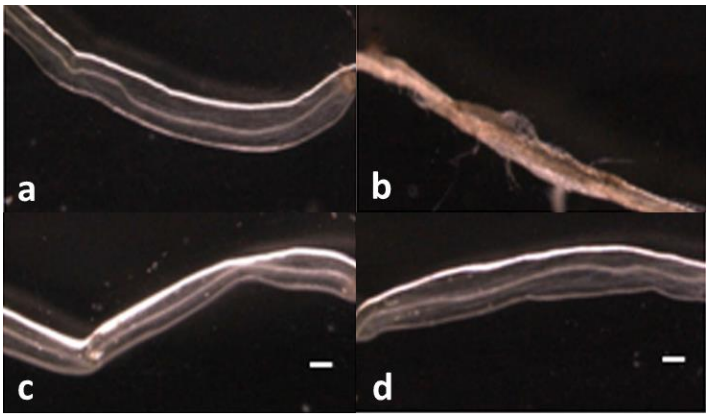


Figura 1.22: Efecto a nivel de radicular del tratamiento con *T. harzianum* GFP22 en arabidopsis Col-0 (c: plantas no tratadas; d: plantas tratadas) y el mutante *sid2* (a: plantas no tratadas; b: plantas tratadas) en cultivo hidropónico. Las fotografías fueron tomadas 10 días tras la inoculación de plantas de 14 días de edad. Las barras representan una medida de 0,15 mm.

Los resultados de los ensayos de cultivo hidropónico revelaron que hubo diferencias significativas en los fenotipos de las plantas entre Col-0 y el mutante *sid2* cuando se trata con *T. harzianum* GFP22 (Figura 1.21), mientras que estas diferencias no se observaron en ausencia del hongo. El tratamiento con GFP22 ejerció un efecto sobre la precocidad del desarrollo de las plantas Col-0, en la que se observó un avance en la fase reproductiva en

comparación con su correspondiente control. Por el contrario, un efecto perjudicial sobre el tamaño de la planta fue provocado por GFP22 en el mutante *sid2*. Por otro lado, no se observaron primordios florales en el mutante tratado con *Trichoderma* y se redujo significativamente el diámetro de la roseta, en comparación con el ecotipo silvestre (1.16 ± 0.22 y 1,97 ± 0,56 cm, respectivamente). Además, las raíces del mutante *sid2* se vieron afectadas por el tratamiento con *T. harzianum*, observándose un marcado grado de pudrición de la raíz (Figura 1.22).

A la vista de los resultados indicados, se decidió realizar un ensayo con cultivos hidropónicos, con el fin de saber si, además de penetrar hasta el haz vascular de la planta, *Trichoderma* era capaz de moverse a través de él y llegar a la parte aérea (Figura 1.23), según la metodología descrita en el apartado 1.23 de Materiales y Métodos.

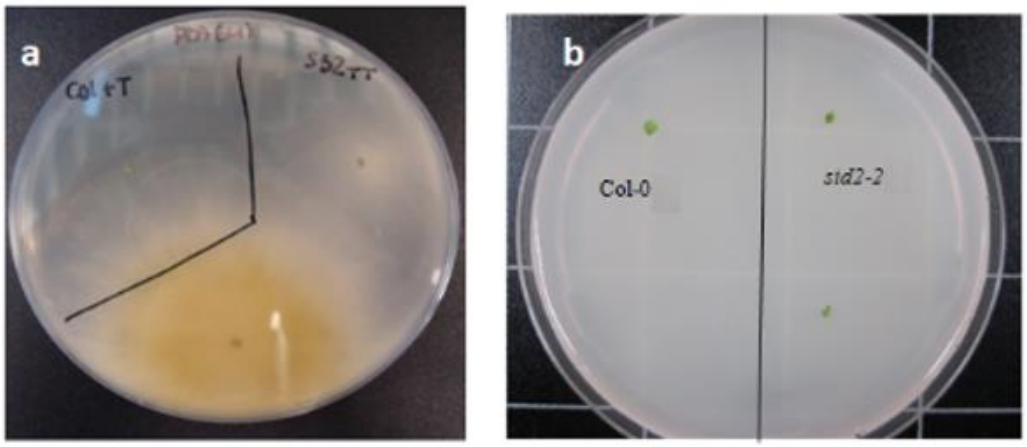


Figura 1.23: Detección de *T. harzianum* en hojas de *A. thaliana*. A: plantas inoculadas; **B**: plantas sin inocular. Las hojas fueron situadas en placas Petri con medio para crecimiento fúngico (PDA) durante 7 días, a 24ºC.

De esta forma se comprobó que *T. harzianum* es capaz de desplazarse internamente desde las raíces hasta las hojas del mutante *sid2* (Figura 1.23), demostrando la importancia de la hormona SA en la colonización beneficiosa del hongo para la planta.

DISCUSIÓN

El establecimiento de asociaciones beneficiosas entre plantas y microorganismos requiere el reconocimiento de ambos y un alto grado de coordinación entre ellos. Un estudio puso de manifiesto que el micoparasitismo fue el estilo de vida ancestral de *Trichoderma* (Kubicek et al., 2011), aunque posteriormente colonizó las raíces de las plantas terrestres (Druzhinina et al., 2011), debido posiblemente a la gran cantidad de hongos fitopatógenos susceptibles de ser parasitados, y la variedad de compuestos secretados por las raíces de las plantas, como monosacáridos y disacáridos, que permitían su crecimiento en la rizosfera (Vargas et al., 2009; Rubio et al., 2012). Por tanto, el proceso de colonización requiere el reconocimiento y la capacidad de *Trichoderma* para adherirse a las raíces, la penetración en la planta, y tolerar las condiciones (ej. estrés oxidativo) y los metabolitos tóxicos (ej.: fenoles, fitoalexinas) generados por la planta en respuesta a la invasión (Hermosa et al., 2012; Khaledi & Taheri, 2016).

Varios trabajos indican que para que se lleve a cabo la interacción *Trichoderma*-planta, es necesario que se produzca una supresión parcial de las defensas (Morán-Díez et al., 2012; Brotman et al., 2013), al igual que se ha observado en otras asociaciones beneficiosas entre plantas y microorganismos (Herrera-Medina et al., 2003; López-Ráez et al., 2010; Jacobs et al., 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, así como resultados previos de nuestro grupo de investigación (Morán-Diez et al., 2012), que mostraban que después de la penetración de *Trichoderma* en los tejidos radicales se producía un descenso en los niveles de expresión de genes de defensa regulados por SA, tanto a nivel local como sistémico, el objetivo de este trabajo ha consistido en profundizar en el papel de esta fitohormona en la interacción *Trichoderma*-planta. Para ello hemos utilizado un transformante de *T. harzianum* (GFP22) que sobreexpresa la proteína verde fluorescente (GFP) y hemos analizado este proceso de interacción, en cultivo hidropónico, en plantas de arabidopsis de tipo silvestre (ecotipo Col-0) y un mutante afectado en la síntesis de SA (*sid2*); puesto que la ruta PAL es residual en arabidopsis (Wildermuth et al., 2001). Como era de esperar, *T. harzianum* GFP22 fue capaz de penetrar en la capa de células más externas de la raíz (epidermis y cortex) (Figura 1.16), de manera similar a lo observado en trabajos previos realizados en pepino y tomate (Yedidia et al., 1999; Chacón et al., 2007; Velázquez-Robledo et al., 2011), aunque no se observó

ningún tipo de colonización en el tejido vascular, detectándose la formación de estructuras levaduriformes en las hifas, indicativas de la detención del crecimiento micelar (Chacón et al., 2007; Samolski et al., 2012; Ruano-Rosa et al., 2016). Sin embargo, sí que se produjo colonización del tejido vascular en el mutante *sid2* que, como hemos comentado anteriormente, es incapaz de sintetizar SA; dicha invasión masiva de *Trichoderma* tuvo un efecto negativo en el crecimiento de la planta y terminó por colapsarla. Esta diferencia en el grado de colonización puede deberse a las diferencias que hemos observado en los niveles de deposición de calosa, la primera línea defensiva de la planta (Figura 1.18), lo que sugiere el importante papel que juega el SA en el proceso de refuerzo de la pared celular y en la limitación de la colonización de *Trichoderma* a las capas más externas de la raíz. Adicionalmente, cuando se utilizó una línea transgénica de arabidopsis que presentaba niveles muy elevados de SA endógeno (Alonso-Ramírez et al., 2009), los depósitos de calosa eran evidentes incluso en ausencia del hongo (datos no mostrados). De una manera similar, se ha descrito que líneas de arabidopsis incapaces de sintetizar o acumular SA presentaban niveles muy bajos de calosa, lo que permitía la multiplicación de bacterias patógenas (DebRoy et al., 2004). También se ha demostrado que la síntesis de calosa es necesaria para incrementar la resistencia de las células vegetales al ataque de patógenos (Ellinger et al., 2013). Por tanto, parece claro que *Trichoderma* tiene que evadir las respuestas defensivas de la planta durante las primeras fases de la interacción, aunque posteriormente una activación de estas defensas limitará el crecimiento de este hongo impidiendo su acceso al sistema vascular. Esta hipótesis se ve avalada por el hecho de que el grado de colonización de la raíz por este hongo beneficioso es mucho mayor en la línea mutante que en el tipo silvestre, lo que apoya el importante papel del SA en esta interacción (Figura 1.17). Nuestro resultado coincide con otros trabajos, donde se ha observado un grado de colonización mayor en el mutante *FMO1* de arabidopsis (afectado en el mecanismo de acción de SA) que en el correspondiente tipo silvestre tras la colonización con *T. asperelloides* (Brotman et al., 2013), o en diferentes mutantes deficientes en SA tras la colonización con *S. indica* (Jacobs et al., 2011).

Además de las barreras físicas, como la deposición de calosa, las plantas van a activar un complejo sistema inmune regulado por hormonas. Se sabe que *Trichoderma* es capaz de activar las rutas de señalización mediadas por JA/ET de una manera similar a la que provocan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) (Shoresh et al., 2010). Aunque se ha descrito que el SA y el JA son hormonas antagónicas (Thaler et al.,

2012), se ha demostrado que este hongo es capaz también de incrementar la acumulación de SA (Velázquez-Robledo et al., 2011), así como de inducir respuestas defensivas en la planta dependientes tanto de JA como de SA (Woo et al., 2006; Salas-Marina et al., 2011), dando lugar a una respuesta ondulante en la que una y otra fitohormona alternan sus máximos y mínimos niveles de expresión (Rubio et al., 2014). En el presente trabajo hemos observado que en raíces del tipo silvestre después de 72 h de la inoculación con *T. harzianum* se induce la expresión del gen *LOX1*, implicado en la biosíntesis de JA, así como del gen *PR-1*, implicado en el mecanismo de acción del SA (Figura 1.19). Aunque hay evidencias de que las respuestas defensivas son similares en las hojas y en las raíces (Jacobs et al., 2011), también se ha descrito que los patógenos activan respuestas específicas en la raíz (Millet et al., 2010), aunque se sabe muy poco sobre las respuestas inmunes en la raíz frente a microorganismos beneficiosos (Zamioudis & Pieterse, 2012) y particularmente frente a *Trichoderma* (Brotman et al., 2013). Por tanto, en este trabajo, hemos pretendido conocer mejor el papel del SA en las respuestas defensivas locales durante la interacción *Trichoderma*-planta. El incremento significativo en los niveles de expresión del gen *LOX1* inducidos por *T. harzianum* en el mutante *sid2*, es coherente con su incapacidad para sintetizar SA. Por otra parte, y dado que *Trichoderma* es capaz también de inducir las defensas a través de la ruta del JA (Tucci et al., 2011), el considerable crecimiento del hongo que se detecta en el mutante *sid2* puede también contribuir al incremento en genes implicados en la respuesta a esta hormona. De manera similar, se ha comprobado que se produce un incremento en la expresión de este tipo de genes en plantas de arabidopsis colonizadas por *T. asperelloides* (Brotman et al., 2013). También hemos observado que *T. harzianum* induce la acumulación de calosa en raíces de plantas del tipo silvestre, aunque el conocimiento sobre este complejo mecanismo de defensa en respuesta al ataque de patógenos todavía es muy escaso (Luna et al., 2011). Se sabe que la síntesis de calosa regula negativamente la ruta de señalización del SA (Nishimura et al., 2003); sin embargo, tras la colonización con *T. harzianum* hemos observado que después de 72 h de interacción entre el hongo y plantas del tipo silvestre se produce una inducción en los niveles de expresión del gen *CALS5*, implicado en la biosíntesis de calosa, al mismo tiempo que se observa un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis (*ICS1*) y con el mecanismo de acción del SA (*PR-1*). Estos datos sugieren que el SA desempeña un papel importante en la acumulación de calosa.

La inducción del gen *ICS1* en las raíces del mutante *sid2* colonizadas por el hongo indica que la planta necesitaría producir SA en respuesta a *T. harzianum*, como ocurre en el ecotipo Col-0. Sin embargo, y debido a la inserción de T-DNA en este gen en la línea mutada, la proteína correspondiente no sería funcional y, por lo tanto, la fitohormona no se sintetizaría.

Ha podido observarse como la falta de capacidad defensiva mediada por SA en el mutante *sid2* ha provocado la aparición de fenotipos aberrantes en el cultivo hidropónico (Figura 1.21 y 1.22), junto con la muerte de alguna de las plantas en condiciones de invernadero (Figura 1.20). A pesar de ello, otros autores no han observado estos fenotipos en el mutante tras ser colonizado por *T. hamatum* o *T. asperellum* en tierra (Segarra et al., 2009; Mathys et al., 2012). Pensamos que estas diferencias fenotípicas podrían deberse al cambio a un cultivo hidropónico, puesto que en tierra no siempre se observan los síntomas de muerte vegetal.

Estudios realizados con posterioridad a los mostrados en este capítulo, han llegado a las mismas conclusiones, realizando ensayos parecidos, con plantas de tomate (Fiorini et al., 2016) y con el mismo mutante de arabidopsis, corroborando nuestros resultados (Martínez-Medina et al., 2017). Además, otros estudios con otros hongos han coincidido en nuestras conclusiones, como es el caso del hongo endofítico *Clonostachys rosea* en tomate y *A. thaliana* (Álvarez-Nordström, 2014) o *T. virens*, también en maíz (Morán-Díez et al., 2015). E incluso se han llegado a describir posibles compuestos liberados por *Trichoderma* que van a activar la defensa mediada por SA e impedir la colonización vascular, como sucede con los terpenos trichodermol (Cardoza et al., 2015) y escualeno (Malmierca et al., 2015), pudiendo el hongo controlar también la respuesta de las plantas frente a condiciones ambientales adversas gracias a esta activación hormonal (Timmusk et al., 2015).

CAPÍTULO II

El gen *ThKel1* de *Trichoderma harzianum* como herramienta en Biotecnología Vegetal

INTRODUCCIÓN

1.- EL GEN *Thkel1* DE *Trichoderma*

El gen *Thkel1* de *T. harzianum* T34 codifica para una proteína con dominios kelch [demoninada así porque este tipo de proteínas se descubrió en un mutante de la mosca del vinagre conocido como *kelch* (Xue & Cooley, 1993)], característica exclusiva de eucariotas, al igual que las proteínas de unión a mirosinasa (MBPs) (Hermosa et al., 2011a). Esta familia de proteínas MBP modifica la hidrólisis de glucosinolatos, lo que conlleva a la formación de nitrilos y epitionitrilos en vez de isotiocianatos tóxicos (Wittstock & Burow, 2007), además de la formación de complejos con otras β-glucosidasas, desempeñando un papel crucial en las respuestas de las plantas a estreses abióticos (Minic, 2008) y bióticos (Grubb et al., 2006). En este sentido, se han identificado seis genes en arabidopsis que codifican proteínas con dominios kelch (Burow et al., 2009). Por lo tanto, la presencia de estos dominios sugiere que el gen *Thkel1* podría desempeñar un papel en el sistema glucosidasa-sustrato (Hermosa et al., 2011a).

Las proteínas que contienen dominios kelch tienen funciones en la comunicación y morfología celular, la expresión génica, la unión a actina, además de ser susceptibles de secuestro por virus después de la infección (Dhanoa et al., 2013; Zhang et al., 2013). Los dominios kelch están muy conservados evolutivamente, con 44-56 residuos de aminoácidos y cuatro residuos hidrofóbicos seguidos de una glicina y dos aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano) (Figura 2.1). Se requiere de cuatro hojas β antiparalelas para formar un único motivo de kelch, cuya asociación con otros motivos iguales dará como resultado una hélice-β que servirá como andamio para interacciones proteína-proteína (Hassan, et al., 2015).

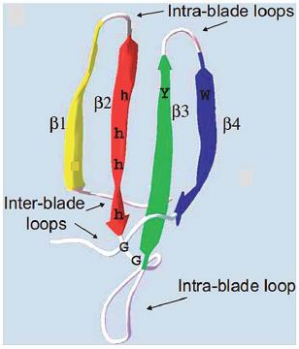


Figura 2.1: Un motivo típico de kelch con cuatro hojas β, bucles y residuos conservados. Extraído de Hassan et al. (2015).

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se analizó la expresión del gen *Thkel1* de *T. harzianum* y pudo observarse que los niveles más altos se obtenían a 4ºC y con un 10% de NaCl en el medio, mientras que al añadir glucosa, ésta actuaba como represor catabólico. Además, se transformaron plantas de *A. thaliana* con este gen fúngico, obteniéndose plantas transgénicas con mayores porcentajes de germinación en presencia de NaCl o manitol que en el ecotipo silvestre (Col-0), confirmándose una mayor actividad β-glucosidasa en las últimas etapas de desarrollo de las plantas que expresaban *Thkel1*, y una mayor tolerancia al estrés salino, demostrativo de una mejor respuesta de la planta frente a estreses abióticos (Hermosa et al., 2011a).

Las β-glucosidasas juegan un papel fundamental en muchos procesos fisiológicos en plantas (defensa, síntesis de la cadena de β-glucano, metabolismo de la pared celular, lignificación, activación de fitohormonas, metabolismo secundario y maduración del fruto); en mamíferos (hidrólisis de glucosilo-ceramidas), causando su déficit en humanos la enfermedad de Gaucher; y en microorganismos (hidrólisis de la celulosa y ciclo del carbono). El mecanismo de acción de estas enzimas se basa en la ruptura de los enlaces β-D-glucosídicos presentes en gran cantidad de sustratos muy diferentes, liberando glucosa como producto final (Tramontina et al., 2015; Weiss et al., 2015; Adetunji et al., 2017; Ahmed et al., 2017; Singhania et al., 2017).

Investigaciones más recientes han partido de la premisa de que genes que codifican proteínas con dominios kelch, como el *Thkel1* de *T. harzianum*, mejoran la tolerancia de las plantas frente a estreses abióticos y bióticos, al estar presentes en cepas de *Trichoderma* con las que se inoculan, reduciendo la fitotoxicidad inducida por arsénico (Tripathi et al., 2013), los efectos del estrés salino en plántulas de maíz (Fu et al., 2017) o actuando contra fitopatógenos del tomate (Rai, 2017).

2.- LA COLZA (*B. napus*)

La colza (*B. napus*) es una planta de la familia de las crucíferas, herbácea y anual, cuyas semillas oleaginosas son utilizadas con la finalidad de extraer aceite, por lo que su variedad cultivada es la *oleifera*. Presenta un tallo erecto que puede llegar a alcanzar los 2 m de altura, unas hojas superiores acorazonadas y abrazadoras, e inferiores lobuladas y pecioladas, todas ellas color verde algo azulado, y una estructura radicular con raíz pivotante y raíces secundarias muy ramificadas. Las flores son bisexuales, con 6 estambres, de color amarillo

y agrupadas en racimos terminales, y los frutos están formados por silicuas inferiores a los 10 cm de longitud, con dos suturas y una lámina intermedia de separación, llegando a albergar hasta 25 semillas esféricas de hasta 2,5 mm de diámetro y de color negro (de León et al., 1978; Provedo & Díez-Antolínez, 2006; Imaz, 2012; Lin et al., 2012; Arrua et al., 2017).

El lugar de origen de *B. napus* no es totalmente certero, pero se considera que se sitúa en la Europa mediterránea, hace unos 10.000 años, resultado de varios eventos de hibridación independientes entre *B. rapa* y *B. oleracea*, dando como resultado un anfiploide (Von Mark & Dierig, 2014; Sun et al., 2017).

El ciclo vegetativo de la colza incluye la nascencia, la formación de la roseta, el entallado, la floración, y la formación y maduración del fruto. Su mejor crecimiento ocurre por encima de 12ºC y por debajo de 30ºC, siendo su temperatura óptima 21-25ºC. Para su cultivo se requieren 325-700 mm de precipitación anual y un pH entre 6,2 y 7,7 (Provedo & Díez-Antolínez, 2006; Sun et al., 2017).

La diferencia principal de la variedad cultivada frente a las silvestres es su bajo contenido en ácido erúcico (< 2%) y glucosinolatos (< 30 mmol/g fresco de semilla), que impide la utilización del aceite de las otras variedades. Derivado de diversas modificaciones conseguidas por mejora genética en este cultivo en Canadá, pasó a denominarse en 1974 Canola (Canadian Oil Low Acid), momento en el cual su cultivo se extendió por todo el mundo (Imaz, 2012; Borpatragohain et al., 2016; Gazzoni & Dall'Agnol, 2016; Tauseef et al., 2017)

2.1.- Producción

A nivel mundial, el aceite de colza representa el tercer mayor recurso en lo que a aceite comestible se refiere (el 15% del total), por detrás de los aceites de soja y palma, siendo el segundo en producción de oleaginosas, con 67 millones de toneladas en el año 2016, por detrás de la soja con 330 millones de toneladas (Figura 2.2). El ranking de producción mundial lo lidera la Unión Europea (UE), con el 26% del cultivo, seguida por China (20,2%), India (11,3%), Canadá (9,3%) y Japón (6,6%). De acuerdo con el Consejo de la Canola de Canada, se estima que para el año 2025 la demanda mundial de aceite de colza subirá un 67%, hasta los 250 millones de toneladas (Fu, et al., 2016; MAPAMA, 2017; Tauseef et al., 2017).

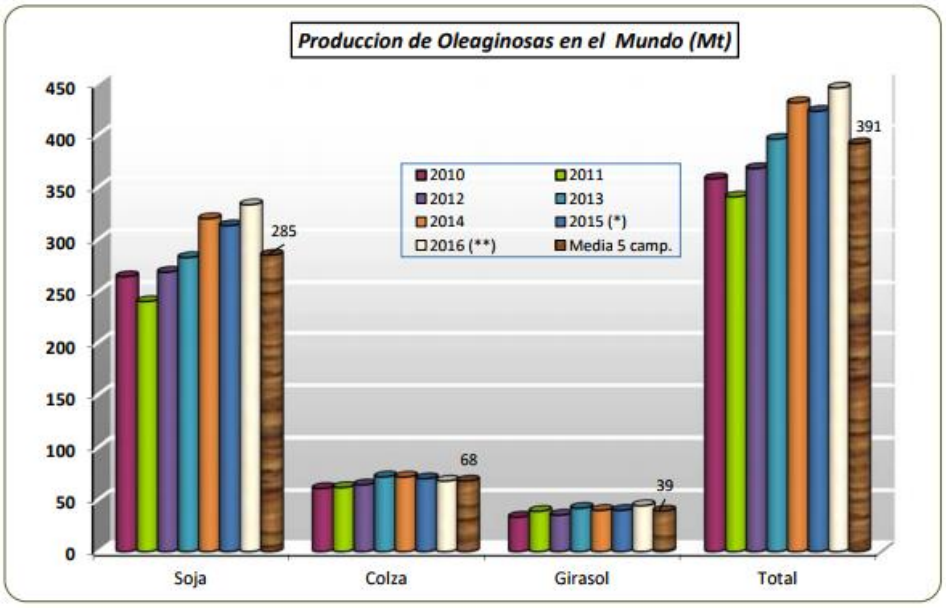
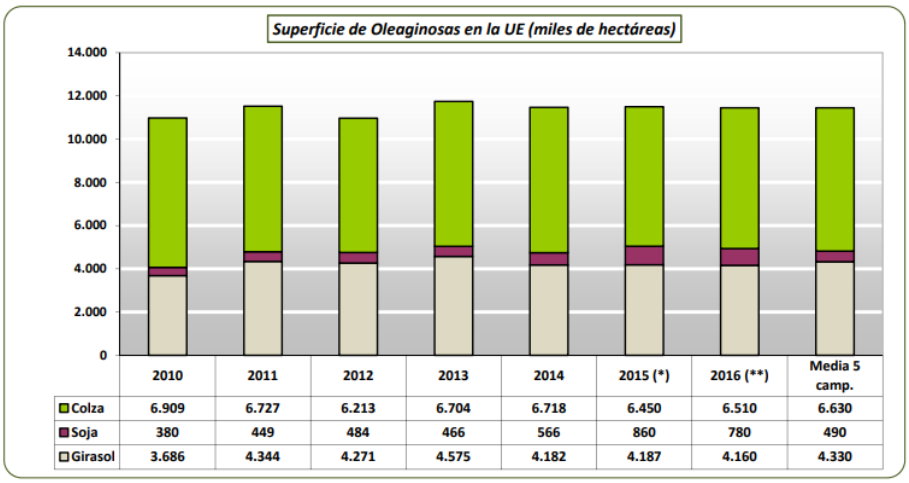
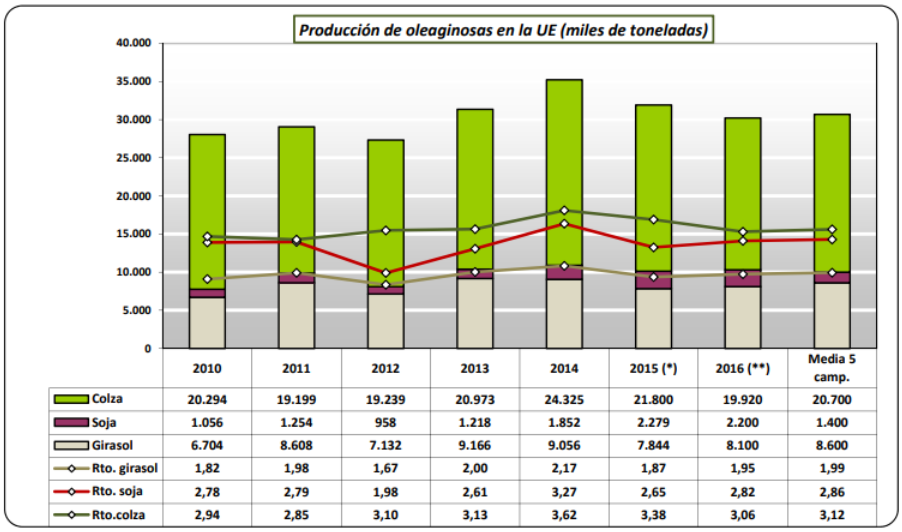


Figura 2.2: Producción de oleaginosas en el mundo. Extraído de MAPAMA (2017).

La colza es la oleaginosa más cultivada en la UE, con una superficie en el año 2016 de unas 6 millones y medio de hectáreas y una producción de más de 21 millones de toneladas, frente a los 4 millones de hectáreas de girasol y 7 millones y medio de toneladas producidas, siguiente cultivo en importancia (Figura 2.3) (MAPAMA, 2017). En España, la colza comenzó a cultivarse en Andalucía en los años 60, extendiéndose por gran cantidad del territorio peninsular, hasta la llegada del "síndrome tóxico" o del "aceite de colza" (1981) que lo desprestigió, no recuperándose hasta la década de los 90 (Imaz, 2012). En el año 2015, la superficie sembrada de colza en España fue de más de 68 mil hectáreas, con una producción de 144 miles de toneladas, muy por debajo de las casi 730 mil hectáreas de girasol, con una producción de más de 690 mil toneladas (Figura 2.4). A nivel autonómico, la comunidad que más oleaginosas produce es Castilla y León (41%), seguida muy de cerca por Andalucía (38%) y mucho más lejos quedan Castilla la Mancha (13%) y Extremadura (4%) (Figura 2.5) (MAPAMA, 2017).

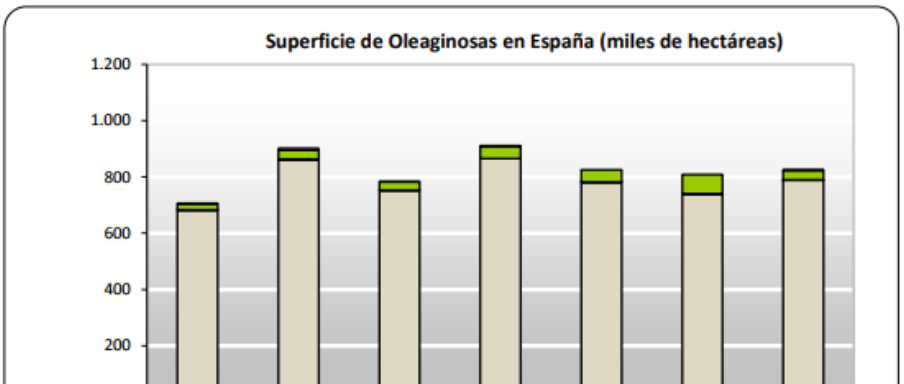


	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (*)	2016 (**)	Media 5 camp.
Colza	6.909	6.727	6.213	6.704	6.718	6.450	6.510	6.630
Soja	380	449	484	466	566	860	780	490
Girasol	3.686	4.344	4.271	4.575	4.182	4.187	4.160	4.330

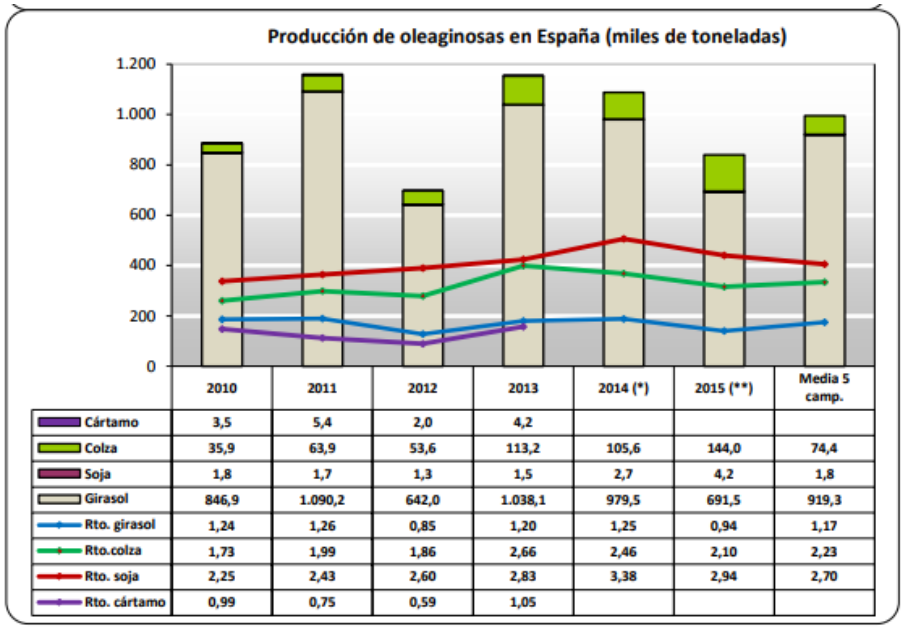


	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (*)	2016 (**)	Media 5 camp.
Colza	20.294	19.199	19.239	20.973	24.325	21.800	19.920	20.700
Soja	1.056	1.254	958	1.218	1.852	2.279	2.200	1.400
Girasol	6.704	8.608	7.132	9.166	9.056	7.844	8.100	8.600
Rto. girasol	1,82	1,98	1,67	2,00	2,17	1,87	1,95	1,99
Rto. soja	2,78	2,79	1,98	2,61	3,27	2,65	2,82	2,86
Rto.colza	2,94	2,85	3,10	3,13	3,62	3,38	3,06	3,12

Figura 2.3: Superficie (en miles de hectáreas) y producción (en miles de toneladas) de oleaginosas en la UE. Extraído de MAPAMA (2017).



	2010	2011	2012	2013	2014 (*)	2015 (**)	Media 5 camp.
Cártamo	3,57	7,25	3,31	4,01			4,53
Colza	20,70	32,10	28,80	42,50	43,00	68,44	33,42
Soja	0,80	0,70	0,50	0,53	0,80	1,43	0,67
Girasol	682,50	862,90	753,00	865,60	781,40	739,26	789,08



	2010	2011	2012	2013	2014 (*)	2015 (**)	Media 5 camp.
Cártamo	3,5	5,4	2,0	4,2			
Colza	35,9	63,9	53,6	113,2	105,6	144,0	74,4
Soja	1,8	1,7	1,3	1,5	2,7	4,2	1,8
Girasol	846,9	1.090,2	642,0	1.038,1	979,5	691,5	919,3
Rto. girasol	1,24	1,26	0,85	1,20	1,25	0,94	1,17
Rto.colza	1,73	1,99	1,86	2,66	2,46	2,10	2,23
Rto. soja	2,25	2,43	2,60	2,83	3,38	2,94	2,70
Rto. cártamo	0,99	0,75	0,59	1,05			

Figura 2.4: Superficie (en miles de hectáreas) y producción (en miles de toneladas) de oleaginosas en España. Extraído de MAPAMA (2017).

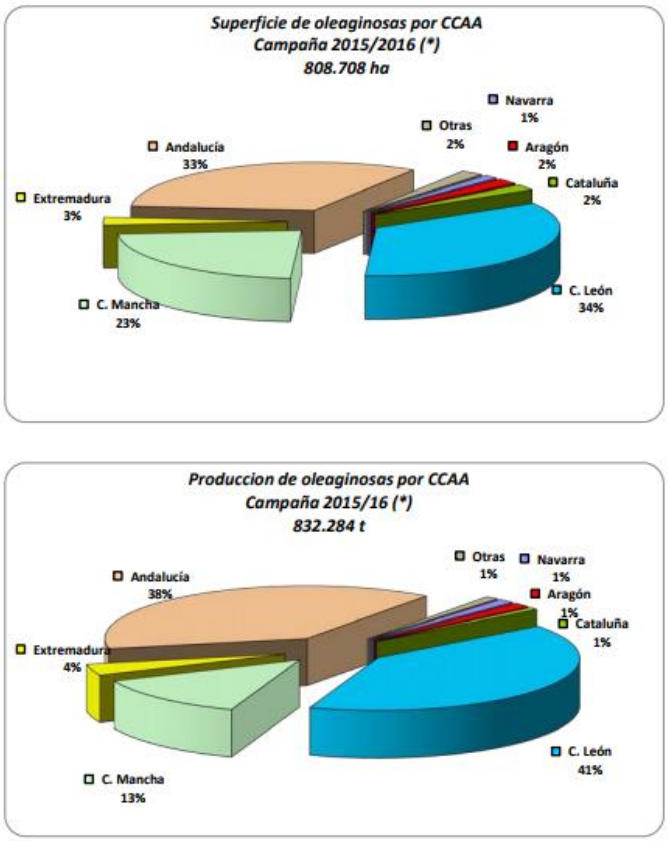


Figura 2.5: Superficie (en miles de hectáreas) y producción (en miles de toneladas) de oleaginosas en España, por comunidades autónomas. Extraído de MAPAMA (2017).

2.2.- Aceite y otros productos

Debido al elevado contenido en ácido erúcico de los aceites obtenidos a partir de la colza antes de las mejoras realizadas en Canadá, su principal aplicación convencional siempre fue como lubricante industrial. Este ácido graso monoinsaturado (22:1 n-9) puede ser perjudicial para la salud, al contribuir en la formación de depósitos grasos en el corazón. A nivel nutricional, el aceite de colza presenta un predominio en ácidos grasos insaturados como el oleico (61%) y poliinsaturados linoleicos (21%) (6% de ácido ω-3 α-linoleico y 15% de ácido ω-6 linoleico) y linolénico (11%), a la vez que bajos niveles de ácidos grasos saturados como el palmítico (4%). Esto hace que el aceite de colza sea muy sensible a la oxidación y sea necesario hidrogenar parte de este aceite, para reducir la producción de olores desagradables durante la fritura. Además, su composición por 100 g incluye un aporte de 884 Kcal, 100 g de lípidos, de los cuales ninguno es colesterol, y 17.46 mg de vitamina E (Fu et al., 2016; Gazzoni & Dall'Agnol, 2016; Khansili & Rattu, 2017).

Por otro lado, este aceite representa una materia prima excelente para la elaboración de biodiesel, ya que las semillas de colza contienen hasta un 40% de su peso en contenido oleico, produciendo gran cantidad de lípidos por metro cuadrado de terreno. El biodiesel obtenido de este aceite tiene un punto de enturbiamiento (indicativo de su tendencia a obstruir filtros) y de fluidez (temperatura a la cual el líquido pasa a semisólido) menor que el obtenido a partir de aceite de soja, haciéndolo mejor candidato para su uso en regiones frías. Sin embargo, un aumento significativo de este aceite para la fabricación de biodiesel podría provocar una fuerte presión sobre su demanda alimenticia, aumentando su precio. No obstante, las tecnologías industriales de producción de este tipo de combustible están aún en desarrollo (Fu et al., 2016).

La harina obtenida de las semillas, una vez se ha extraído el aceite, representa un componente importante en las formulaciones de diferentes piensos, debido a su elevado contenido proteico con una composición balanceada de aminoácidos, su contenido de ácidos grasos poliinsaturados presentes en los aceites residuales, y su significativa cantidad de minerales y vitaminas. A pesar de ello, la inclusión de este tipo de harina en la dieta de animales monogástricos presenta algún inconveniente derivado de su alto contenido en polisacáridos no digeribles y sustancias no nutritivas, como los glucosinolatos, los fitatos o diferentes compuestos fenólicos (Bojanowska, 2017; Le et al., 2017; Mejicanos et al., 2017).

HIPÓTESIS

El gen *Thkel1* de *T. harzianum* juega un papel importante en la capacidad del hongo para tolerar estreses de carácter abiótico gracias, seguramente, a un aumento en la actividad β-glucosidasa. La transformación de plantas de *A. thaliana* con *Thkel1* propició mayor tolerancia frente a estrés salino, a la vez que aumentó la actividad de dicha enzima. Continuando con la investigación comenzada con *A. thaliana*, pensamos que estas plantas transgénicas tendrán, a su vez, una mayor resistencia frente a estreses bióticos, al estar también implicadas las β-glucosidasas. Con las premisas indicadas, nos planteamos la posibilidad de obtener las mismas ventajas en un cultivo de interés agronómico como la colza (*B. napus*), planta cercana a arabidopsis, esperando obtener los mismos resultados mediante la introducción del gen en su genoma. Además, *Thkel1* también podría jugar un papel importante en la capacidad de colonización radicular por parte del hongo, al modificar la actividad de otras enzimas.

OBJETIVOS

1. Comprobar la capacidad de las plantas de *A. thaliana* y *B. napus* transformadas con el gen *Thkel1* para enfrentarse a estreses abióticos y bióticos.
2. Determinar qué ventajas le aporta el gen *Thkel1* a estas plantas.
3. Analizar el papel del gen *Thkel1* en la capacidad de colonización radicular por parte de *Trichoderma*.

RESULTADOS

1.- PLANTAS DE *A. thaliana* QUE EXPRESAN EL GEN *Thkel1* DE *T. harzianum*

Para el estudio de los beneficios que el gen *Thkel1* podría aportar a plantas de arabidopsis, se utilizó una línea con dos copias del transcrito, que se denominó Kel2.

1.1.- Productividad de plantas Kel2 en condiciones de invernadero

La primera característica a evaluar en la línea transgénica de arabidopsis Kel2 fue la capacidad para formar silicuas, relacionada con las mejoras que la presencia del gen *Thkel1* puede aportarle a la planta en su crecimiento, desarrollo y productividad de semillas, frente al ecotipo silvestre. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero según se describe en el apartado 2 de Materiales y Métodos.

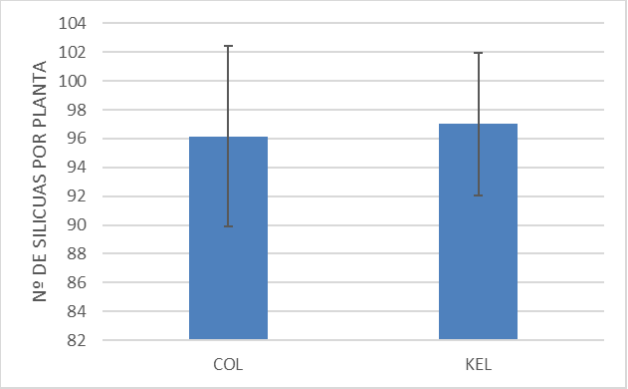


Figura 2.6: Número de silicuas producidas por planta de arabidopsis. Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta, Col-0 (COL) o Kel2 (KEL). Los valores representan la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el *t*-test.

A la vista de la figura 2.6, queda claro que en condiciones controladas de invernadero no existen diferencias significativas entre el ecotipo silvestre Col-0 y la línea transgénica Kel2.

1.2.- Productividad de plantas Kel2 frente a estrés salino

El siguiente paso fue evaluar las posibles diferencias que la presencia del gen podría aportarle a la línea transgénica en lo referente a la productividad de silicuas en respuesta a estrés salino, pues Hermosa et al. (2011a) ya habían observado una mejor respuesta de estas plantas en germinación, además de un aumento de su expresión en *T. harzianum* cuando se sometió a este tipo de estrés. El sometimiento de las plantas a estrés salino se llevó a cabo como se describe en el apartado 11.1 de Materiales y Métodos.

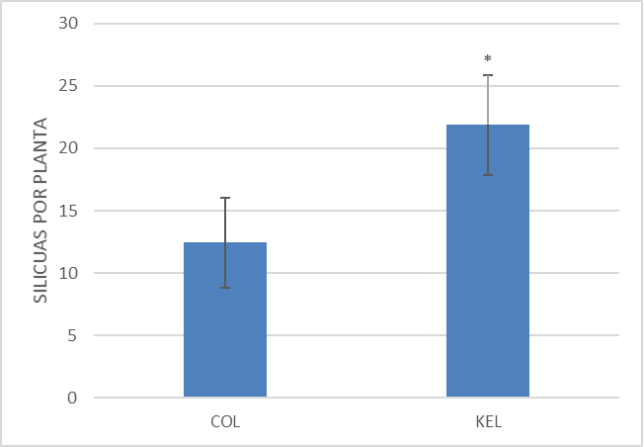


Figura 2.7: Número de silicuas producidas por planta de arabidopsis en presencia de estrés salino (NaCl 200 mM). Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta, Col-0 (COL) o Kel2 (KEL). Los valores representan la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Las diferencias de productividad se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

La figura 2.7 muestra que la presencia del gen *Thkel1* en arabidopsis proporciona a la planta una ventaja competitiva frente al ecotipo silvestre en situación de estrés salino, no sólo a nivel de germinación sino también de capacidad formadora de silicuas.

1.3.- Respuesta de plantas Kel2 frente a estrés biótico

Con el fin de analizar en plantas Kel2 la capacidad de respuesta frente a estrés biótico, por activación de un posible "priming" frente a patógenos, realizamos el análisis de la expresión génica, a nivel radicular y foliar, de diferentes genes relacionados con la síntesis y respuesta de hormonas vegetales de las dos principales rutas de defensa (SA y JA/ET), junto con ensayos de inoculación *in vitro* del patógeno *B. cinerea* a nivel foliar.

1.3.1.- Expresión de genes de defensa en plantas Kel2

El estudio de expresión de genes marcadores de respuestas de defensa se realizó mediante RT-qPCR de ADNc, tal y como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos, mientras que los genes seleccionados fueron los descritos en el apartado 4.6.3, identificándose según las abreviaturas: *ICS1* (isocorismato sintasa 1), *PR1* (proteína relacionada con la patogénesis 1), *LOX* (lipooxigenasa) y *VSP2* (proteína de almacenamiento vegetativo).

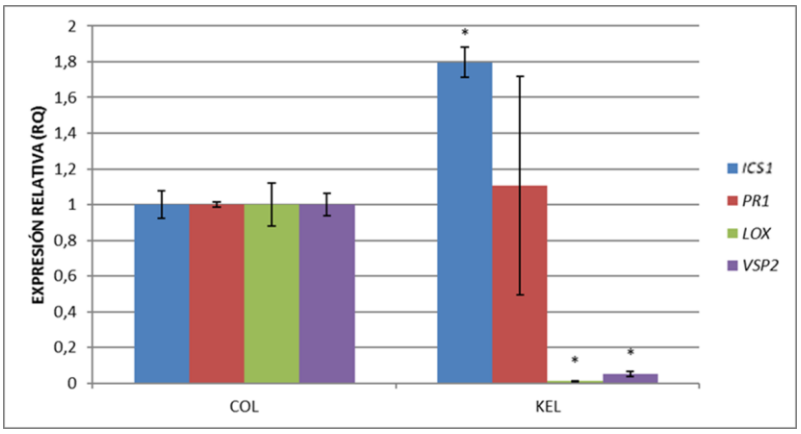


Figura 2.8: Expresión relativa de genes de defensa en raíces de arabidopsis. Las muestras se tomaron justo antes de la formación de los primordios florales. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión se normalizaron respecto del valor obtenido para cada gen en el ecotipo silvestre Col-0. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes de Col-0 (COL) o Kel2 (KEL). y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre ambos tipos de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

El análisis de expresión génica a nivel radicular (Figura 2.8) muestra un claro aumento en la ruta del SA en Kel2, mientras que con JA ocurre el efecto contrario, con una enorme reducción en la expresión de sus genes de síntesis y de respuesta a esta fitohormona.

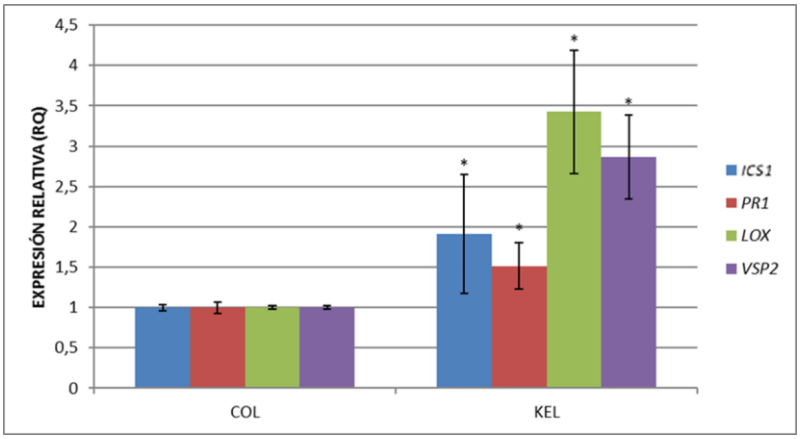


Figura 2.9: Expresión relativa de genes de defensa en hojas de arabidopsis. Las muestras se tomaron justo antes de la formación de los primordios florales. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión se normalizaron respecto del valor obtenido para cada gen en el ecotipo silvestre Col-0. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes de Col-0 (COL) o Kel2 (KEL) y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre ambos tipos de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

A nivel foliar (Figura 2.9), ambas rutas defensivas se ven activadas en Kel2, tanto a nivel de síntesis de fitohormonas como de respuesta a las mismas.

De forma similar a los análisis anteriores de expresión génica, se llevó a cabo el mismo estudio a nivel foliar, cuando las hojas se infectaron con *B. cinerea in planta*.

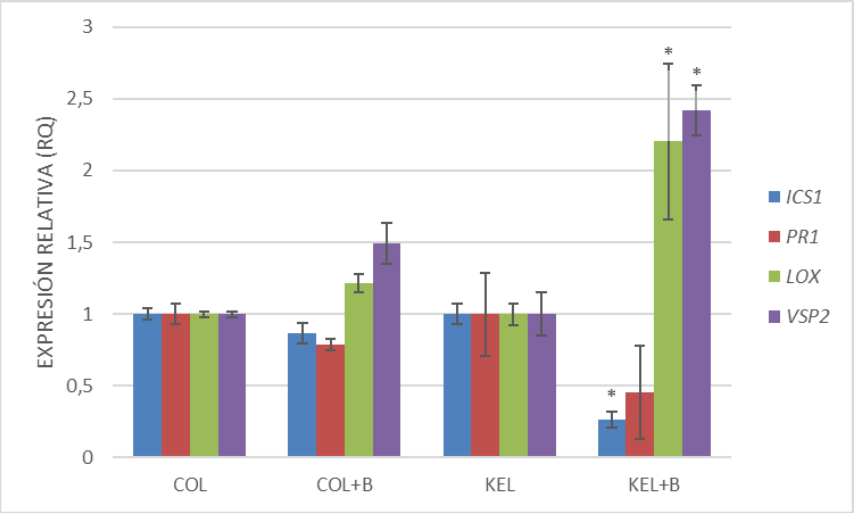


Figura 2.10: Expresión relativa de genes de defensa en hojas de arabidopsis. Las muestras se tomaron 120 h después de la infección con *B. cinerea*. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor obtenido para cada gen en el ecotipo silvestre Col-0 (COL) o de la línea transgénica Kel2 (KEL). Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre ambos tipos de plantas infectadas con *B. cinerea* (COL+B y KEL+B) se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

A la vista de la gráfica de expresión (Figura 2.10), la respuesta de plantas Kel2 es mucho más eficaz frente al ataque de *B. cinerea* y, como cabría esperar al tratarse de un patógeno necrotrofo, se observó aumento significativo de la expresión de los genes de la ruta dependendiente de JA y disminución de la de SA.

1.3.2.- Patogenicidad *in vitro*

Para determinar el efecto que el gen *Thkel1* podría tener como activador de las defensas frente a patógenos, se realizó una inoculación foliar con *B. cinerea in vitro*, tal y como se describe en el apartado 3.6.1 de Materiales y Métodos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos a 80 y 130 h después de la inoculación, según los porcentajes de los diámetros de cada lesión foliar (Figura 2.11), junto con fotografías representativas del ensayo (Figura 2.12).

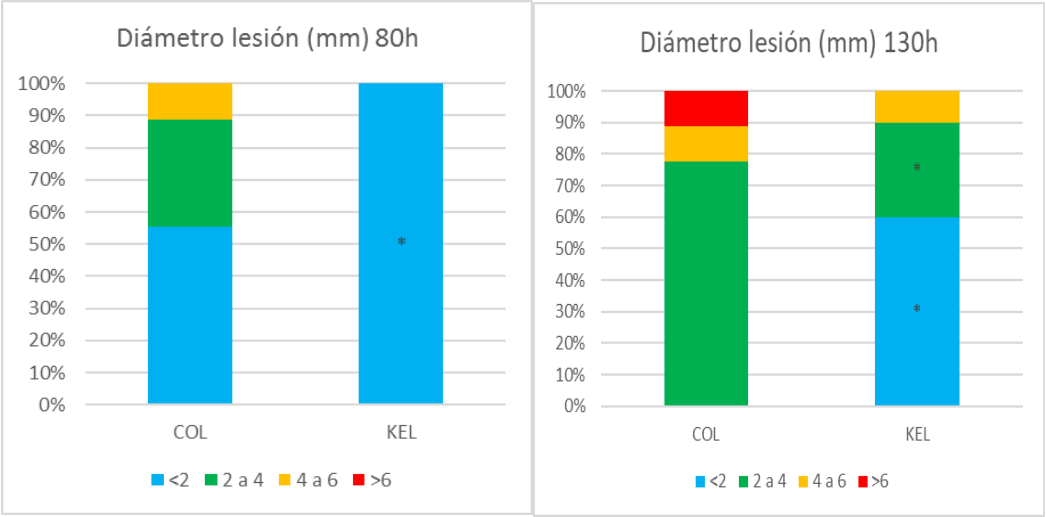


Figura 2.11: Porcentajes de los diámetros de lesión (en mm) provocados por *B. cinerea* en hojas de arabidopsis. A 80 h (izquierda) y 130 h (derecha) después de la inoculación del patógeno. Las columnas muestran los porcentajes de los grupos de diámetros de las lesiones de 30 hojas obtenidas a partir de 15 réplicas biológicas independientes de plantas Col-0 (COL) y Kel2 (KEL). Las diferencias significativas (*) ($P < 0,05$) se obtuvieron mediante el test no paramétrico de Friedman.

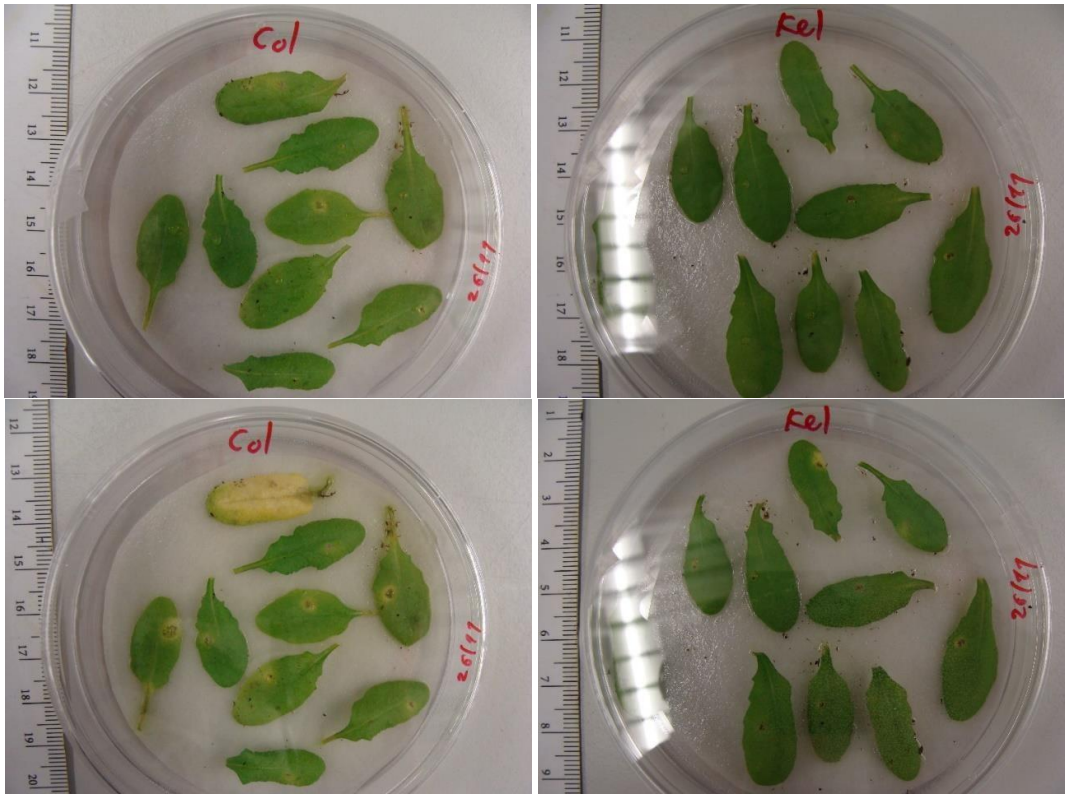


Figura 2.12: Lesiones producidas por *B. cinerea* en hojas de arabidopsis. Fotografías del ecotipo silvestre Col-0 (izquierda) y de la línea transgénica Kel2 (derecha), a 80 h (arriba) y 130 h (debajo) después de la inoculación.

Los datos de medidas de lesiones foliares indican que en el ecotipo silvestre el hongo fitopatógeno provoca el daño que cabría esperar, mientras que la presencia del gen *Thkel1* en la planta de arabidopsis reduce significativamente el daño producido por el hongo en las hojas.

1.3.3.- Patogenicidad *in planta*

También se realizó la misma infección fúngica *in planta*, obteniéndose los resultados representados en las figuras 2.13 y 2.14, que fueron similares a los del ensayo *in vitro*.

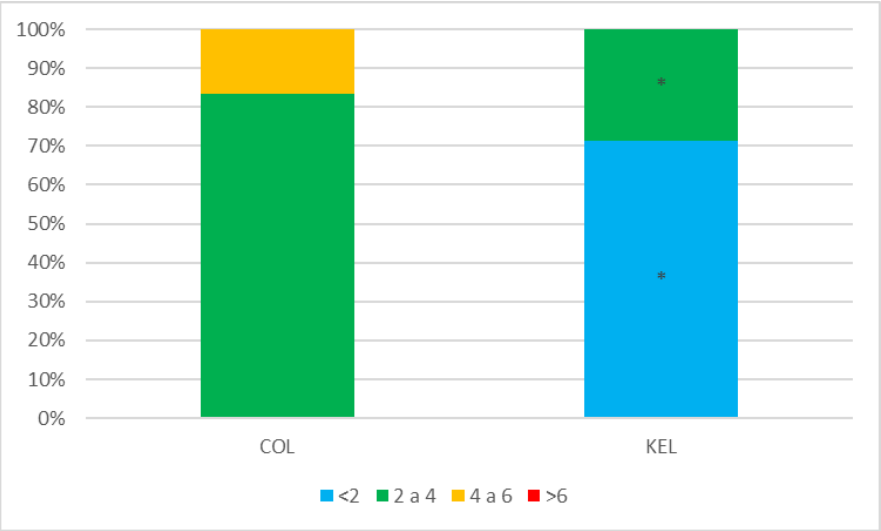


Figura 2.13: Porcentajes de los diámetros de lesión (en mm) provocados por *B. cinerea* en hojas de arabidopsis. Las columnas muestran los porcentajes de los grupos de diámetros de las lesiones de 30 hojas obtenidas a partir de 15 réplicas biológicas independientes, después de 120 h de inocular el patógeno. Las diferencias significativas (*) (P < 0,05) se obtuvieron mediante el test no paramétrico de Friedman.

Figura 2.14: Lesiones producidas por *B. cinerea* en hojas de arabidopsis. Hojas del ecotipo silvestre Col-0 (izquierda) y de la línea transgénica Kel2 (derecha), 120 h tras la inoculación.

1.4.- Interacción con *Trichoderma*

Al haber transformado plantas de arabidopsis con un gen de *T. harzianum*, decidimos realizar diferentes ensayos de interacción con el hongo y comprobar las posibles diferencias que pudiera haber con el ecotipo silvestre.

1.4.1.- Colonización radicular *in vitro*

Realizamos el estudio de colonización radicular de *T. harzianum* T34 mediante la metodología de cultivo hidropónico *in vitro* desarrollada en nuestro grupo de investigación, tal y como se describe en los apartados 2.1 y 3.4 de Materiales y Métodos, donde también se encuentra descrita, en el apartado 4.6.5., la metodología para la cuantificación de la colonización.

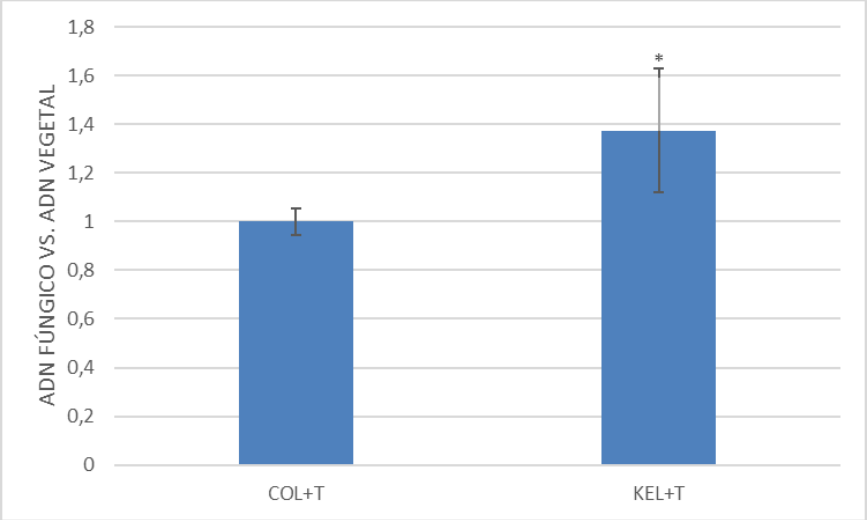


Figura 2.15: Colonización radicular de plantas de arabidopsis Col-0 y Kel2 por *T. harzianum* T34 en cultivo hidropónico. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, 7 días tras la inoculación con *T. harzianum* (T), y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de arabidopsis). Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el ecotipo silvestre (gen de la actina de *Trichoderma*), con un valor arbitrario de 1. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes de Col-0 (COL) o Kel2 (KEL) y las barras su desviación estándar. Las diferencias de colonización entre ambos tipos de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

En la figura 2.15 se muestra claramente el aumento en la colonización radicular por *T. harzianum* cuando la planta expresa el gen *Thkel1*, pudiendo ser un gen importante en esta interacción.

Con el fin de determinar la existencia de posibles respuestas defensivas diferentes en ambos tipos de plantas, que expliquen esta diferencia en la colonización radicular, se recogieron muestras de raíces en el cultivo hidropónico, a las cuales se les realizó el estudio de expresión de genes de defensa, tal y como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.

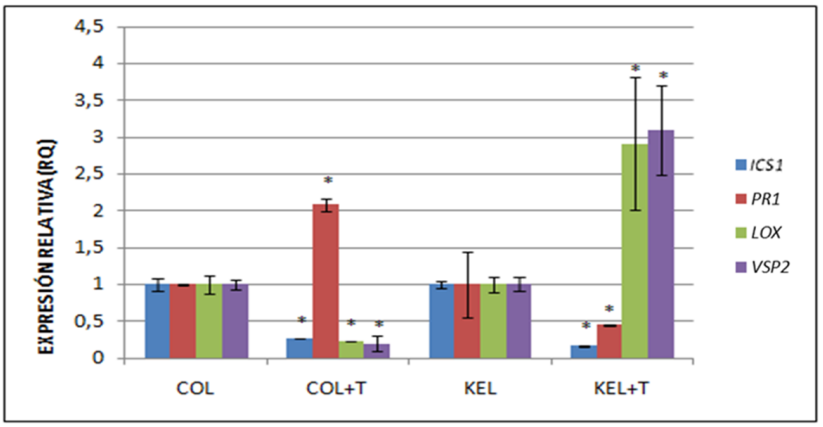


Figura 2.16: Expresión relativa de genes de defensa en raíces de arabidopsis en cultivo hidropónico con *T. harzianum* T34. Las muestras se tomaron 7 días tras la inoculación con el hongo. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina de arabidopsis. Las variaciones de expresión se normalizaron respecto del valor obtenido para cada gen en los diferentes tipos de plantas sin el hongo. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes de Col-0 (COL) o Kel2 (KEL) y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión en cada uno de los genes entre las plantas con y sin el hongo se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

Después de 7 días tras la inoculación con *T. harzianum* puede observarse en la figura 2.16 cómo ocurre en el ecotipo silvestre un aumento significativo en la expresión del gen *PR1* de respuesta a SA, junto con una disminución en la expresión de los genes relacionados con el JA. Además, ocurre exactamente lo contrario en la línea transgénica, pues aumenta significativamente la expresión de los genes relacionados con JA y se produce una disminución en la expresión de los genes de su ruta antagónica.

1.4.2.- Productividad en invernadero

Para comprobar si las diferencias de colonización se reflejaban en un aumento en la productividad de silicuas por parte de la línea Kel2, se inculó *T. harzinaum* T34 al sustrato de las plantas, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

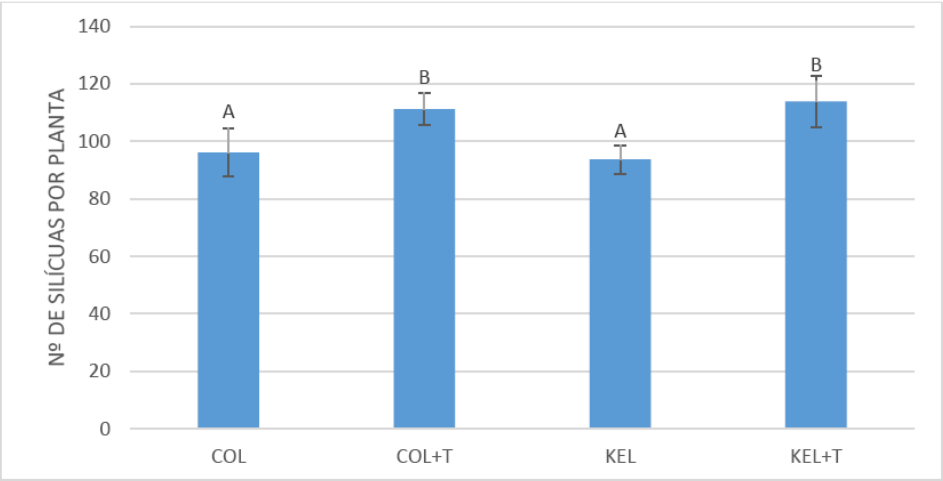


Figura 2.17: Número de silicuas producidas por plantas de arabidopsis. Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Los valores representan la media de 15 plantas de Col-0 (COL) o Kel2 (KEL), colonizadas con *T. harzianum* T34 (T), o no, junto con su desviación estándar en forma de barra. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.17), pudimos observar que, al igual que nos ocurría entre el ecotipo silvestre y la línea transgénica sin *T. harzianum*, no había diferencias significativas entre ambos tipos de plantas inoculadas con el hongo, aunque, por supuesto, se observó el aumento significativo en la productividad de silicuas que cabía esperar tras la inoculación con *T. harzianum*.

1.4.3.- Interacción con *T. parareesei*

A la vista de los resultados obtenidos con *T. harzianum*, decidimos comprobar si ocurría lo mismo con otra especie de *Trichoderma* diferente y para ello seleccionamos *T. parareesei*, pués carece de genes homólogos a *Thkel1*, al contrario de lo que sucede en *T. virens* (Kubiceck et al., 2011).

1.4.3.1.- Colonización radicular

Realizamos el estudio de colonización radicular por *T. parareesei* (cepa T6) en sustrato y condiciones de invernadero, tal cual se describe en el apartado 4.6.5 de Materiales y Métodos, incluyendo en el ensayo la inoculación con *T. harzianum* (T34) y realizando la cuantificación de la colonización de la misma manera que en el apartado 1.4.1 de esta misma sección de Resultados.

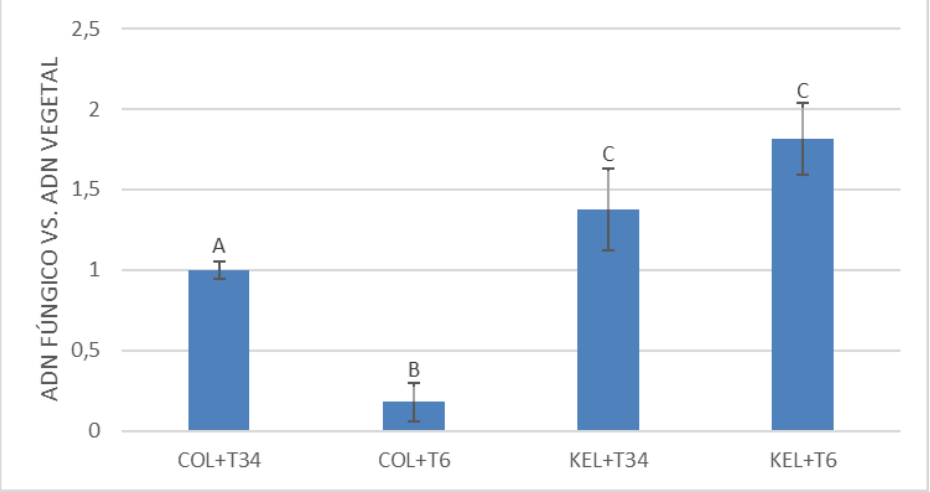


Figura 2.18: Colonización radicular de plantas de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) por *T. harzianum* (T34) y *T. parareesei* (T6) en invernadero. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de arabidopsis). La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación del tallo floral. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el ecotipo silvestre inoculado con T34 (gen de la actina de *Trichoderma* spp.), con un valor arbitrario de 1. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

La figura 2.18 muestra como la colonización del ecotipo silvestre por *T. parareesei* es menor que la conseguida con *T. harzianum*. Por otro lado, en la línea transgénica esta colonización se ve muy favorecida en el caso de ambos hongos, como ya se había observado con *T. harzianum*.

1.4.3.2.- Genes de defensa

Con el fin de determinar si las diferencias en la colonización radicular observadas con *T. parareesei* podían ser causadas por la diferente respuesta defensiva de las raíces, se llevó a cabo un estudio de expresión de genes de defensa a diferentes muestras de raíces, tal y como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.

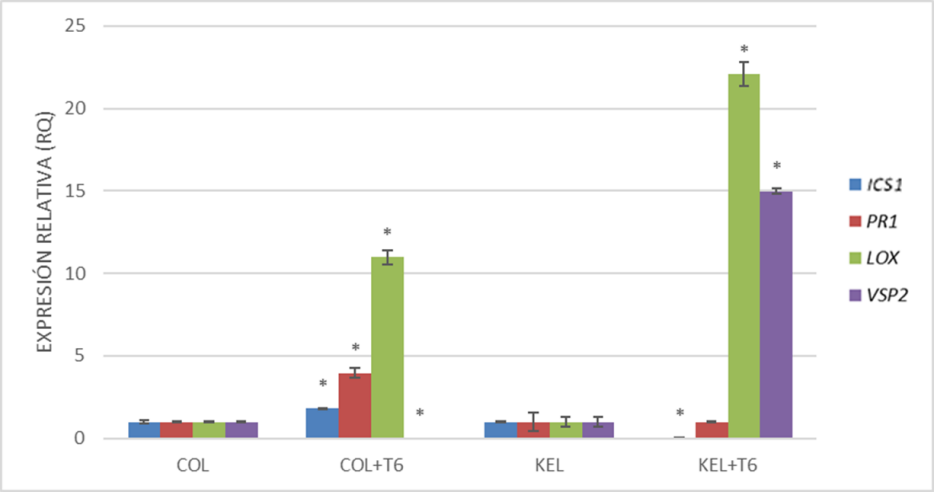


Figura 2.19: Expresión relativa de genes de defensa en raíces de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) en cultivo hidropónico con *T. parareesei* (+T6). La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación del tallo floral. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor obtenido para cada gen en los diferentes tipos de plantas sin el hongo. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión en cada uno de los genes entre las plantas con y sin el hongo se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

En el caso del ecotipo silvestre, puede observarse en la figura 2.19 como se ve incrementada la expresión de los genes relacionadas con ambas rutas defensivas (SA y JA), mientras que en la línea transgénica la ruta del SA se ve disminuída y la del JA muy aumentada.

1.4.3.3.- Productividad

Para comprobar si estas diferencias de colonización se reflejaban en un aumento en la productividad de silicuas por parte de la línea Kel2, se inculó *T. parareesei* T6 al sustrato de las plantas, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

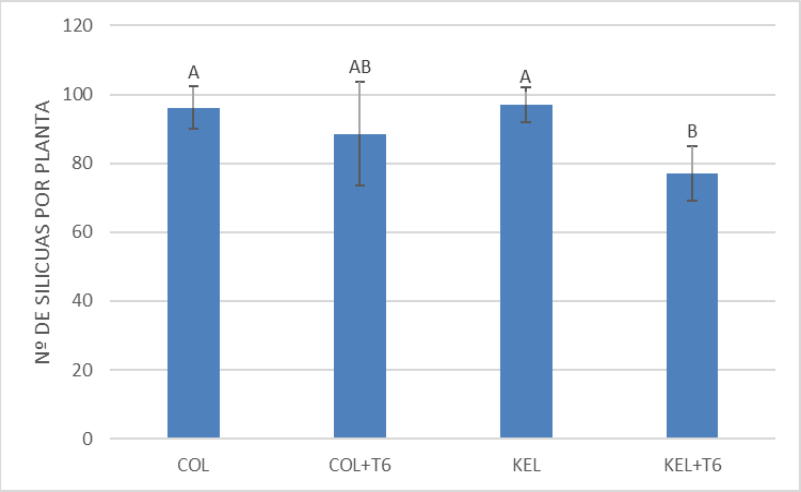


Figura 2.20: Número de silicuas producidas por planta de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) inoculadas con *T. parareesei* (+T6). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.20), pudimos observar cómo, al igual que ocurría entre el ecotipo silvestre y la línea transgénica sin *T. parereesei*, no existen diferencias significativas entre ambos tipos de plantas inoculadas con el hongo, aunque sí se observa una reducción significativa en la producción de silicuas en la línea transgénica cuando es inoculada con el hongo.

1.5.- Estudio con transformantes de *T. harzianum* con el gen *Thkel1* silenciado

A la vista de los resultados mostrados anteriormente, nos planteamos la posibilidad de que el gen *Thkel1* juegue un papel importante en la colonización radicular por parte de *T. harzianum*. Para comprobar esta idea realizamos diferentes ensayos con dos transformantes que presentan el gen *Thkel1* silenciado en menor o mayor medida, los cuales se encuentran descritos en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos.

1.5.1.- Colonización radicular

Realizamos el estudio de colonización radicular por parte de los transformantes de *T. harzianum* mediante la metodología de cultivo hidropónico *in vitro* y cuantificación de la colonización ya comentada.

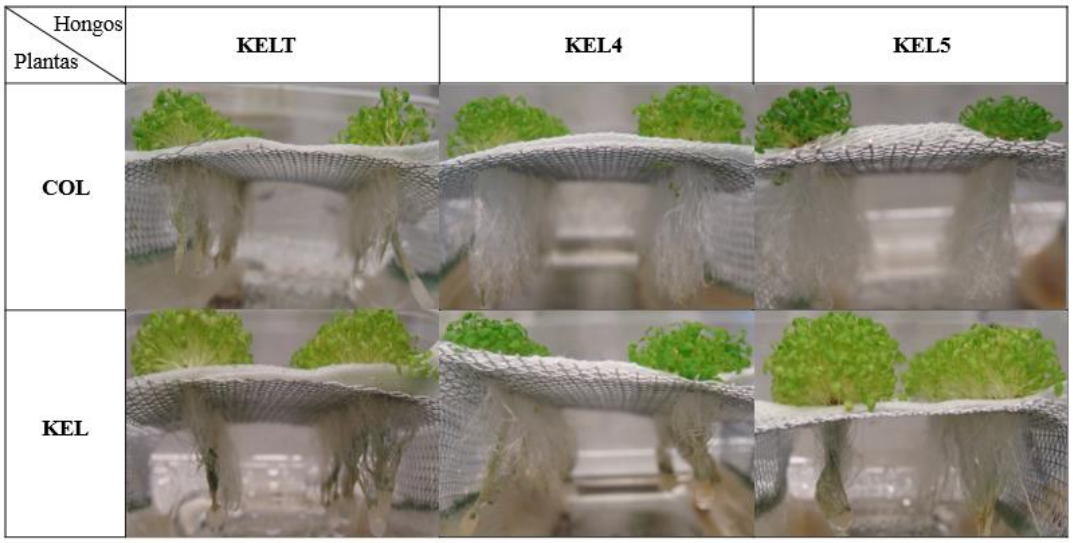


Figura 2.21: Colonización radicular de plantas de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) por transformantes de *T. harzianum* en cultivo hidropónico. Las fotografías se tomaron 7 días tras la inoculación con los hongos. **KelT**: control de transformación; **Kel4** y **Kel5**: transformantes con el gen *Thkel1* silenciado.

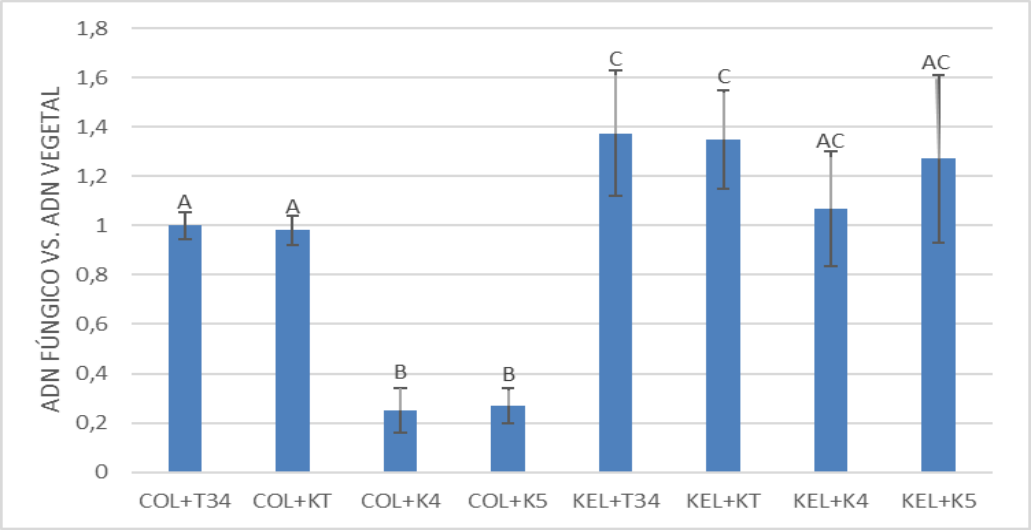


Figura 2.22: Colonización radicular de plantas de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) por transformantes de *T. harzianum* en cultivo hidropónico. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, 7 días tras la inoculación, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de arabidopsis). Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el ecotipo silvestre (gen de la actina de *Trichoderma* spp.), con un valor arbitrario de 1. **T34:** *T. harzianum*; **KT**: control de transformación; **K4** y **K5**: transformantes con el gen *Thkel1* silenciado. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

En las figuras 2.21 y 2.22, se observa cómo no existen diferencias entre la colonización por T34 y el control de transformación en ninguno de los dos tipos de plantas. Con respecto a los transformantes silenciados, se observa una disminución significativa en la colonización del ecotipo silvestre, mientras que cuando la planta expresa el gen *Thkel1* no hay diferencias significativas con respecto a la colonización por T34.

1.5.2.- Genes de defensa

Con el fin de determinar si las diferencias en la colonización radicular observadas en los transformantes de *T. harzianum* podían ser causadas por la diferente respuesta defensiva de las plantas a nivel radicular, se realizó un estudio de expresión de genes de defensa en tejido de raíz, tal y como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.

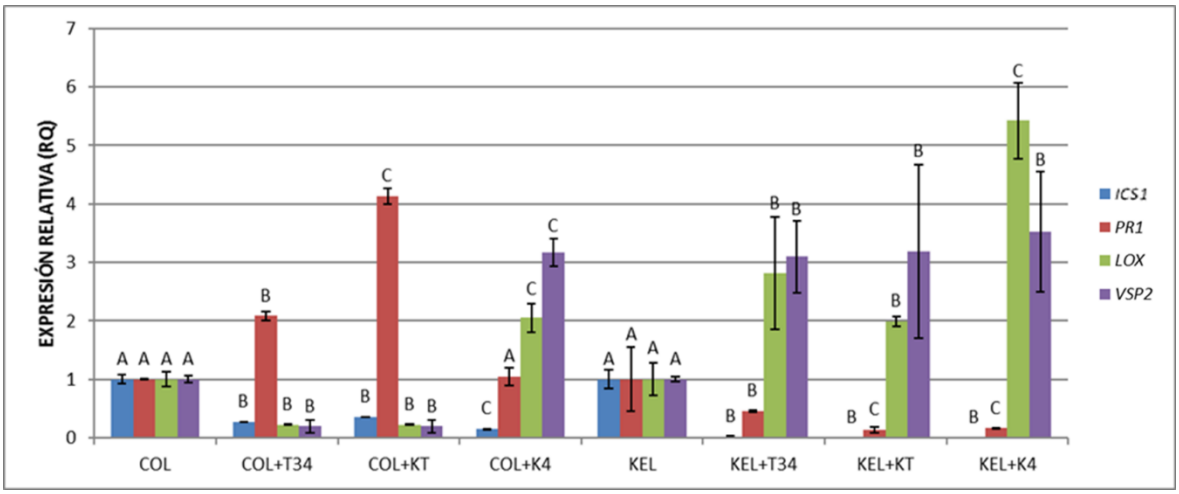


Figura 2.23: Expresión relativa de genes de defensa en raíces de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL) en cultivo hidropónico con *T. harzianum*. Las muestras se tomaron 7 días tras la inoculación con el hongo. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina de arabidopsis. Las variaciones de expresión se normalizaron respecto del valor obtenido para cada gen en los diferentes tipos de plantas sin el hongo. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

En la Figura 2.23 puede observarse cómo la inoculación del ecotipo silvestre Col-0 con el control de transformación KT sigue la misma tendencia que la inoculación con la cepa T34, mientras que en el caso de la inoculación con el transformante K4, con el gen *Thkel1* silenciado, el patrón es totalmente contrario, aumentando la expresión de los genes relacionados con la ruta del JA. Por otro lado, en la línea transgénica Kel2 se observa la

misma tendencia de expresión de genes de defensa para la inoculación de T34, el control de transformación KT y el transformante silenciado K4, incrementando la expresión de los genes relacionados con la ruta del JA.

1.5.3.- Productividad

Para comprobar si las diferencias de colonización se reflejaban en una reducción en la productividad de silicuas por parte del ecotipo silvestre inoculado con el transformante silenciado K4, se realizó la inoculación en el sustrato de las plantas, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

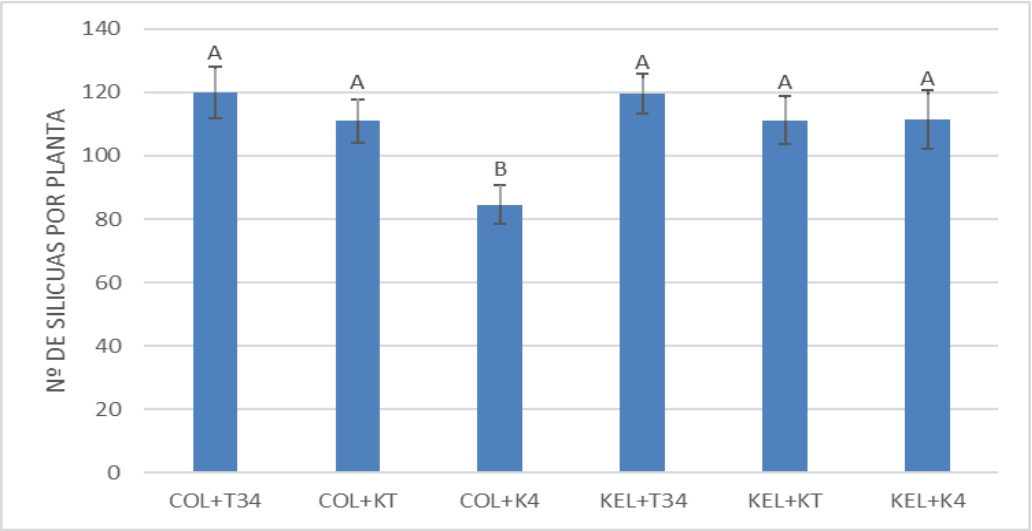


Figura 2.24: Número de silicuas producidas por planta de arabidopsis Col-0 (COL) y Kel2 (KEL). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. **T34:** *T. harzianum*; **KT**: control de transformación; **K4**: transformante con el gen *Thkel1* silenciado. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.24), pudimos observar que no existen diferencias significativas entre ambos tipos de plantas inoculadas con la cepa silvestre T34 o con el control de transformación KT. Por otro lado, se observa la misma reducción significativa en la producción de silicuas en la inoculación del ecotipo silvestre con el transformante silenciado K4, que observábamos en su colonización radicular.

2.- ESTUDIO CON LOS TRANSFORMANTES DE *Trichoderma* SILENCIADOS EN EL GEN *Thkel1* SOBRE PLANTAS DE TOMATE

2.1.- Colonización radicular

A la vista de los resultados anteriores, decidimos comprobar si la situación de disminución de la colonización por *T. harzianum* al silenciarse el gen *Thkel1* ocurría también en plantas de interés agronómico, por lo que usamos para ello plantas de tomate.

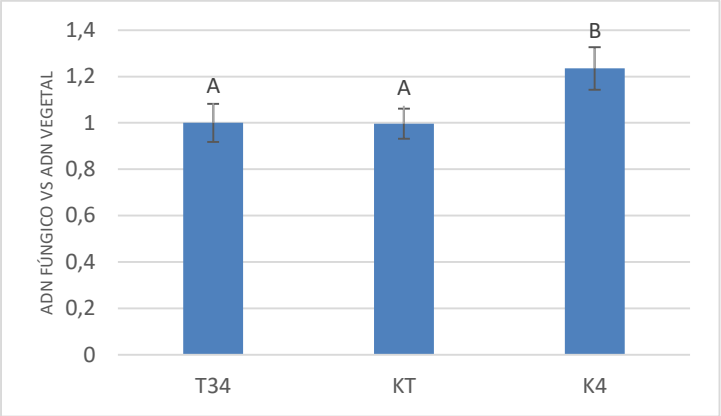


Figura 2.25: Colonización radicular de plantas de tomate por *T. harzianum* en condiciones de invernadero. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, 7 días tras la inoculación, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de tomate). La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación de los primordios florales. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para la inoculación con T34 (gen de la actina de *Trichoderma* spp.), con un valor arbitrario de 1. **T34:** *T. harzianum*; **KT**: control de transformación; **K4**: transformante con el gen *Thkel1* silenciado. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

La figura 2.25 muestra cómo la colonización por el transformante silenciado K4 no sólo no mostró la disminución esperada que habíamos observado en arabidopsis, sino que se produjo un aumento significativo de la colonización.

2.2.- Genes de defensa

Con el fin de determinar si las diferencias en la colonización radicular detectada con los transformantes de *T. harzianum* en arabidopsis y en tomate podían ser causadas por la

diferente respuesta defensiva de las plantas a nivel radicular, también se realizó un estudio de expresión de genes de defensa en raíz de tomate, tal y como se describe en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos. Identificándose los genes según las abreviaturas: *ICS1* (isocorismato sintasa 1), *PR1* (proteína relacionada con la patogénesis 1), *LOX* (lipooxigenasa) y *EIN2* (proteína insensible al etileno 2).

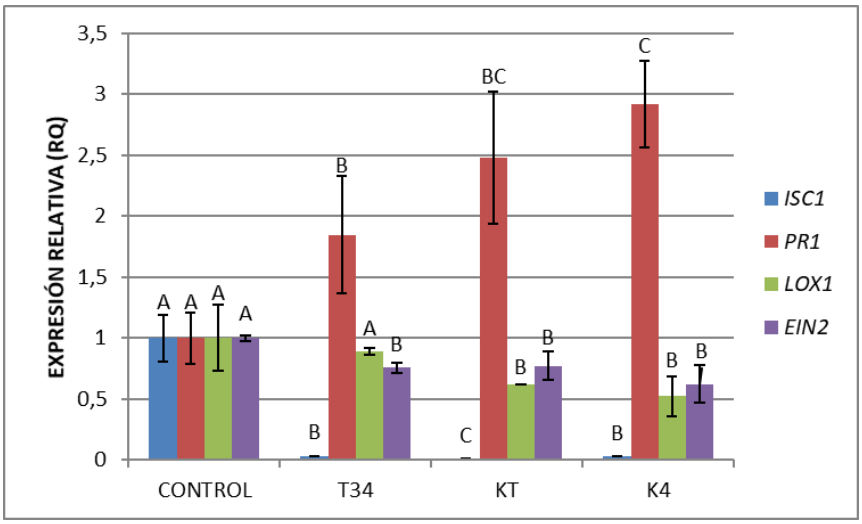


Figura 2.26: Expresión relativa de genes de defensa en raíces de tomate en condiciones de invernadero con transformantes de *T. harzianum*. La inoculación se realizó a los 15 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación de los primordios florales. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor obtenido para cada gen en la planta sin el hongo. **T34**: *T. harzianum*; **KT**: control de transformación; **K4**: transformante con el gen *Thkel1* silenciado. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

En el caso del tomate (Figura 2.26), la inoculación radicular con el control de transformación y con el transformante con el gen *Thkel1* silenciado muestra la misma tendencia que en la inoculación con la cepa control T34, con un aumento en la expresión del gen *PR1* de respuesta a SA y una disminución de los genes relacionados con la ruta del JA.

3.- PRESENCIA DEL GEN *Thkel1* EN PLANTAS DE *B. napus*

Los resultados observados en las plantas de arabidopsis que expresaban el gen *Thkel1* evidencian los beneficios que la expresión de este gen de *T. harzianum* presenta para ellas y nos hace plantear la posibilidad de su utilización en la transformación de otras especies

vegetales. A la vista de este estudio preliminar, en lo que a interacción con *T. harzianum* se refiere, las diferencias observadas entre arabidopsis y tomate nos hicieron contemplar la posibilidad de expresar ese gen en plantas no tan alejadas taxonómicamente de arabidopsis. Por ello, elegimos para su transformación con el gen *Thkel1* un cultivo de elevado interés económico y agronómico en la actualidad, como es la colza o canola (*B. napus*), perteneciente, además a la misma familia vegetal, Brassicaceae.

3.1.- Determinación del número de copias del transgén

En primer lugar, se sembraron en medio MS suplementado con el antibiótico de selección las semillas (T1) de las plantas que habían sido infiltradas con *A. tumefaciens* (T0), tal y como se describe en el apartado 8.4.1 de Materiales y Métodos, las plántulas supervivientes se pasaron a sustrato hasta que produjeron sus propias semillas (T2). Mientras la T1 estaba en crecimiento se comprobó la presencia del gen *Thkel1* en su genoma mediante PCR convencional del ADN extraído de sus hojas, utilizando los primers específicos para dicho gen, tal y como se indica en el apartado 8.4.2 de Materiales y Métodos. De esta forma, se seleccionó la línea 3 como buena candidata para continuar. Repitiendo el mismo proceso de análisis por PCR en la generación T2, se seleccionaron las líneas 3.17, 3.18, 3.20, 3.21 y 3.25. Se sembraron seis semillas por línea y se realizó el cálculo del número de copias del transgén por PCR cuantitativa a cada una de esas plantas (T3), tal y como se indica en el apartado 4.7 de Materiales y Métodos. De esta forma, comprobamos que la línea 3.17.2 presentaba claramente en su genoma una copia del transgén, mientras que la línea 3.20.1 presenta dos copias del mismo.

Para comprobarlo, además de para determinar si el transgén se estaba expresando, realizamos un estudio de expresión génica en las diferentes líneas, tal y como se indica en el apartado 4.6.2 de Materiales y Métodos.

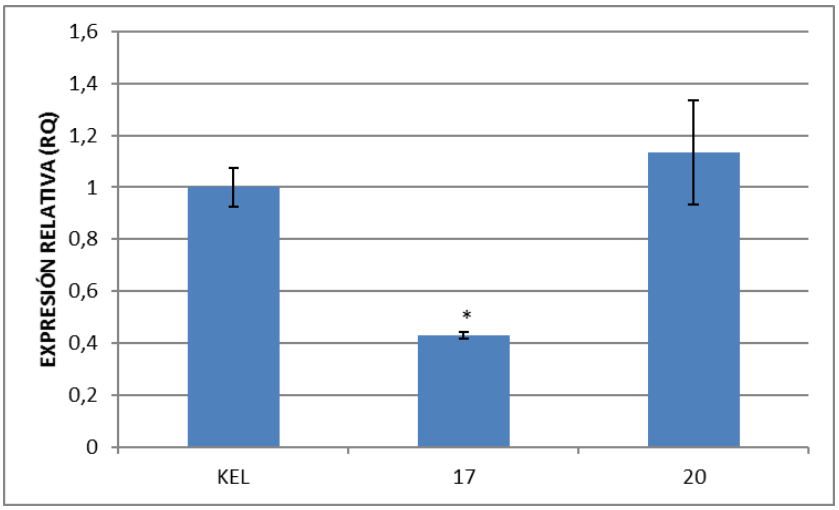


Figura 2.27: Expresión del gen *Thkel1* de *T. harzianum* T34 en plantas de arabidopsis y colza. Como gen endógeno se utilizó el gen de la actina. Las variaciones de expresión fueron normalizadas respecto del valor obtenido para cada gen en la línea Kel2 de Arabidopsis. **KEL**: línea transgénica de arabidopsis Kel2; **17** y **20**: líneas transgénicas de colza. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre las líneas de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

La expresión relativa del gen *Thkel1* en plantas de arabidopsis y colza se muestra en la Figura 2.27. La línea transgénica Kel2 de arabidopsis y la 20 de colza muestran un valor similar de expresión, mientras que en la línea 17 de colza la expresión de *Thkel1* fue significativamente menor.

3.2.- Estudios de germinación

Una vez comprobada la presencia de *Thkel1* en las líneas 17 y 20, procedimos a la realización de diferentes estudios fisiológicos, comenzando por el proceso de germinación.

3.2.1.- Germinación en MS

Se realizó un estudio comparativo de germinación en medio nutritivo MS entre la colza comercial de la que derivan y las líneas transgénicas 17 y 20. Además, se midió la longitud radicular y el índice de germinación tras 5 días de su siembra en placa, tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

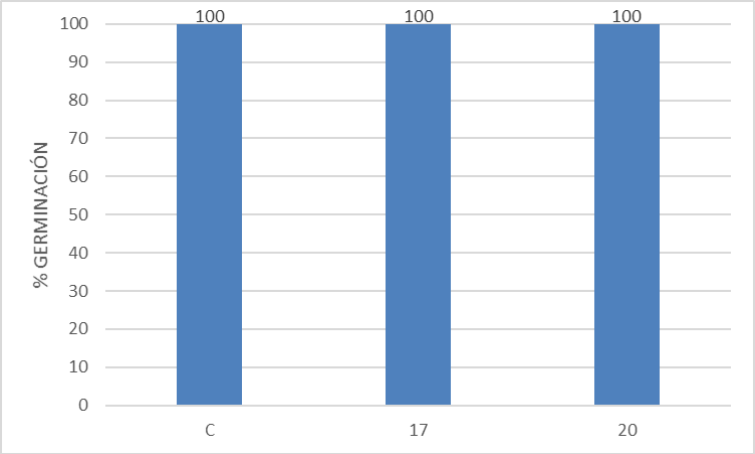


Figura 2.28: Porcentaje de germinación de semillas de colza en medio MS. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas.

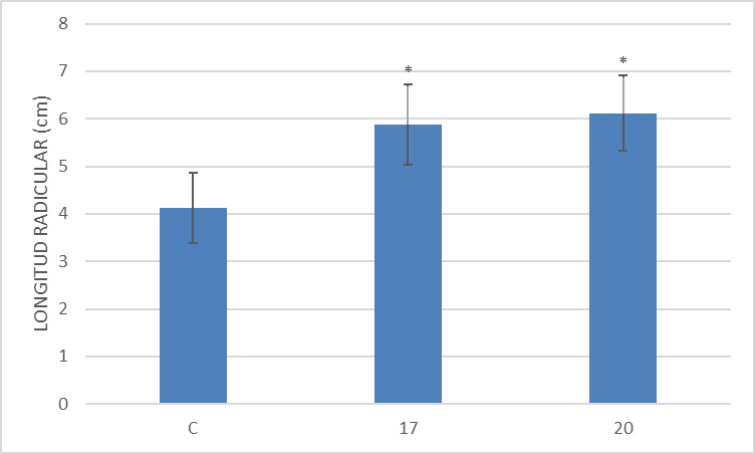


Figura 2.29: Elongación radicular de semillas de colza en medio MS. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las columnas muestran la media de 40 plántulas y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre las líneas de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0{,}05$).

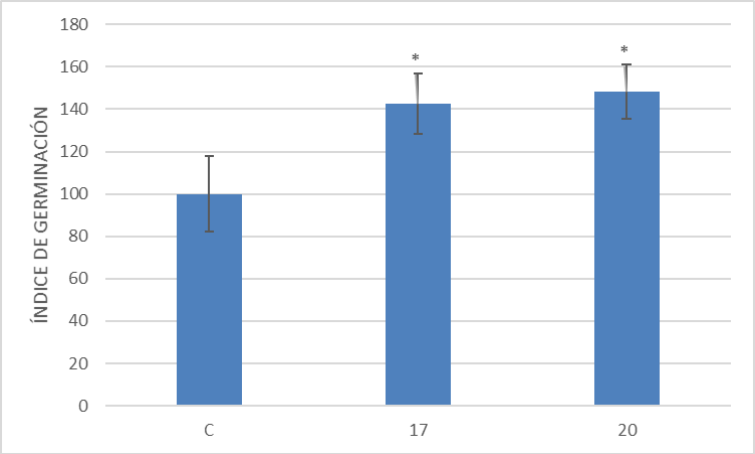


Figura 2.30: Índice de germinación de semillas de colza en medio MS. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las columnas muestran la media de 40 plántulas y las barras su desviación estándar. Las diferencias de expresión entre las líneas de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos muestran que la presencia del gen *Thkel1* no aporta beneficios a las semillas de colza con respecto al porcentaje de germinación (Figura 2.28), mientras que sí se observan aumentos significativos en la longitud radicular (Figura 2.29) y en el índice de germinación (Figura 2.30) en ambas líneas transgénicas.

3.2.1.- Germinación bajo estrés salino

También realizamos el mismo estudio de germinación en medio MS suplementado con NaCl 250 mM, con el fin de provocar un estrés salino en las semillas, tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos.

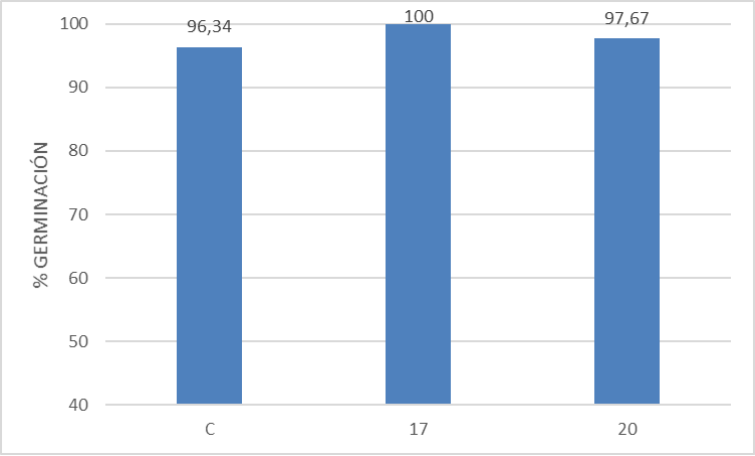


Figura 2.30: Porcentaje de germinación de semillas de colza en medio MS con NaCl 250mM. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas.

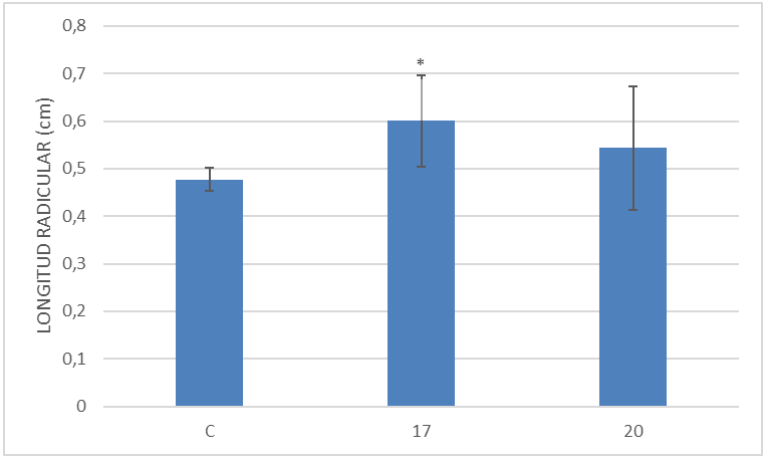


Figura 2.31: Elongación radicular de semillas de colza en medio MS con NaCl 250mM. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las columnas muestran la media de 40 plántulas y las barras su desviación estándar. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

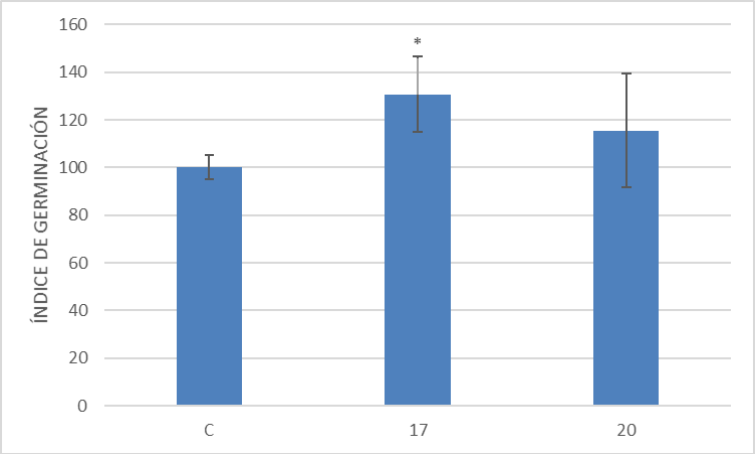


Figura 2.32: Índice de germinación de semillas de colza en medio MS con NaCl 250mM. Las semillas se mantuvieron en medio MS y oscuridad durante 5 días hasta que se tomaron las medidas. Se utilizaron 40 semillas por cada tipo de planta. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las columnas muestran la media de 40 plántulas y las barras su desviación estándar. Las diferencias entre las líneas de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

Con respecto al sometimiento de las semillas a estrés salino (NaCl 250 mM) observamos cómo la línea 17 presenta un mayor porcentaje de germinación (Figura 2.30), una significativamente mayor longitud radicular (Figura 2.31) y, por consiguiente, un mayor índice de germinación (Figura 2.32), con respecto al control, algo que no ocurre con la línea 20.

3.3.- Productividad en condiciones de invernadero

La siguiente característica a evaluar en las líneas transgénicas de colza 17 y 20 fue su capacidad de producir semillas, tomando varios datos de número silicuas formadas por planta, de semillas por silicua, peso por semilla y peso total de semillas que produce cada planta, relacionado con las mejoras que la presencia del gen *Thkel1* puede aportarle a la planta en su crecimiento, desarrollo y productividad de semillas, respecto a la variedad comercial transformada. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero según se describe en el apartado 2.2 de Materiales y Métodos.

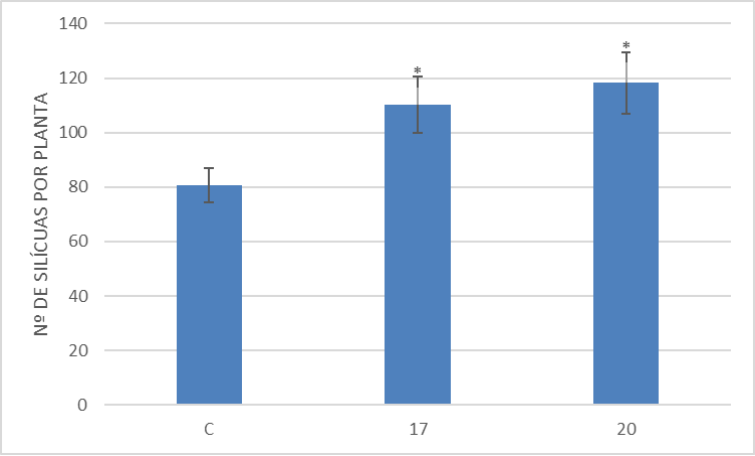


Figura 2.33: Número de silicuas producidas por planta de colza. Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

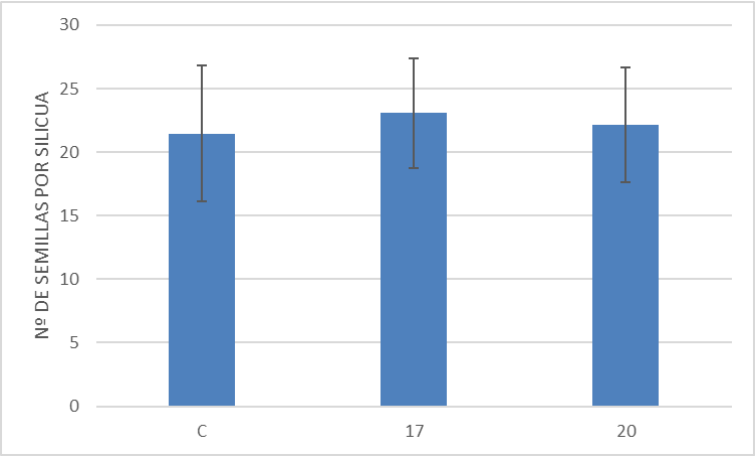


Figura 2.34: Número de semillas por silicua producidas por planta de colza. Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el *t*-test.

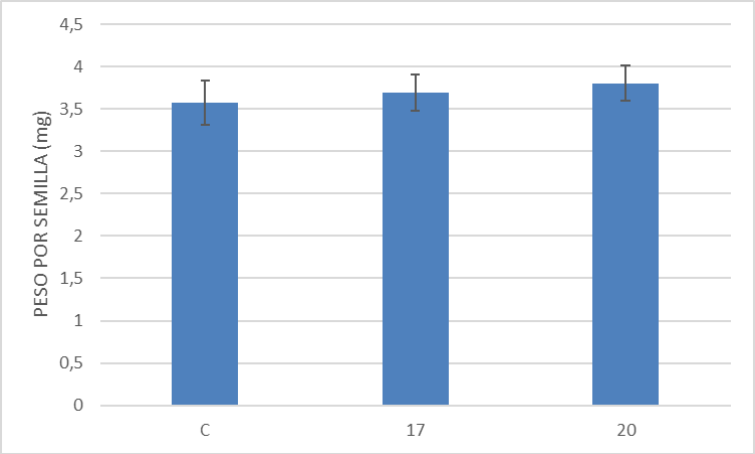


Figura 2.35: Peso por semillas (mg) producidas de colza. Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 50 semillas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el *t*-test.

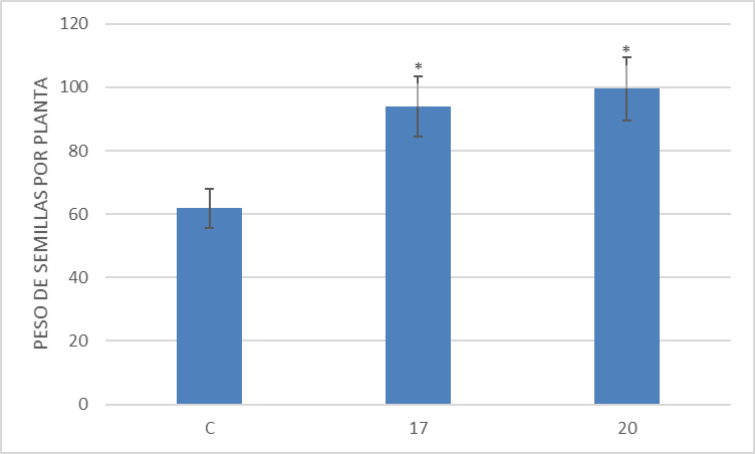


Figura 2.36: Peso de semillas producido por planta de colza (g). Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la relación entre número de silicuas, número de semillas por silicua y peso de cada semilla, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

Haciendo un análisis general de los datos obtenidos, se observa un aumento significativo de la productividad de las líneas transgénicas frente al control en cuanto al número de silicuas (Figura 2.33) y el peso de semillas producidas por planta (Figura 2.36), pero no se observa aumento en el caso del número de semillas por silicua (Figura 2.34) y de peso por semilla (Figura 2.35).

3.4.- Productividad frente a estrés salino

Posteriormente sometimos las plantas de colza a estrés salino (100 mM) en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 11.1 de Materiales y Métodos, obteniendo los siguientes datos de productividad.

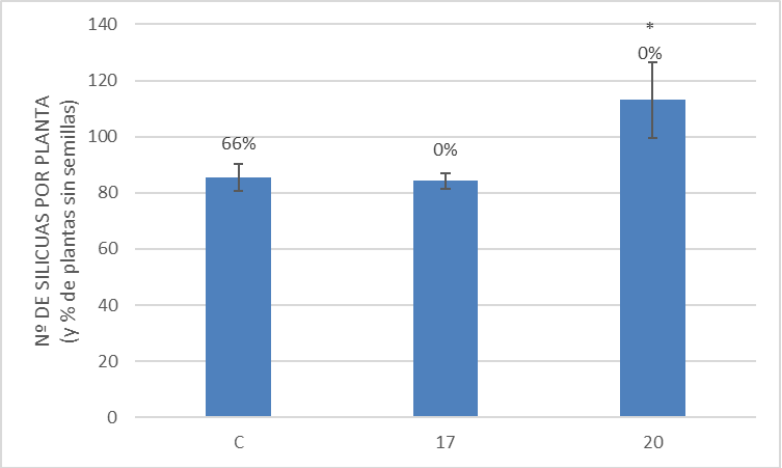


Figura 2.37: Número de silicuas producidas por planta de colza bajo NaCl 100 mM. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Sobre las barras se muestra el porcentaje de plantas que no dieron semillas, al abortarse sus flores. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

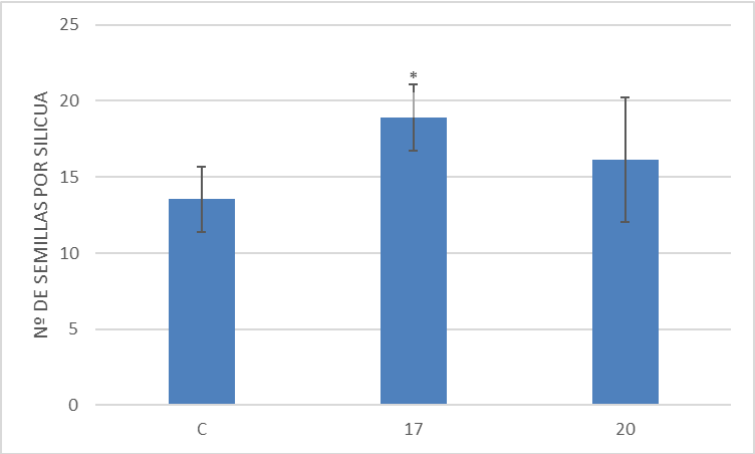


Figura 2.38: Número de semillas por silicua producidas por planta de colza bajo NaCl 100 mM. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

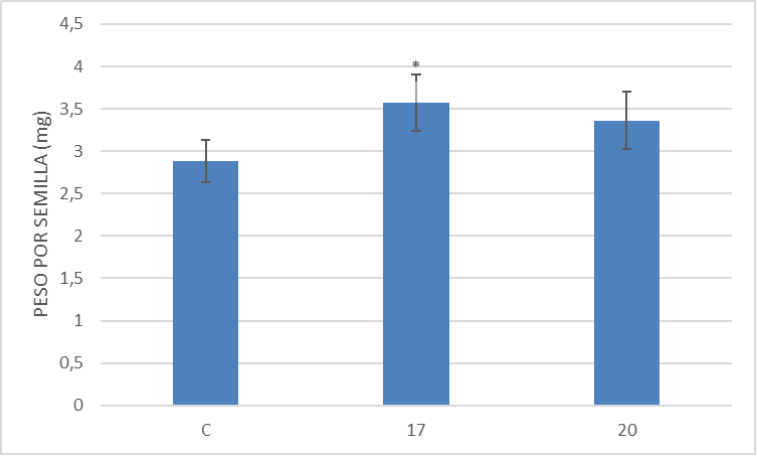


Figura 2.39: Peso por semilla (mg) producidas de colza bajo NaCl 100 mM. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 50 semillas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el *t*-test. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

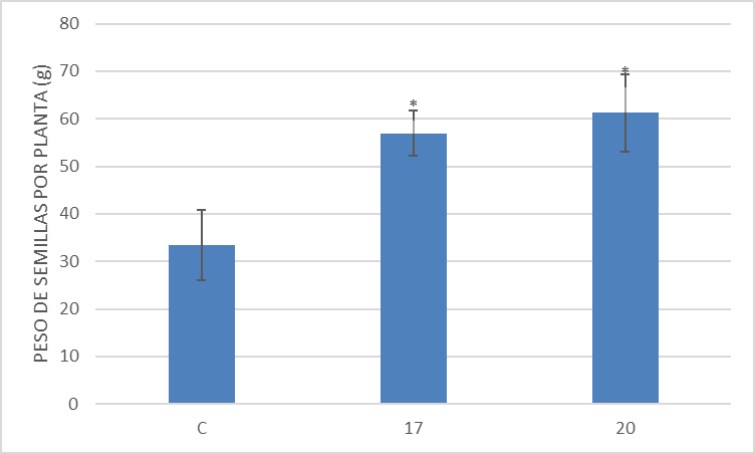


Figura 2.40: Peso de semillas producido por planta de colza bajo NaCl 100 mM. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la relación entre número de silicuas, número de semillas por silicua y peso de cada semilla, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores no mostraron diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) según el *t*-test. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

Con los datos obtenidos en su conjunto, se observa un aumento significativo de la productividad de las líneas transgénicas frente al control bajo estrés salino, ya que ninguna de las plantas aborta sus flores, observándose, además, un incremento significativo en el

número de silicuas de la línea 20 (Figura 2.37). Por otro lado, la línea 17 presenta un aumento significativo en lo que se refiere al número de semillas por silicua (Figura 2.38) y el peso de las mismas (Figura 2.39). En el caso del peso de semillas producido por cada planta (Figura 2.40), ambas líneas son significativamente superiores al control sin transformar.

3.5.- Productividad frente a estrés de sequía

El último estudio de productividad se realizó sometiendo a las plantas a situación de sequía en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 11.2 de Materiales y Métodos, con los siguientes datos de productividad.

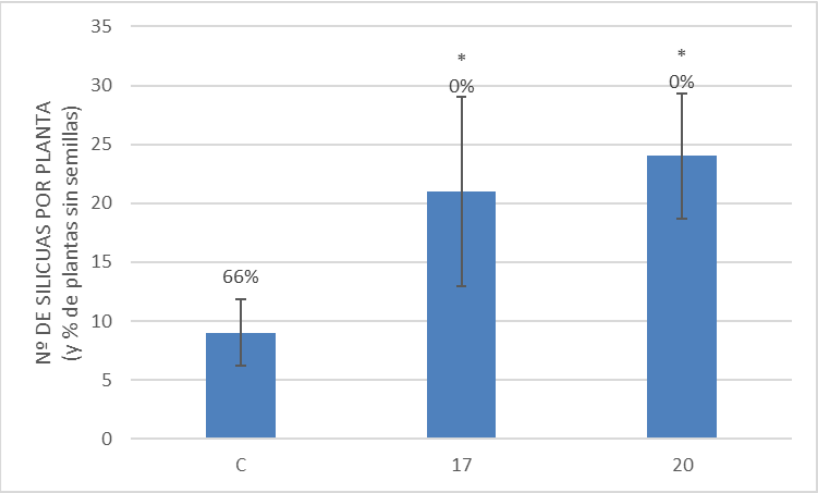


Figura 2.41: Número de silicuas producidas por planta de colza bajo sequía. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Sobre las barras se muestra el porcentaje de plantas que no dieron semillas, al abortarse sus flores. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

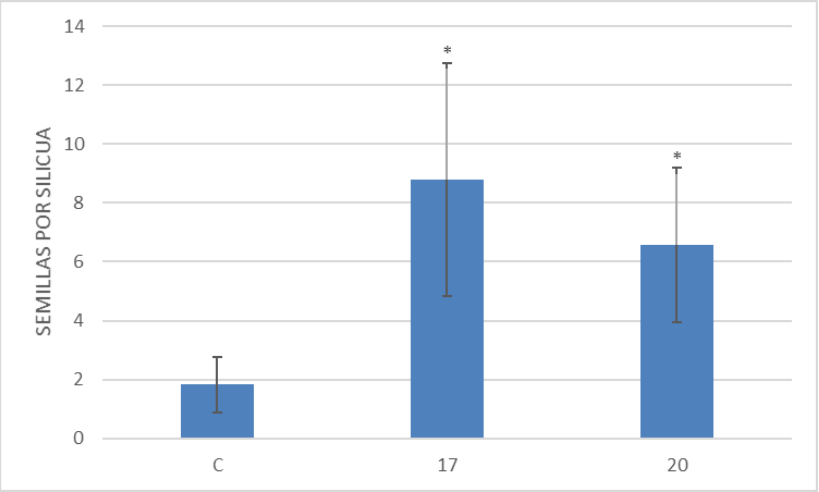


Figura 2.42: Número de semillas por silicua producidas por planta de colza bajo sequía. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

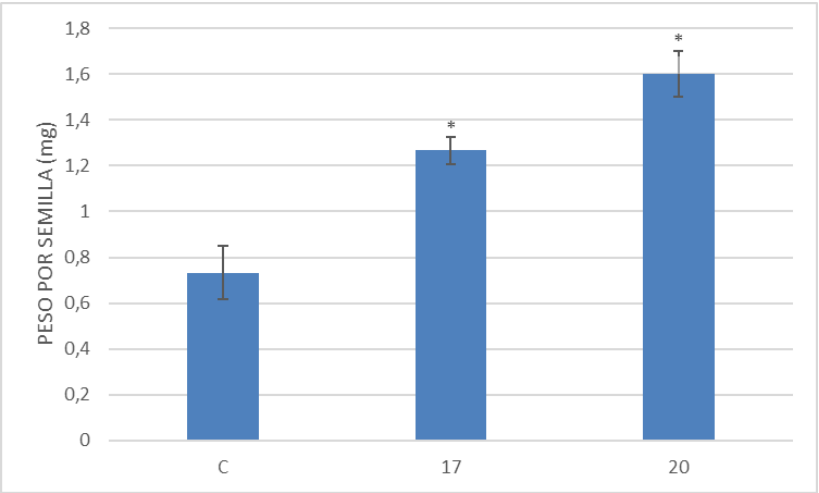


Figura 2.43: Peso por semillas (mg) producidas de colza bajo sequía. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 50 semillas, junto con su desviación estándar en forma de barras. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

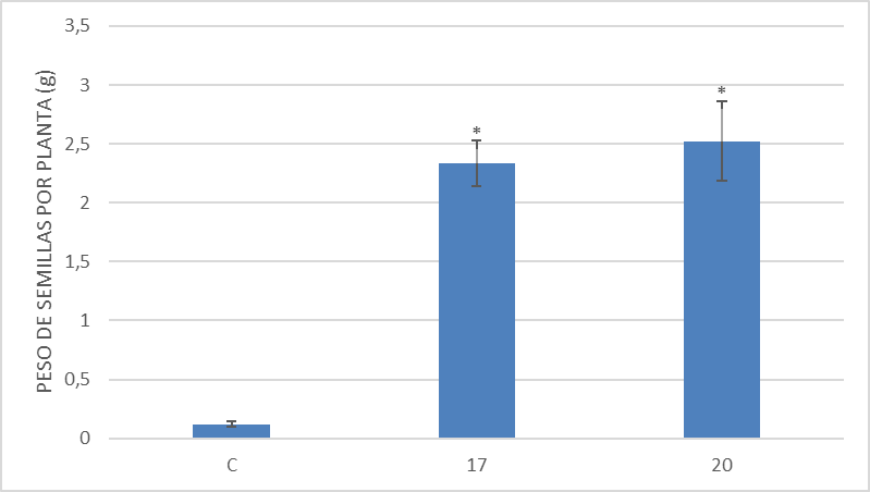


Figura 2.44: Peso de semillas (g) producido por planta de colza bajo sequía. Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la relación entre número de silicuas, número de semillas por silicua y peso de cada semilla, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las diferencias de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test frente al control sin transformar, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

En general, existe un aumento significativo de la productividad de las líneas transgénicas frente al control bajo estrés por sequía, partiendo del dato de que ninguna de las plantas aborta sus flores. Además, se observa un aumento significativo en el número de silicuas (Figura 2.41), el número de semillas por silicua (Figura 2.42), el peso de las mismas (Figura 2.43) y el peso de semillas producido por cada planta (Figura 2.44).

3.6.- Respuesta frente a estrés biótico

Con el fin de analizar la capacidad de respuesta frente a estrés biótico de las líneas transgénicas 17 y 20, mediante la activación de un posible “priming” frente a patógeno, realizamos un ensayo de inoculación *in vitro* con el patógeno *P. lingam* a nivel foliar, tal y como se indica en el apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos.

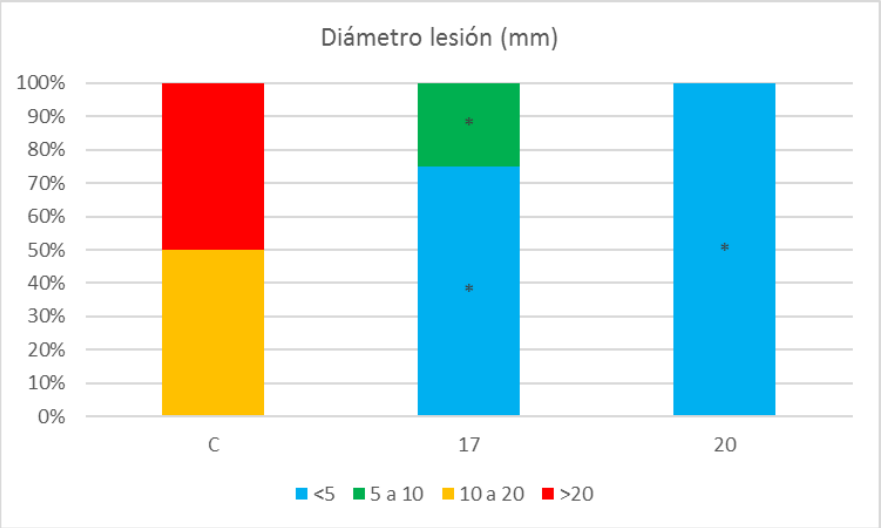


Figura 2.45: Porcentajes de los diámetros de lesión (en mm) provocados por *P. lingam* en hojas de colza. A 7 días tras la inoculación del patógeno. **C:** colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Las columnas muestran los porcentajes de los grupos de diámetros de las lesiones de 15 hojas obtenidas a partir de 15 réplicas biológicas independientes. Las diferencias significativas (*) ($P < 0,05$) se obtuvieron mediante el test no paramétrico de Friedman.

Figura 2.46: Lesiones foliares producidas por *P. lingam* en hojas de colza. De izquierda a derecha: control, línea transgénica 17 y línea transgénica 20. Fotografías realizadas 7 días tras la puesta en contacto de las hojas con el hongo.

Los valores de medida de las lesiones foliares (Figura 2.45) y la observación directa (Figura 2.46), son indicativos de que en el control sin transformar el hongo fitopatógeno provoca el daño que cabría esperar y que la presencia del gen *Thkel1* en las plantas de colza reduce significativamente el daño producido por el hongo en las hojas. Además, se observa que a mayor número de copias de *Thkel1* el daño foliar es menor.

3.7.- Interacción con *Trichoderma*

Al haber transformado plantas de *B. napus* con un gen de *T. harzianum*, decidimos realizar diferentes ensayos de interacción con el hongo y comprobar posibles diferencias que puedan ocurrir con respecto al control sin transformar, al igual que hicimos con arabidopsis.

3.7.1.- Colonización radicular

El estudio de colonización de raíz con *T. harzianum* T34 se realizó como se describe en el apartado 4.6.5 de Materiales y Métodos.

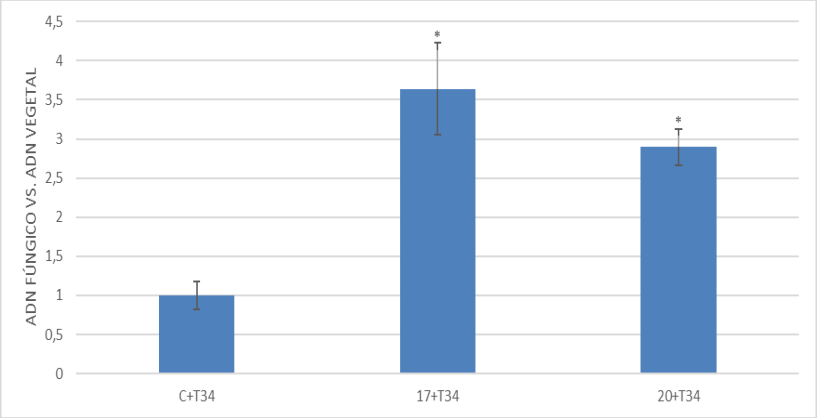


Figura 2.47: Colonización radicular de plantas de colza por *T. harzianum* T34 en invernadero. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de colza). La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación del tallo floral. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el control sin transformar (gen de la actina de *Trichoderma*), con un valor arbitrario de 1. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Las diferencias de colonización entre los tipos de plantas se evaluaron mediante un análisis *t*-test, identificando las diferencias significativas como * ($P < 0,05$).

En la figura 2.47 se muestra el aumento de colonización radicular por *T. harzianum* cuando la planta expresa el gen *Thkel1*, tanto en la línea 17 como en la 20.

3.7.2.- Productividad en invernadero

Con el fin de determinar si las diferencias de colonización se plasmaban en un aumento en la productividad de las plantas transformadas con el gen *Thkel1*, realizamos la inoculación de las plantas en sustrato, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

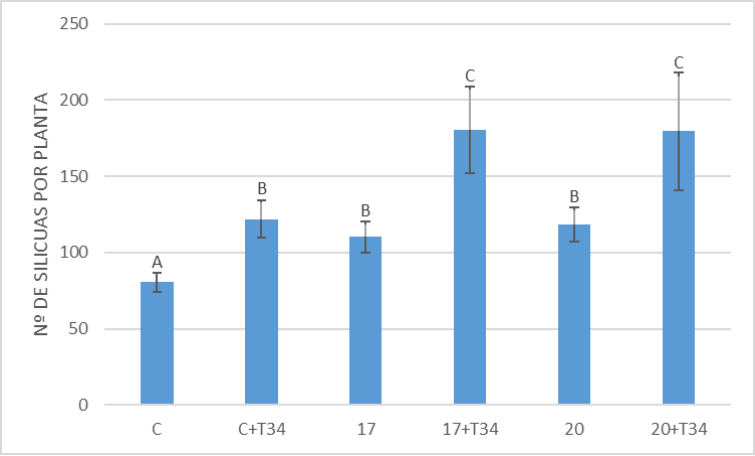


Figura 2.48: Número de silicuas producidas por planta de colza inoculadas con *T. harzianum* (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

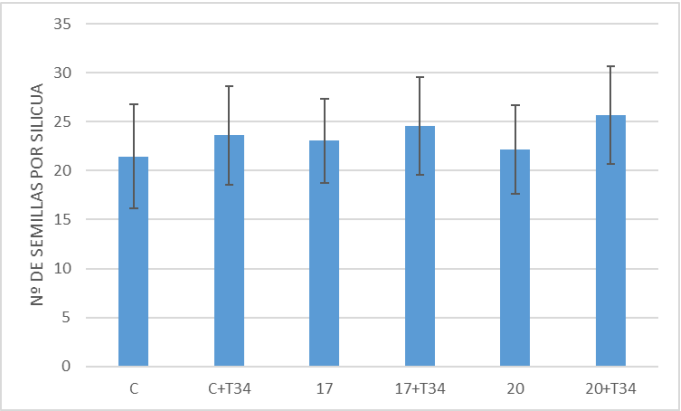


Figura 2.49: Número de semillas por silicua de colza inoculadas con *T. harzianum* (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

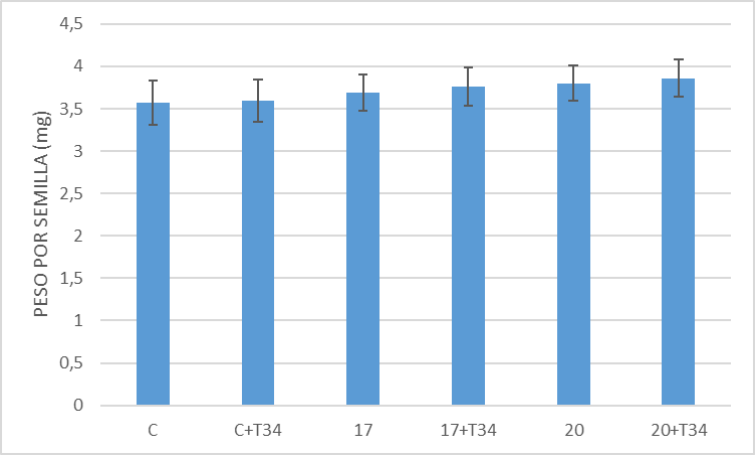


Figura 2.50: Peso por semilla (mg) producida de colza inoculadas con *T. harzianum* (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

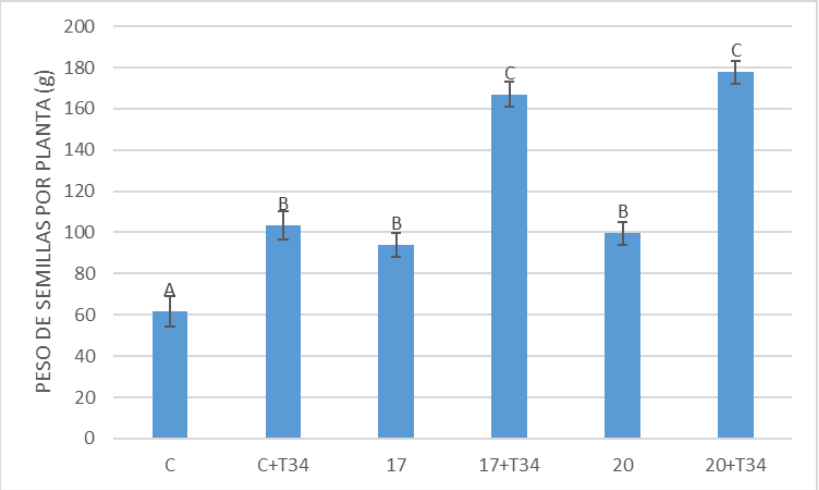


Figura 2.51: Peso de semillas (g) producidas por planta de colza inoculadas con *T. harzianum* (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.48), pudimos observar que hay un aumento significativo en la formación de las mismas tras la inoculación con *T. harzianum*, siendo este incremento mayor en las líneas transgénicas. Algo que se

traduce de la misma forma al calcular el peso de semillas producido por planta (Figura 2.51). En lo que se refiere al número de semillas (Figura 2.49) y al peso de las mismas (Figura 2.50), no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de planta ensayadas.

3.7.3.- Interacción con *T. parareesei*

Al igual que hicimos con las plantas de arabidopsis, inoculamos las plantas de colza con *T. parareesei*, para comprobar si ocurría una respuesta similar a la observada con *T. harzianum*.

3.7.3.1.- Colonización radicular

Realizamos el estudio de colonización radicular por parte de *T. parareesei* T6 en sustrato y condiciones de invernadero, como se describe en el apartado 4.6.5 de Materiales y Métodos, incluyendo en el ensayo la inoculación con *T. harzianum* T34 y cuantificando la colonización de la misma manera que en el apartado 3.7.1 de estos Resultados.

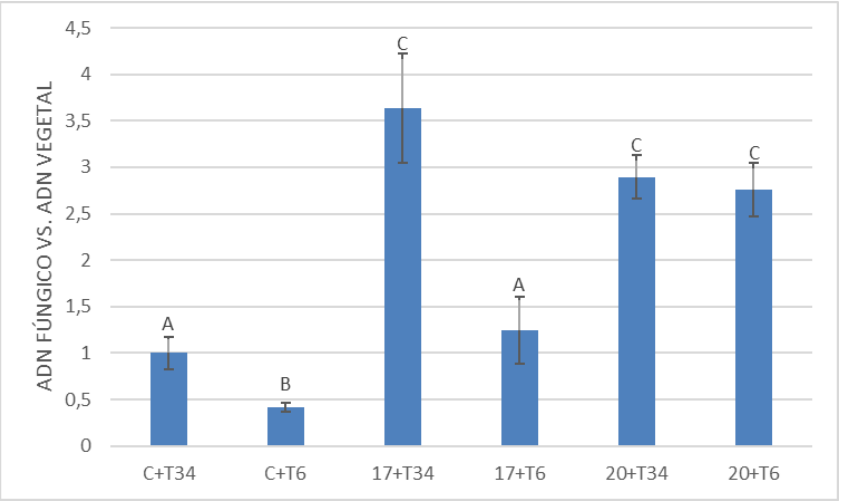


Figura 2.52: Colonización radicular de plantas de colza por *T. harzianum* (T34) y *T. parareesei* (T6) en tinvernadero. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal (gen de la actina de colza). La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación del tallo floral. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el control sin transformar inoculado con T34 (gen de la actina de *Trichoderma* spp.), con un valor arbitrario de 1. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

La figura 2.52 muestra cómo la colonización de las plantas control sin transformar por el hongo *T. parareesei* es menor que la que conseguida por *T. harzianum*. Por otro lado, en las líneas transgénicas 17 y 20 esta colonización se ve muy favorecida en el caso de ambos hongos, tal y como se había observado para *T. harzianum* en la línea 20, con dos copias del transgén, como ocurría en la línea Kel2 de arabidopsis. En la línea 17, con una copia de *Thkel1*, la colonización por *T. parareesei* se reduce con respecto a la observada con *T. harzianum*, aunque sin llegar a los valores del control.

3.7.3.2.- Productividad en invernadero

Para comprobar si estas diferencias de colonización se reflejaban en un aumento en la productividad de las plantas transformadas con el gen *Thkel1*, se realizó la inoculación en sustrato de las plantas, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

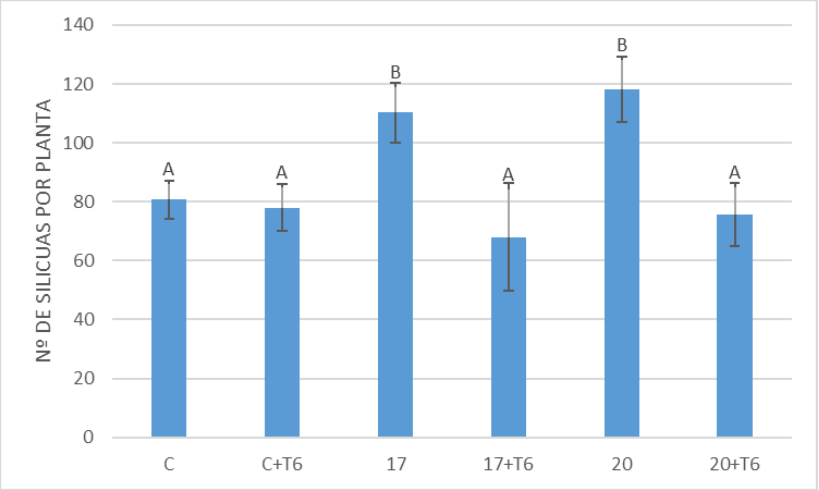


Figura 2.53: Número de silicuas producidas por planta de colza inoculadas con *T. parareesei* (+T6). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

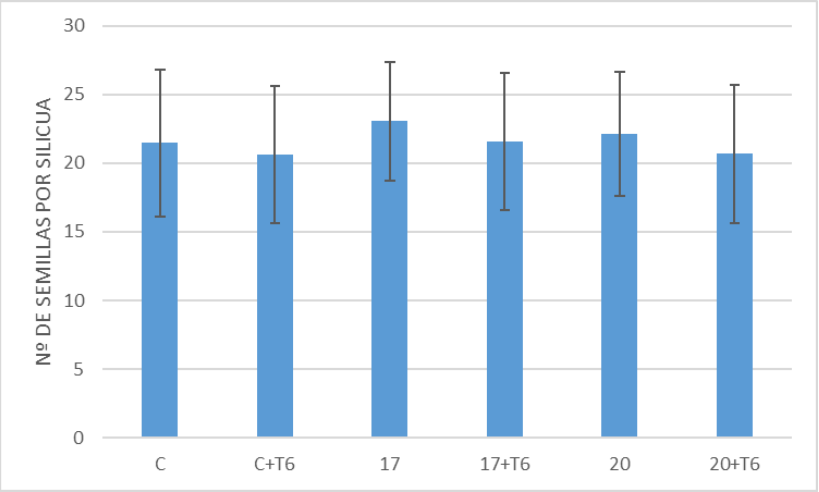


Figura 2.54: Número de semillas por silicua de colza inoculadas con *T. parareesei* (+T6). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

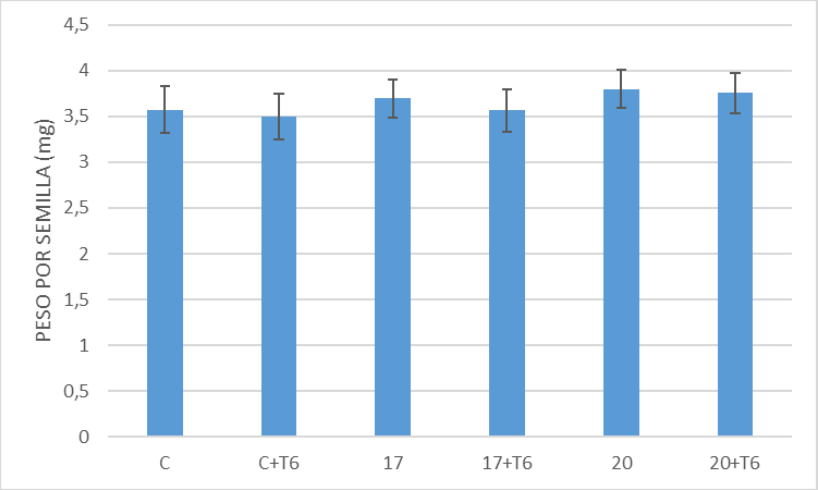


Figura 2.55: Peso por semilla (mg) producida de colza inoculadas con *T. parareesei* (+T6). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

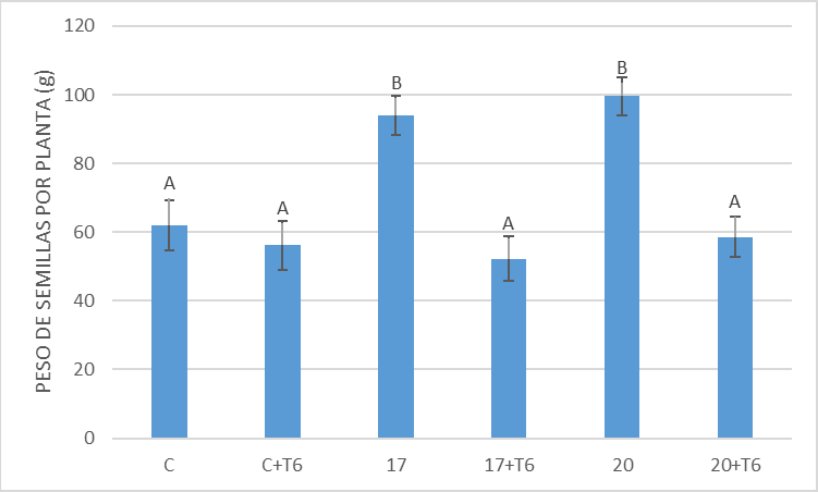


Figura 2.56: Peso de semillas (g) producidas por planta de colza inoculadas con *T. parareesei* (+T6). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.53), pudimos observar como no ocurre un aumento en la formación de silicuas tras la inoculación con *T. parareesei* T6 en el control sin transformar, ocurriendo una disminución significativa en el caso de las líneas transgénicas. Algo que se traduce de la misma forma al calcular el peso de semillas por planta (Figura 2.56). No se observaron diferencias significativas en el número de semillas (Figura 2.54) y el peso de las mismas (Figura 2.55) entre las plantas control y las líneas transgénicas 17 y 20.

3.8.- Estudio con transformantes de *T. harzianum* con el gen *Thkel1* silenciado

A la vista de los resultados mostrados anteriormente con *T. harzianum* T34 y *T. parareesei* T6, nos planteamos la posibilidad de que el gen *Thkel1* juegue un papel a tener en cuenta en la colonización radicular de la colza por parte de *Trichoderma*, al igual que ocurría con arabidopsis. Para comprobar esta idea realizamos diferentes ensayos con uno de los transformantes (K4) que presenta el gen *Thkel1* silenciado, como se describe en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos.

3.8.1.- Colonización radicular

Realizamos un estudio de colonización radicular con *T. harzianum* K4 mediante la metodología de cultivo hidropónico *in vitro* y cuantificación de la colonización ya comentadas.

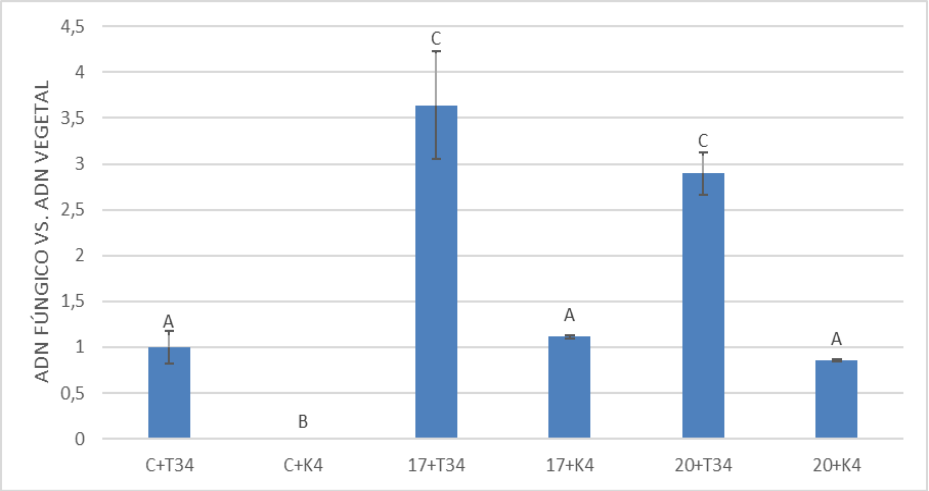


Figura 2.57: Colonización radicular de plantas de colza por transformante de *T. harzianum* (K4) en invernadero. El ADN del hongo se cuantificó mediante RT-qPCR a partir de muestras radiculares, y tomando como referencia la cantidad de ADN vegetal. La inoculación se realizó a los 10 días tras el paso de la plántula a sustrato y la recogida de las muestras radiculares en el momento en el que la planta comienza la formación del tallo floral. Las medidas se referenciaron al valor obtenido para el control sin transformar inoculado con T34, con un valor arbitrario de 1. **C**: control de colza sin tansformar; **17** y **20**: líneas transgénicas de colza; **T34:** *T. harzianum*; **K4**: transformante con el gen *Thkel1* silenciado. Las columnas muestran la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras su desviación estándar. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

En la figura 2.57, se observa que con el transformante silenciado K4 ocurre una falta total de colonización de plantas control sin transformar, mientras que en plantas que expresan el gen *Thkel1* la colonización es mayor que en su respectivo control, pero menor que la observada con T34 en esas mismas líneas transgénicas.

3.8.2.- Producción en invernadero

Con el fin de determinar si estas diferencias de colonización se reflejaban en un aumento en la productividad, se realizó la inoculación en sustrato de las plantas, en condiciones de invernadero, tal y como se describe en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos.

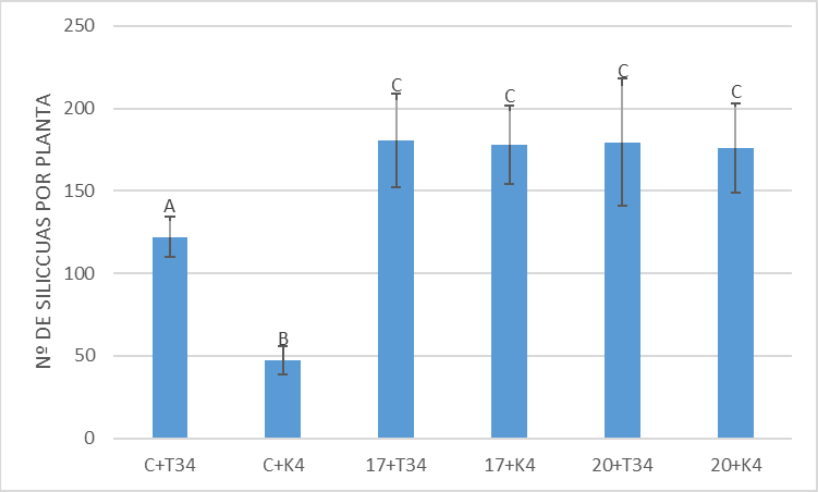


Figura 2.58: Número de silicuas producidas por planta de colza inoculadas con el transformante silenciado de *T. harzianum* (+K4) y la cepa silvestre (+T34). Las silicuas se recogieron al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

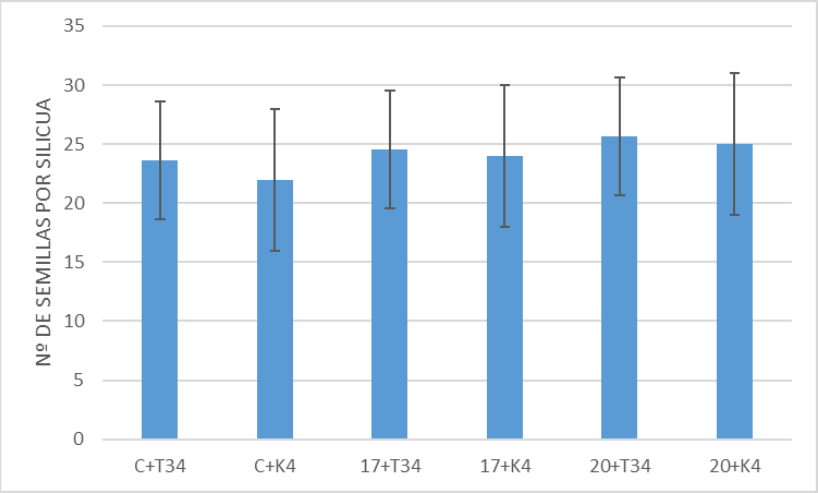


Figura 2.59: Número de semillas por silicua de colza inoculadas con el transformante silenciado de *T. harzianum* (+K4) y la cepa silvestre (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

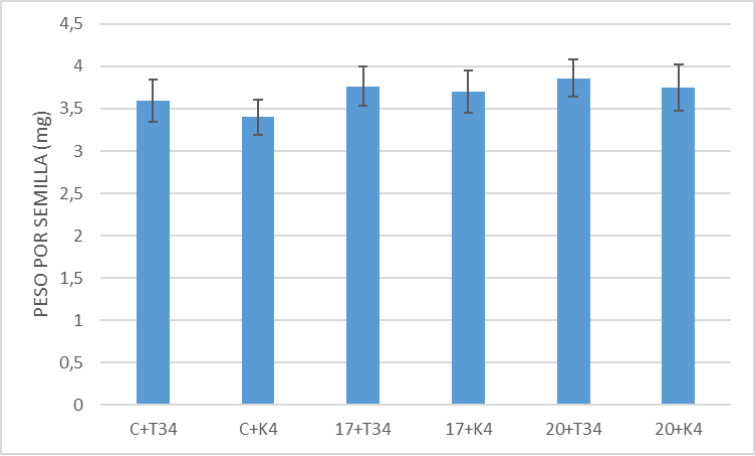


Figura 2.60: Peso por semilla (mg) producida de colza inoculadas con el transformante silenciado de *T. harzianum* (+K4) y la cepa silvestre (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. No existen diferencias significativas entre los valores ($P < 0,05$).

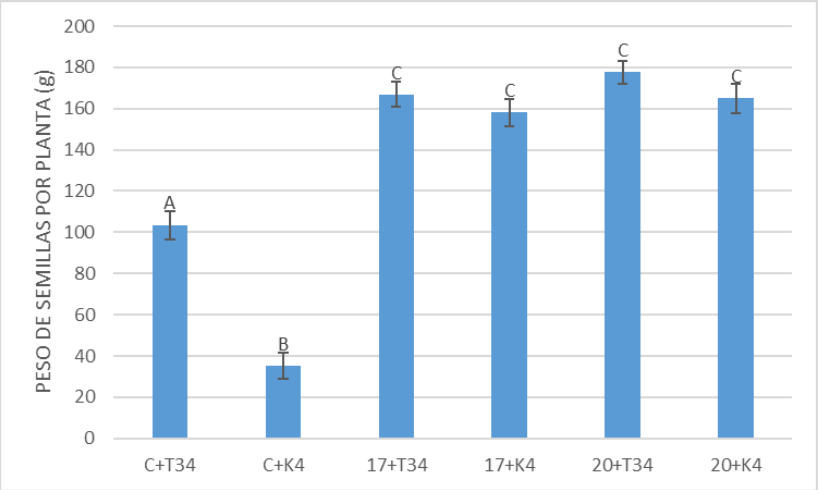


Figura 2.61: Peso de semillas (g) producidas por planta de colza inoculadas con el transformante silenciado de *T. harzianum* (+K4) y la cepa silvestre (+T34). Las silicuas fueron recogidas al final del ciclo de cada planta. Cada valor representa la media de 15 plantas, junto con su desviación estándar en forma de barras. **C:** semillas comerciales de colza sin transformar; **17** y **20**: líneas transgénicas. Los valores se agruparon según diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$) mediante el test de Tukey, en forma de letras mayúsculas sobre las columnas.

Al recoger y cuantificar el número de silicuas por planta (Figura 2.58), pudimos observar un descenso significativo en la formación de las mismas tras la inoculación con el transformante K4 en el control sin transformar de colza, en comparación con la inoculación

con la cepa silvestre, en contraposición con lo que ocurre en las líneas transgénicas, manteniéndose el nivel de producción de silicuas. Algo que se traduce de la misma forma al calcular el peso de semillas producido por planta (Figura 2.61). Por lo que se refiere al número de semillas (Figura 2.59) y el peso de las mismas (Figura 2.60) no existen diferencias significativas entre ninguna de las plantas.

DISCUSIÓN

La transformación de plantas con genes procedentes de *Trichoderma* puede brindar numerosos beneficios para los cultivos agrícolas, como una mejor tolerancia frente estreses abióticos, mayor resistencia a estreses bióticos, actividad de biorremediación, reducción de fitotoxinas o tolerancia a herbicidas (Lorito et al., 1998; Nicolás et al., 2014). En este sentido, el gen *Thkel1* de *T. harzianum* T34 se usó en la transformación de plantas de arabidopsis, confiriéndoles una mayor tolerancia frente a estrés salino que fue acompañada de un incremento de la actividad β-glucosidasa, pues previamente se había observado cómo este gen jugaba un papel importante en la capacidad para enfrentarse a estreses de carácter abiótico por parte del hongo (Hermosa et al., 2011a).

El gen *Thkel1* codifica una proteína con cinco dominios kelch (cáliz, en alemán), los cuales están estrechamente implicados en las interacciones proteína-proteína (Hermosa et al., 2011a). El papel de las proteínas con este tipo de dominios en plantas ha sido estudiado y revisado por varios autores (Maselli et al., 2014; Hassan et al., 2015; Sharma & Pandey, 2016). Se ha comprobado su papel como controladores del reloj circadiano y la floración (Harmon & Kay, 2003; Imaizumi et al., 2003; Li et al., 2013; Takase et al., 2015), en la señalización de diferentes hormonas durante todo el proceso de desarrollo de la planta (Hua & Vierstra, 2011), o en la elongación del hipocotilo en arabidopsis (Miyazaki et al., 2011; Franciosini et al., 2013). Las proteínas con dominios kelch, se encuentran muy extendidas en eucariotas, bacterias e incluso virus ADN, encontrándonos con genes presentes en todo el reino vegetal y con algunos otros específicos de familias concretas, que hace ver el papel de este tipo de proteínas en el éxito adaptativo de diferentes plantas, ya que su regulación transcripcional puede ser totalmente diferente entre especies muy cercanas (Schumann et al., 2011).

En la transformación de las plantas de colza con el gen *Thkel1* pudimos observar un aumento significativo en el índice de germinación de sus semillas (Figura 2.30), algo relacionado con la mejora de la capacidad germinativa por proteínas con dominios kelch, como se determinó en garbanzo (Jia et al., 2012). Se ha observado, a su vez, esta misma mejoría en los índices de germinación cuando las semillas de colza se sometieron a un estrés salino (Figura 2.32), como ya se describió por Hermosa et al. (2011a) en semillas de *A. thaliana* transformadas con el mismo gen, relacionando esta mayor tolerancia con una

reducción en los niveles de ABA, hormona implicada en evitar la germinación bajo condiciones adversas. Hermosa et al. (2011a) también observaron un aumento en la actividad β-glucosidasa, relacionado, a su vez, con un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas bajo estrés. En este sentido, varios estudios relacionan un aumento en la actividad β-glucosidasa con una mayor tolerancia frente a estreses abióticos, como salinidad o sequía, en bacterias (Lee et al., 2015; Eswaran & Khandeparker, 2017), *Aspergillus niger* (Xue et al., 2012), *T. harzianum* (Hermosa et al., 2011), o cebada (Dietz et al., 2000). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el que hemos observado un aumento significativo en la productividad de arabidopsis (Figura 2.7) y colza bajo estrés salino (Figura 2.40) y sequía (Figura 2.44) al tener presente en su genoma el gen *Thkel1*, pues también las proteínas con dominios kelch pueden mejorar esta tolerancia durante el crecimiento de la planta (Jia et al., 2012). Por otro lado, la presencia del gen de *T. harzianum* en las plantas de colza también mejoró su productividad cuando las plantas no estuvieron sometidas a estrés (Figura 2.36), posiblemente relacionado con la capacidad de este tipo de proteínas para mejorar el número y tamaño de semillas, en plantas como el arroz (Chen et al., 2013), o con la relación de las β-glucosidasas en el ciclo de nutrientes (Caruso, 2010) y en la acumulación de Pi en plantas como *A. thaliana* (Malboobi & Lefebvre, 1997).

Para conocer el número de copias del transgén presentes en las plantas de colza transformadas con el gen de *Trichoderma* se utilizó la metodología descrita por Hoebeeck et al. (2007), mejorada por Yuan et al. (2007), partiendo de una primera aproximación en plantas realizada por Does et al. (1991) y mejorada por Ingham et al. (2001), Mason et al. (2002) y Bubner & Bladwin (2004), al igual que otros autores la han utilizado para plantas como el algodón (Yi et al., 2008), el trigo (Li et al., 2004), el maíz (Song et al., 2002), el arroz (Jang et al., 2005), e incluso la colza (Weng et al., 2004).

Por lo que se refiere a la respuesta defensiva de las plantas frente a estreses bióticos, existen ejemplos de transformación de crucíferas con genes de *Trichoderma* que han obtenido una mejor resistencia frente a patógenos, como la transformación de brócoli con el gen de una endoquitinasa de *T. harzianum* frente a *Alternaria brassicola* (Mora & Earle, 2001), o la de colza con el gen *chit42* y *chit36* de *T. atroviride* frente a *Sclerotinia sclerotiorum* (Moghadam et al., 2015; Ziaei et al., 2016). En este sentido, hemos podido observar que, tanto en *A. thaliana* como en colza, la presencia del gen *Thkel1* mejora su capacidad defensiva frente al ataque de *B. cinerea* (Figuras 2.11-2.14) y *P. lingam* (Figuras

2.45 y 2.46), respectivamente, en ensayos *in vitro* e *in planta*. Estos resultados concuerdan con la cuantificación de la expresión de los diferentes genes relacionados con las respuestas defensivas de arabidopsis (Figuras 2.8 y 2.9), pues hemos comprobado cómo la presencia del gen de *Trichoderma* aumenta a nivel radicular la expresión del gen *ICS1* implicado en la síntesis de SA, mientras que, a nivel sistémico, genes de síntesis y respuesta de SA y JA aumentan significativamente sus niveles de expresión, con respecto al ecotipo silvestre. Por otro lado, cuando estas plantas son inoculadas con el patógeno necrotrofo *B. cinerea* hemos observado que aumentan los niveles de expresión de los genes relacionados con JA, en detrimento de los de SA, siendo esta respuesta mayor que la observada en el ecotipo silvestre frente al mismo patógeno (Figura 2.10). La posible implicación de este tipo de proteínas con dominios kelch en la capacidad defensiva de las plantas ha sido estudiada por varios autores, destacando proteínas como COI1 o SON1 (Kim & Delaney et al., 2002; Guo & Stotz, 2007; Lorenzo et al., 2004; Thiel et al., 2012). Además, la actividad β-glucosidasa también puede estar implicada en este tipo de respuestas defensivas, como la respuesta a heridas en plantas de arroz (Opassiri et al., 2010). Por otro lado, la respuesta diferencial observada en las plantas de *A. thaliana* transformadas, de un aumento eficiente de la ruta del JA frente al patógeno necrotrofo, superior a la del ecotipo silvestre, en detrimento de la ruta del SA, podría ser debida a que proteínas con este tipo de dominios son capaces de reducir la respuesta mediada por SA (Zhang et al., 2013; 2015).

En lo referente a las interacciones bióticas beneficiosas, al inocular estas plantas transgénicas con *T. harzianum* y *T. parareesei* pudimos observar un significativo aumento en la capacidad de colonización de sus raíces por ambos hongos, en comparación con el ecotipo silvestre de arabidopsis (Figuras 2.15 y 2.18) o la variedad comercial de colza (Figuras 2.47 y 2.52). De alguna forma, la presencia de *Thkel1* en el genoma de estas plantas facilita la colonización radicular por parte de *Trichoderma*. Esto podría ser debido a la respuesta defensiva observada a nivel radicular en las plantas de arabidopsis que expresan *Thkel1*, donde ocurre un significativo aumento de la expresión de los genes relacionados con JA, mientras disminuyen los relacionados con SA en presencia de *T. harzianum* y *T. parareesei*, en comparación con las plantas sin inocular (Figuras 2.16 y 2.19). Mientras, en el ecotipo silvestre ocurre siempre un aumento de la expresión de los genes relacionados con SA en respuesta a la inoculación con estos dos hongos; aunque en el caso de *T. parareesei* también aumenta la expresión del gen de síntesis de jasmónico *LOX1*, resultados también observados por Rubio et al. (2014) y Pérez et al. (2015). Estos resultados guardan relación

con la investigación mostrada en el Capítulo 1 de esta Tesis, donde describimos el papel clave que juega el SA en el control de la colonización de raíz por *Trichoderma* (Alonso-Ramírez et al., 2014), pudiendo ser menor la respuesta por SA en las plantas transgénicas mediante los mecanismos de ubiquitinación de las PALs descritos por Zhang et al. (2013, 2015) para proteínas con dominios kelch. Otros autores indican que este tipo de proteínas son capaces de unirse a proteínas de defensa vegetal que se acumulan en respuesta a patógenos, provocando su degradación mediada por ubiquitina, como ocurre en las células gigantes formadas por el ataque de *Meloidogyne incognita* en raíces de arabidopsis (Curtis et al., 2013).

En este sentido, comprobamos que el aumento en la colonización radicular por parte de *T. harzianum* redunda en mayor productividad de las plantas transgénicas de colza (Figura 2.49) y arabidopsis (Figura 2.17). La capacidad de *Trichoderma* para aumentar la productividad de crucíferas ya había sido comprobada con la aplicación de *T. asperellum* (Kowalska, 2014) o *T. koningii* (Wang et al., 2009), pero no en el caso de *T. harzianum*, sin diferencias significativas a nivel de producción de semillas (Mohammadi & Rokhadi, 2012). En contraposición, la inoculación de colza (Figura 2.56) y arabidopsis (Figura 2.20) con *T. parareesei* no aumenta su productividad, incluso ésta se ve reducida cuando la inoculación se realiza en las plantas transgénicas. Estos resultados son contrarios a los descritos previamente en nuestro grupo de investigación, cuando se observó promoción del crecimiento en plántulas de tomate de una (Rubio et al., 2014) o cuatro semanas (Pérez et al. (2015) colonizadas por esta misma cepa de *T. parareesei*.

Al observar que la introducción de *Thkel1* en el genoma de plantas fue capaz de aumentar la colonización de raíces de colza y arabidopsis por parte de *Trichoderma*, realizamos nuevos estudios con los transformantes de *Thkel1* silenciados, disponibles en nuestro grupo (Hermosa et al., 2011). Observamos que los transformantes silenciados de *T. harzianum* eran capaces de colonizar las raíces del ecotipo silvestre de *A. thaliana* en menor medida que la cepa silvestre T34 y control de transformación, siendo la colonización de las raíces de la variedad comercial de colza totalmente nula (Figuras 2.21 y 2.22). En lo referente a la productividad (Figura 2.24), la menor colonización de las raíces por los hongos transformantes silenciados repercute en una menor capacidad productiva, en comparación con la inoculación con T34. En este sentido, el papel de diferentes genes en la capacidad de colonización de raíces por *Trichoderma* spp. ha sido descrito por Bailey et al. (2006) en

cacao, a la vez que ha sido estudiado por otros autores. Se ha observado cómo la sobreexpresión de un gen que codifica una proteína expansina ("*swollenin*") de *T. asperellum* en otras especies de *Trichoderma* aumenta su capacidad de colonización radicular de pepino, mientras que su silenciamiento reduce significativamente la penetración en la raíz (Brotman et al., 2008). De la misma forma, se ha comprobado como aumenta la expresión del gen *TasHyd1* en *T. asperellum*, el cual codifica una hidrofobina, cuando el hongo coloniza las raíces de pepino (Viterbo & Chet, 2006), y de dos genes que codifican dos aspartil proteasas (Viterbo et al., 2004). O como el gen *ThPG1*, que codifica para una endopoligalacturonasa en *T. harzianum*, es necesario para la activación de la colonización radicular y la inducción de las defensas de la planta (Morán-Diez et al., 2009). Estos resultados descritos para otros genes concuerdan con los observados en nuestro caso, ya que hemos podido comprobar que la colonización de las plantas transgénicas de arabidopsis y colza que expresan *Thkel1* con los transformantes de *T. harzianum* silenciados en ese mismo gen, no difiere de la observada en esas mismas plantas colinizadas con T34, por lo que, aún no siendo completamente funcional el gen en el hongo, vale con que la planta lo esté expresando. En este sentido, a igual capacidad de colonización por parte del hongo, observamos la misma productividad por parte de las plantas.

Los resultados de colonización diferencial observados podrían tener relación directa con los niveles de expresión de los diferentes genes relacionados con la defensa que se han analizado (Figura 2.23). En este sentido, en las raíces del ecotipo silvestre de *A. thaliana* observamos que la inoculación con T34 y el control de transformación aumenta la expresión del gen de respuesta a SA (*PR1*), mientras que la inoculación con el transformante silenciado en *Thkel1* aumenta la vía del JA. Esta diferencia observada con el mutante pensamos que tiene que ser debida a la incapacidad que el hongo está teniendo para colonizar las raíces de la planta y que, por lo tanto, esta no requiere activar su respuesta mediada por SA para impedir la masiva colonización del tejido vegetal por parte del hongo (Alonso-Ramírez et al., 2014). En el caso de la inoculación de la línea transgénica de *A. thaliana* con el *Thkel1* observamos cómo, independientemente de que sea T34, el control de transformación o el transformante silenciado, la respuesta defensiva radicular de la planta es siempre la misma, mediada por JA, posiblemente debido, al menos parcialmente, a la capacidad de proteínas con dominios kelch repetidos para inhibir la respuesta mediada por SA (Zhang et al. 2013; 2015).

En el caso de las plantas de tomate, los resultados fueron exactamente contrarios. La inoculación con el transformante de *T. harzianum* con el gen *Thkel1* silenciado repercutía en una mayor colonización radicular que las inoculaciones con la cepa control T34 y el control de transformación. Además, la expresión de los genes relacionados con la defensa en las raíces de tomate siguió siempre la misma tendencia de aumento de SA y disminución de JA, sin importar la inoculación fúngica. Estos resultados demuestran que este gen tendría un papel importante únicamente en la colonización radicular de crucíferas por parte de *T. harzianum*, pero no de otras plantas como sucede con el tomate. Una de las principales diferencias entre las crucíferas y gran cantidad del resto de plantas es la presencia de compuestos alelopáticos, como los glucosinolatos (Cartea et al., 2010). La proteína *Thkel1* ayudaría de alguna forma a *T. harzianum* a disminuir la toxicidad antifúngica de este tipo de compuestos y permitiría su colonización, situación que no ocurre con otros hongos como los micorrícicos (Vierheilig et al., 2000).

Todos estos resultados demuestran que la expresión en hongo y en planta del gen *Thkel1* juega un papel muy importante en la capacidad de colonización de las raíces de las crucíferas por parte de *Trichoderma*. Futuras investigaciones deberían centrarse en determinar exactamente los cambios que ocurren en las raíces de estas plantas cuando son colonizadas por el hongo, estando o no el gen presente, con el fin de profundizar en la especial interacción que ocurre entre *Trichoderma* y Brassicaceae, pudiendo abrir la puerta a otras interacciones fúngicas de gran interés en agricultura.

CAPÍTULO III

Estudio de la interacción entre crucíferas transformadas con el gen *Thkel1* y hongos micorrícicos

Este capítulo ha sido eliminado de la versión electrónica pública, debido a intereses editoriales y de propiedad industrial ligados al mismo.

CONCLUSIONES

1. *Trichoderma* necesitaría suprimir, al menos parcialmente, el sistema inmune de la planta para colonizar la raíz, minimizando por tanto las defensas del hospedador. Posteriormente, se necesitaría una reactivación de las defensas mediadas por SA para evitar una invasión masiva de la raíz por parte del hongo.
2. A pesar de que *T. harzianum* es un microorganismo beneficioso para la planta, es reconocido inicialmente como un agente invasor, y hemos comprobado que el SA juega un papel clave en esta interacción, ya que, en su ausencia, la planta no es capaz de evitar la entrada del hongo en el tejido vascular, lo que provocaría la muerte posterior de la planta, comportándose como un patógeno.
3. La transformación de *A. thaliana* con el gen *Thkel1* de *T. harzianum* le proporciona una mayor productividad de silicuas bajo estrés salino, además, mejora su resistencia sistémica frente al ataque de patógenos como *B. cinerea*. Esta transformación realizada en plantas de colza les proporciona una mayor capacidad germinativa, una mayor productividad de semillas, incluso bajo estrés salino y sequía, junto con una mejor resistencia sistémica frente al ataque de patógenos como *Phoma lingam*.
4. El gen *Thkel1* juega un papel clave en la capacidad de colonización radicular por parte de *T. harzianum* en crucíferas como *A. thaliana* y *B. napus*, mejorando también la de *T. parareesei*.

(Conclusiones de la 5 a la 8 eliminadas en la versión electrónica pública)

BIBLIOGRAFÍA

Aarrouf, J., Castro-Quezada, P., Mallard, S., Caromel, B., Lizzi, Y., & Lefebvre, V. (2012). *Agrobacterium rhizogenes*-dependent production of transformed roots from foliar explants of pepper (*Capsicum annuum*): a new and efficient tool for functional analysis of genes. *Plant Cell Reports*, **31**, 391-401.

Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R., & Ncube, B. (2017). The biological activities of β-glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *Journal of Soil Science & Plant Nutrition*, **17**, 794-807.

Agerbirk, N., & Olsen, C. E. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, **77**, 16-45.

Aguilar, R., Carreón-Abud, Y., López-Carmona, D., & Larsen, J. (2017). Organic fertilizers alter the composition of pathogens and arbuscular mycorrhizal fungi in maize roots. *Journal of Phytopathology*, **165**, 448-454.

Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., John, R., Egamberdieva, D., & Gucel, S. (2015). Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. *Frontiers in Plant Science*, **6**.

Ahmed, A., Batool, K., & Bibi, A. (2017). Microbial β-Glucosidase: Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, **5**, 31-46.

Ahmed, M. S., Salem, E. A., & Helaly, A. A. (2017). Impact of Mycorrhizae and Polyethylene Mulching on Growth, Yield and Seed Oil Production of Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*). *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, **9**, 28-38.

Aikio, S., & Ruotsalainen, A. (2002). The modelled growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal plants under constant versus variable soil nutrient concentration. *Mycorrhiza*, **12**, 257-261.

Alfano, G., Ivey, M. L., Cakir, C., Bos, J. I. B., Miller, S. A., Madden, L. V., & Hoitink, H. A. J. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*, **97**, 429-437.

Alharthi, R. (2015). *A possible role for salicylic acid-induced genes in Fusarium graminearum infection*. Doctoral dissertation, University of Ottawa.

Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2013). Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*, **65**, 14-23.

Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular Plant Pathology*, **15**, 823-831.

Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. & Nicolás, C. (2015). *Trichoderma harzianum* root colonization in *Arabidopsis*. *Bio-protocol*, **5**, e1512.

Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J. A., Nicolás, G., López-Climent, M., & Nicolás, C. (2009). Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. *Plant Physiology*, **150**, 1335-1344.

Altomare C, Norvell WA, Björkman T & Harman GE. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied Environental Microbiology*, **65**, 2926-2933.

Alvarez-Nordström, S. (2014). Endophytic growth of *Clonostachys rosea* in tomato and *Arabidopsis*. Tesis Doctoral, The Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.

Amani, J., Kazemi, R., Abbasi, A. R., & Salmanian, A. H. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction analysis. *Iranian Journal of Biotechnology*, **9**, 69-71.

Amballa, H., & Bhumi, N. R. (2016). Significance of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere microflora in plant growth and nutrition. In *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer.

Amiri, R., Nikbakht, A., Rahimmalek, M., & Hosseini, H. (2017). Variation in the essential oil composition, antioxidant capacity, and physiological characteristics of *Pelargonium graveolens* L. inoculated with two species of mycorrhizal fungi under water deficit conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, **36**, 502-515.

Amirinejad, A. A., Sayyari, M., Ghanbari, F., & Kordi, S. (2017). Salicylic acid improves salinity-alkalinity tolerance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Advances in Horticultural Science*, **31**, 157-163.

An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic acid and its function in plant immunityF. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**, 412-428.

Andargie, M., & Li, J. (2016). Arabidopsis thaliana: a model host plant to study plant–pathogen interaction using rice false smut isolates of *Ustilaginoidea virens*. *Frontiers in Plant Science*, **7**.

Andresen, L. C., Jonasson, S., Ström, L., & Michelsen, A. (2008). Uptake of pulse injected nitrogen by soil microbes and mycorrhizal and non-mycorrhizal plants in a species-diverse subarctic heath ecosystem. *Plant & Soil*, **313**, 283-295.

Angelino, D., & Jeffery, E. (2014). Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*, **7**, 67-76.

Arias-Carmona, M. D. (2009). *Caracterización físico-químico y sensorial de nabiza y grelo (Brassica rapa L.)*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

Arrua, M. M., Duarte Jr, J. B., Tomm, G. O., Borsoi, A., Mezzalira, E., Piva, A. L., & Tsutsumi, C. Y. (2017). Agronomic characteristics and oil content of different genotypes of canola (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *African Journal of Agricultural Research*, **12**, 2002-2007.

Asmaa, R. A. E. H., Ahmed, M. A., Karima, M. G. E. D., Magda, A. S., & Hoda, M. E. (2017). Role of salicylic acid to improve physiological characters and bio-chemical markers of soybean (*Glycine max* L.) under sea salt stress. *International Journal of Environmental Research*, **11**, 547-556.

Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In *Biotechnology & Biology of Trichoderma* (pp. 25-40).

Atanasova, L., Jaklitsch, W. M., Komoń-Zelazowska, M., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2010). Clonal species *Trichoderma parareesei* sp. nov. likely resembles the ancestor of the cellulase producer *Hypocrea jecorina*/*T. reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 7259-7267.

Avato, P., & Argentieri, M. P. (2015). Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, **14**, 1019-1033.

Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., & Bailey, B. A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 3279-3295.

Bagde, U. S., Prasad, R., & Varma, A. (2011). Influence of culture filtrate of *Piriformospora indica* on growth and yield of seed oil in *Helianthus annus*. *Symbiosis*, **53**, 83.

Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2017). Purification and immobilization of laccase from *Trichoderma harzianum* strain HZN10 and its application in dye decolorization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **15**, 139-150.

Bagyaraj, D. J. (2014). Ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. In *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 133-146). Springer India.

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., & Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, **46**, 24-35.

Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Roberts, D. P., Thomas, S. E., Crozier, J., & Holmes, K. A. (2006). Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta*, **224**, 1449-1464.

Balestrini, R., & Lumini, E. (2017). Focus on mycorrhizal symbioses. *Applied Soil Ecology*.

Bandurska, H. (2013). Salicylic acid: an update on biosynthesis and action in plant response to water deficit and performance under drought. In *Salicylic Acid* (pp. 1-14). Springer Netherlands.

Banerjee, S., Singh, S., & Rahman, L. U. (2012). Biotransformation studies using hairy root cultures - a review. *Biotechnology Advances*, **30**, 461-468.

Baranski, R., Klocke, E., & Nothnagel, T. (2008). Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*, **156**, 513-521.

Barbeau, P. A., Holloway, T. M., Whitfield, J., Baechler, B. L., Quadrilatero, J., Loon, L. J., & Holloway, G. P. (2017). α-Linolenic acid and exercise training independently, and additively, decrease blood pressure and prevent diastolic dysfunction in obese Zucker rats. *The Journal of Physiology*, **595**, 4351-4364.

Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 343-351.

Baskar, V., Park, S. W., & Nile, S. H. (2016). An update on potential perspectives of glucosinolates on protection against microbial pathogens and endocrine dysfunctions in humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**, 2231-2249.

Baum, C., El-Tohamy, W., & Gruda, N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Scientia Horticulturae*, **187**, 131-141.

Bécard, G., & Pfeffer, P. E. (1993). Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. *Protoplasma*, **174**, 62-68.

Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., & Molina, A. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, **323**, 101-106.

Benhamou N & Chet I. (1996). Parasitism of sclerotia of *Sclerotinium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultraestructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology*, **86**, 405-416.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, **7**, 249-260.

Bhandari, P., & Garg, N. (2017). Arbuscular mycorrhizal symbiosis: a promising approach for imparting abiotic stress tolerance in crop plants. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 377-402). Springer, Singapore.

Bharathiraja, B., Sowmya, V., Sridharan, S., Yuvaraj, D., Jayamuthunagai, J., & Praveenkumar, R. (2017). Biodiesel production from microbial oil derived from wood isolate *Trichoderma reesei*. *Bioresource Technology*, **239**, 538-541.

Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 2357-2372.

Bohinc, T., Ban, S. G., Ban, D., & Stanislav, T. (2012). Glucosinolates in plant protection strategies: a review. *Archives of Biological Sciences*, **64**, 821-824.

Bojanowska, M. (2017). Changes in chemical composition of rapeseed meal during storage, influencing nutritional value of its protein and lipid fractions. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **26**, 157-164.

Bolar, J. P., Norelli, J. L., Harman, G. E., Brown, S. K., & Aldwinckle, H. S. (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Research*, **10**, 533-543.

Bora, M., & Lokhandwala, A. (2016). Mycorrhizal association: a safeguard for plant pathogen. In *Plant, Soil and Microbes* (pp. 253-275). Springer International Publishing.

Borpatragohain, P., Rose, T. J., & King, G. J. (2016). Fire and brimstone: Molecular interactions between sulfur and glucosinolate biosynthesis in model and crop brassicaceae. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1-18.

Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I (2008). Role of swollenin, an expansin like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology*, **147**, 779-789.

Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza A, Chet I, Viterbo A, Willmitzer L (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS Pathogen*, **9**, e1003221.

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from Trichoderma, in plant root colonization. *Plant Physiology*, **147**, 779-789.

Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, Á., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLOS Pathogens*, **9**, e1003221.

Bruce, T. J. A. (2014). Glucosinolates in oilseed rape: secondary metabolites that influence interactions with herbivores and their natural enemies. *Annals of Applied Biology*, **164,** 348-353.

Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research*, **21**, 171-313.

Brunner, K., Peterbauer, C. K., Mach, R. L., Lorito, M., Zeilinger, S., & Kubicek, C. P. (2003). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Current Genetics*, **43**, 289-295.

Bubner, B., & Baldwin, I. T. (2004). Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, **23**, 263-271.

Bücking, H., & Kafle, A. (2015). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. *Agronomy*, **5**, 587-612.

Bücking, H., Mensah, J. A., & Fellbaum, C. R. (2016). Common mycorrhizal networks and their effect on the bargaining power of the fungal partner in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Communicative & Integrative Biology*, **9**, e1107684.

Burow, M., Losansky, A., Müller, R., Plock, A., Kliebenstein, D. J., & Wittstock, U. (2009). The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **149**, 561-574.

Burra, D. D. (2016). *Defence related molecular signalling in potato*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**, 169-193.

Cafferty, S., & Jarvis, C. E. (2002). Typification of Linnaean plant names in Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, **51**, 529-537.

Cai, F., Chen, W., Wei, Z., Pang, G., Li, R., Ran, W., & Shen, Q. (2015). Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant & Soil*, **388**, 337-350.

Calvet, C., Pera, J., & Barea, J. M. (1993). Growth response of marigold (*Tagetes erecta* L.) to inoculation with *Glomus mosseae*, *Trichoderma aureoviride* and *Pythium ultimum* in a peat-perlite mixture. *Plant & Soil*, **148**, 1-6.

Camprubi, A., Calvet, C., & Estaun, V. (1995). Growth enhancement of *Citrus reshni* after inoculation with *Glomus intraradices* and *Trichoderma aureoviride* and associated effects on microbial populations and enzyme activity in potting mixes. *Plant & Soil*, **173**, 233-238.

Cao, L., Jiang, M., Zeng, Z., Du, A., Tan, H., & Liu, Y. (2008). *Trichoderma atroviride* F6 improves phytoextraction efficiency of mustard (*Brassica juncea* (L.) Coss. var. *foliosa* Bailey) in Cd, Ni contaminated soils. *Chemosphere*, **71**, 1769-1773.

Caporale, A. G., Sommella, A., Lorito, M., Lombardi, N., Azam, S. M., Pigna, M., & Ruocco, M. (2014). *Trichoderma* spp. alleviate phytotoxicity in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.) irrigated with arsenic-contaminated water. *Journal of Plant Physiology*, **171**, 1378-1384.

Card, S. D., Hume, D. E., Roodi, D., McGill, C. R., Millner, J. P., & Johnson, R. D. (2015). Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica*–a review. *Biological Control*, **90**, 102-112.

Cardoso-Filho, J. A., Pascholati, S. F., & Sabrinho, R. R. (2016). Mycorrhizal association and their role in plant disease protection. In *Plant, Soil & Microbes* (pp. 95-143). Springer International Publishing.

Cardoza, R. E., McCormick, S. P., Malmierca, M. G., Olivera, E. R., Alexander, N. J., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2015). Effects of trichothecene production on the plant defense response and fungal physiology: overexpression of the *Trichoderma arundinaceum* tri4 gene in *T. harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 6355-6366.

Cardoza, R. E., Vizcaino, J. A., Hermosa, M. R., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast-and Agrobacterium-mediated transformation. *The Journal of Microbiology*, **44**, 383-395.

Carrero-Carrón, I., Rubio, M. B., Niño-Sánchez, J., Navas-Cortés, J. A., Jiménez-Díaz, R. M., Monte, E., Hermosa, R. (2018). Interactions between *Trichoderma harzianum* and defoliating *Verticillium dahliae* in resistant and susceptible olive clones. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/ppa.12879.

Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, **16**, 251-280.

Caruso, G. (2010). Leucine aminopeptidase, β-glucosidase and alkaline phosphatase activity rates and their significance in nutrient cycles in some coastal Mediterranean sites. *Marine Drugs*, **8**, 916-940.

Chacón M, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J (2007). Microscopic and transcriptome analysis of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, **10**, 19-27.

Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A., Tang, H., Wang, X., & Corréa, M. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, **345**, 950-953.

Chanclud, E., & Morel, J. B. (2016). Plant hormones: A fungal point of view. *Molecular Plant Pathology*, **17**, 1289-1297.

Chandrasekaran, M., Boughattas, S., Hu, S., Oh, S. H., & Sa, T. (2014). A meta-analysis of arbuscular mycorrhizal effects on plants grown under salt stress. *Mycorrhiza*, **24**, 611-625.

Chang YC, Baker R, Kleifeld O y Chet I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*, **70**, 145-148.

Charron, C. S., & Sams, C. E. (2004). Glucosinolate content and myrosinase activity in rapid-cycling *Brassica oleracea* grown in a controlled environment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **129**, 321-330.

Chaudhary, V., Kapoor, R., & Bhatnagar, A. K. (2008). Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. *Applied Soil Ecology*, **40**, 174-181.

Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, **27**, 302-313.

Chaverri, P., Samuels, G. J., & Stewart, E. L. (2001). *Hypocrea virens* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma virens*. *Mycologia*, **93**, 1113-1124.

Chen, L., Yang, X., Raza, W., Li, J., Liu, Y., Qiu, M., & Shen, Q. (2011). *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **89**, 1653-1663.

Chen, Y., Xu, Y., Luo, W., Li, W., Chen, N., Zhang, D., & Chong, K. (2013). The F-box protein OsFBK12 targets OsSAMS1 for degradation and affects pleiotropic phenotypes, including leaf senescence, in rice. *Plant Physiology*, **163**, 1673-1685.

Chet I, Benhamou N & Haran S. (1998). Mycoparasitism and lytic enzymes. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 2) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 153-172.

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **16**, 735-743.

Contina, J. B., Dandurand, L. M., & Knudsen, G. R. (2017). Use of GFP-tagged *Trichoderma harzianum* as a tool to study the biological control of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Applied Soil Ecology*, **115**, 31-37.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C & López-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **149**, 1579-1592.

Cooke, J. C., Gemma, J. N., & Koske, R. E. (1987). Observations of nuclei in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, **79**, 331-333.

Correia, M., Heleno, R., Vargas, P., & Rodríguez-Echeverría, S. (2018). Should I stay or should I go? Mycorrhizal plants are more likely to invest in long-distance seed dispersal than non-mycorrhizal plants. *Ecology Letters*, **21**, 683-691.

Cosme, M., Franken, P., Mewis, I., Baldermann, S., & Wurst, S. (2014). Arbuscular mycorrhizal fungi affect glucosinolate and mineral element composition in leaves of *Moringa oleifera*. *Mycorrhiza*, **24**, 565-570.

Crutcher, F. K., Moran-Diez, M. E., Ding, S., Liu, J., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., & Kenerley, C. M. (2015). A paralog of the proteinaceous elicitor SM1 is involved in colonization of maize roots by *Trichoderma virens*. *Fungal Biology*, **119**, 476-486.

Cuaical, M., & David, S. (2016). *Evaluación de la eficacia de Trichoderma sp y Pseudomona sp para biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica Salesiana de Ecuador.

Curtis, R. H., Powers, S. J., Napier, J., & Matthes, M. C. (2013). The *Arabidopsis* F-box/Kelch-repeat protein At2g44130 is upregulated in giant cells and promotes nematode susceptibility. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **26**, 36-43.

da Silva-Delabona, P., Rodrigues, G. N., Zubieta, M. P., Ramoni, J., Codima, C. A., Lima, D. J., & Seiboth, B. (2017). The relation between xyr1 overexpression in *Trichoderma harzianum* and sugarcane bagasse saccharification performance. *Journal of Biotechnology*, **24***6*, 24-32.

Dabrowska, G., Baum, C., Trejgell, A., & Hrynkiewicz, K. (2014). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and expression of gene encoding stress protein–metallothionein BnMT2 in the non-host crop *Brassica napus* L. *Journal of Plant Nutrition & Soil Science*, **177**, 459-467.

Dana, M.M., Pintor-Toro, J. A., & Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology*, **142**, 722-730.

Davies, P. J. (2010). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action.* Springer.

de Jonge, R., Bolton, M. D., Kombrink, A., van den Berg, G. C., Yadeta, K. A., & Thomma, B. P. (2013). Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Research*, **23**, 1271-1282.

de León M, García- Ruíz R, González P, Insua F, Alcantara A (1978). *La colza oleaginosa*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, España.

de León, D. G., Moora, M., Öpik, M., Jairus, T., Neuenkamp, L., Vasar, M., & Zobel, M. (2016). Dispersal of arbuscular mycorrhizal fungi and plants during succession. *Acta Oecologica*, **77**, 128-135.

de Lima, F. B., Félix, C., Osório, N., Alves, A., Vitorino, R., Domingues, P., & Esteves, A. C. (2017). *Trichoderma harzianum* T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*. *Biological Control*, **106**, 99-109.

de Medeiros, H. A., de Araújo Filho, J. V., De Freitas, L. G., Castillo, P., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2017). Tomato progeny inherit resistance to the nematode *Meloidogyne javanica* linked to plant growth induced by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *Scientific Reports*, **7**, 1-13.

de Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Hofte M (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, **104**, 279-286.

de Oliveira, S. M., Moreno-Perez, S., Terrasan, C. R. F., Romero-Fernández, M., Vieira, M. F., Guisan, J. M., & Rocha-Martin, J. (2017). Covalent immobilization-stabilization of β-1, 4-endoxylanases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides. *Process Biochemistry*, **64**, 170-176.

de Souza, FMF., da Silva Fonseca, A. O., Persici, B. M., de Souza Silveira, J., Braga, C. Q., Pötter, L., & Pereira, D. I. B. (2017). *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: *In vivo* evaluation. *Revista Iberoamericana de Micologia*, **34**, 32-35.

de Vega-Bartol, J. J., Tello, V., Niño, J., Casado, V., & Díaz-Mínguez, J. M. (2013). Quantitative PCR Analysis of Double-Stranded RNA-Mediated Gene Silencing in Fungi. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 279-287). Springer New York.

Debbi, A., Boureghda, H., Monte, E., & Hermosa, R. (2018). Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy with indigenous *Trichoderma* spp. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1-11.

Deblaere R, Bytebier B, Degreve H, Deboeck F, Schell J, Vanmontagu M, Leemans J (1985). Efficient germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **122**, 403-413.

DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y. B., Nomura, K., & He, S. Y. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 9927-9932.

Degenkolb, T., Von Doehren, H., Fog Nielsen, K., Samuels, G. J., & Brückner, H. (2008). Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chemistry & Biodiversity*, **5**, 671-680.

del Carratore, R., Podda, A., & Maserti, B. E. (2017). Fungal colonization improved growth and modulated the expression of myrosinase in black cabbage. *Advances in Horticultural Science*, **31**, 115-119.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**, 19-21.

DeMars, B. G., & Boerner, R. E. (1995). Arbuscular mycorrhizal development in three crucifers. *Mycorrhiza*, **5**, 405-408.

Deveau, A., Plett, J. M., Legué, V., Frey-Klett, P., & Martin, F. (2012). Communication between plant, ectomycorrhizal fungi and helper Bacteria. In *Biocommunication of Fungi* (pp. 229-247). Springer Netherlands.

Dhanoa, B. S., Cogliati, T., Satish, A. G., Bruford, E. A., & Friedman, J. S. (2013). Update on the Kelch-like (KLHL) gene family. *Human Genomics*, **7**, 13.

di Cologna, N. D. M., Gómez-Mendoza, D. P., Zanoelo, F. F., Giannesi, G. C., de Alencar Guimarães, N. C., de Souza Moreira, L. R., & Ricart, C. A. O. (2017). Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme & Microbial Technology*, **109**, 1-10.

Dietz, K. J., Sauter, A., Wichert, K., Messdaghi, D., & Hartung, W. (2000). Extracellular β-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany*, **51**, 937-944.

Ding, Y (2014). Identification and characterization of new components of the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. PhD Thesis, University of Florida.

Distefano, G., La Malfa, S., Vitale, A., Lorito, M., Deng, Z., & Gentile, A. (2008). Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial *Trichoderma harzianum* endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*, **17**, 873-879.

Djonovic S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR y Kenerley CM. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**, 838-853.

Djonovic S, Vargas WA, Kolomiets MV, Horndeski M, Wiest A y Kenerley CM. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*, **145**, 875-889.

Dodd, S. L., Lieckfeldt, E., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*, **95**, 27-40.

Does, M. P., Dekker, B. M., de Groot, M. J., & Offringa, R. (1991). A quick method to estimate the T-DNA copy number in transgenic plants at an early stage after transformation, using inverse PCR. *Plant Molecular Biology*, **17**, 151-153.

Donoso, E. P., Bustamante, R. O., Carú, M., & Niemeyer, H. M. (2008). Water deficit as a driver of the mutualistic relationship between the fungus *Trichoderma harzianum* and two wheat genotypes. *Applied & Environmental Microbiology*, **74**, 1412-1417.

Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127-6145.

Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial Biotechnology*, **10**, 1485-1499.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, **9**, 749-759.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356.

Dufour, V., Stahl, M., & Baysse, C. (2015). The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology*, **161**, 229-243.

Egert, S., Baxheinrich, A., Lee-Barkey, Y. H., Tschoepe, D., Stehle, P., Stratmann, B., & Wahrburg, U. (2018). Effects of a hypoenergetic diet rich in α-linolenic acid on fatty acid composition of serum phospholipids in overweight and obese patients with metabolic syndrome. *Nutrition*, **49**, 74-80.

Elad, Y., Barak, R., & Chet, I. (1984). Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Biochemistry*, **16**, 381-386.

El-Atrach, F., Vierheilig, H., & Ocampo, J. A. (1989). Influence of non-host plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination. *Soil Biology & Biochemistry*, **21**, 161-163.

El-Beltagi, H. S., Ahmed, S. H., Namich, A. A. M., & Abdel-Sattar, R. R. (2017). Effect of salicylic acid and potassium citrate on cotton plant under salt stress. *Fresenius Environmental Bulletin*, **26**, 1091-1100.

Ellilä, S., Fonseca, L., Uchima, C., Cota, J., Goldman, G. H., Saloheimo, M., & Siika-aho, M. (2017). Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 1-17.

Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., & Voigt, C. A. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **161**, 1433-1444.

Elmasry, M., Elgremi, S. M., Belal, E., Elmostafa, K. E., & Eid, Y. (2017). Assessment of the performance of chicks fed with wheat bran solid fermented by *Trichoderma longibrachiatum* (SF1). *Journal of Sustainable Agricultural Science*, **43**, 115-126.

Elsheikh, E. A., & Mohamedzein, E. M. M. (1998). Effect of *Bradyrhizobium*, VA mycorrhiza and fertilisers on seed composition of groundnut. *Annals of Applied Biology*, **132**, 325-330.

Emani, C., Garcia, J. M., Lopata-Finch, E., Pozo, M. J., Uribe, P., Kim, D. J., & Rathore, K. S. (2003). Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 321-336.

Eswaran, R., & Khandeparker, L. (2017). Seasonal variation in bacterial community composition and β-glucosidase expression in a tropical monsoon-influenced estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, **80**, 273-287.

Ettlinger, M. G., & Lundeen, A. J. (1956). The structures of sinigrin and sinalbin; an enzymatic rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*, **78**, 4172-4173.

Ezawa, T., Tani, C., Hijikata, N., & Kikuchi, Y. (2016). Inorganic polyphosphates in mycorrhiza. In *Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells* (pp. 49-60). Springer International Publishing.

Faghih, S., Ghobadi, C., & Zarei, A. (2017). Response of strawberry plant cv. 'Camarosa' to salicylic acid and methyl jasmonate application under salt stress condition. *Journal of Plant Growth Regulation*, **36**, 651-659.

FAO/WHO–Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition (2010) Fats and fatty acids in human nutrition: report of an Expert Consultation; 10–14 November 2008, Geneva. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ferrigo, D., Raiola, A., Piccolo, E., Scopel, C., & Causin, R. (2014). *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Plant Pathology*, **96**, 133-142.

Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology*, **32**, 103-112.

Filion, M., St-Arnaud, M., & Fortin, J. A. (1999). Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist*, **141**, 525-533.

Fiorini, L., Guglielminetti, L., Mariotti, L., Curadi, M., Picciarelli, P., Scartazza, A., & Vannacci, G. (2016). *Trichoderma harzianum* T6776 modulates a complex metabolic network to stimulate tomato cv. Micro-Tom growth. *Plant & Soil*, **400**, 351-366.

Franciosini, A., Lombardi, B., Iafrate, S., Pecce, V., Mele, G., Lupacchini, L., & Tsuge, T. (2013). The *Arabidopsis* COP9 signalosome interacting F-BOX KELCH 1 protein forms an SCF ubiquitin ligase and regulates hypocotyl elongation. *Molecular Plant*, **6**, 1616-1629.

Francis, R., & Read, D. J. (1994). The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant & Soil*, **159**, 11-25.

Frank, B. (1885). Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernahrung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **3**, 128-45.

French, K. E. (2017). Engineering mycorrhizal symbioses to alter plant metabolism and improve crop health. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1403.

Friedl, M. A., & Druzhinina, I. S. (2012). Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma* reveals a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. *Microbiology*, **158**, 69-83.

Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjær, M. F., Thordal-Christensen, H., & Pons-Kühnemann, J. (2006). Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*, **16**, 413-419.

Fu, D. H., Jiang, L. Y., Mason, A. S., Xiao, M. L., Zhu, L. R., Li, L. Z., & Huang, C. H. (2016). Research progress and strategies for multifunctional rapeseed: A case study of China. *Journal of Integrative Agriculture*, **15**, 1673-1684.

Fu, J., Liu, Z., Li, Z., Wang, Y., & Yang, K. (2017). Alleviation of the effects of saline-alkaline stress on maize seedlings by regulation of active oxygen metabolism by *Trichoderma asperellum*. *PLOS One*, **12**, e0179617.

Fujioka, N., Fritz, V., Upadhyaya, P., Kassie, F., & Hecht, S. S. (2016). Research on cruciferous vegetables, indole-3-carbinol, and cancer prevention: A tribute to Lee W. Wattenberg. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*, 1228-1238.

Furniss, J. J., & Spoel, S. H. (2014). Cullin-RING ubiquitin ligases in salicylic acid-mediated plant immune signaling. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 154-154.

Gadamer, J. (1897). Ueber das sinigrin. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **30**, 2322-2327.

Gams, W., van der Aa, H. A., Van der Plaats-Niterink, A. J., Samson, R. A., & Stalpers, J. A. (1987). *CBS course of mycology* (No. Ed. 3). Centraalbureau voor schimmelcultures.

Ganassi, S., Grazioso, P., De Cristofaro, A., Fiorentini, F., Sabatini, M. A., Evidente, A., & Altomare, C. (2016). Long chain alcohols produced by *Trichoderma citrinoviride* have phagodeterrent activity against the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi*. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1-13.

Ganeteg, U., Ahmad, I., Jämtgård, S., Aguetoni-Cambui, C., Inselsbacher, E., Svennerstam, H., & Näsholm, T. (2017). Amino acid transporter mutants of *Arabidopsis* provides evidence that a non-mycorrhizal plant acquires organic nitrogen from agricultural soil. *Plant, Cell & Environment*, **40**, 413-423.

Gangadharan, A. (2014). *Characterization of defense pathways and genes involved in host-pathovar level resistance using Arabidopsis-Pseudomonas system*. Doctoral dissertation, The Ohio State University.

Gao, J., Zhong, Y., Wang, Y., Qu, Y., & Qian, Y. (2017). Production of the versatile cellulase for cellulose bioconversion and cellulase inducer synthesis by genetic improvement of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 272.

García-Garrido, J. M., & Ocampo, J. A. (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1377-1386.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates Arabidopsis thaliana root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, **209**, 1496-1512.

Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M., & Krajinski, F. (2012). Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal*, **69**, 510-528.

Gazzoni, D. L., & Dall'Agnol, A. (2016). Oil crops in the context of global biodiesel production. In *Green Fuels Technology* (pp. 41-82). Springer International Publishing.

Gehrmann, F. (2013). *Non-host and induced resistance in the Taphrina-Arabidopsis model system*. Doctoral dissertation, Helsingfors Universitet.

Gentile, A., Deng, Z., La Malfa, S., Distefano, G., Domina, F., Vitale, A., & Tribulato, E. (2007). Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breeding*, **126**, 146-151.

Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, **30**, 528-537.

Gernns, H., Alten, H., & Poehling, H. M. (2001). Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen–is a compensation possible? *Mycorrhiza*, **11**, 237-243.

Ghazanfar, B., Cheng, Z., Ahmad, I., Khan, A. R., Hanqiang, L., Haiyan, D., & Fang, C. (2015). Synergistic and individual effect of glomus etunicatum root colonization and acetyl salicylic acid on root activity and architecture of tomato plants under moderate NaCl stress. *Pakistan Journal of Botany*, **47**, 2047-2054.

Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M. A. T., Pirdashti, H., & Dehestani, A. (2018). The effect of Trichoderma harzianum in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae*, **230**, 134-141.

Ginzberg, I., David, R., Shaul, O., Elad, Y., Fang, Y., Van Rhijn, Pieterne L., & Hirsch, A. (1998). *Glomus intraradices* colonization regulates gene expression in tobacco roots. *Symbiosis*, **24**, 145-157.

Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A. S., & Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*, **125**, 587-593.

Glazebrook J (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phypathology*, **43**, 205-227.

Glenn, M. G., Chew, F. S., & Williams, P. H. (1985). Hyphal penetration of *Brassica* (Cruciferae) roots by a vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*, **99**, 463-472.

Glenn, M. G., Chew, F. S., & Williams, P. H. (1988). Influence of glucosinolate content of *Brassica* (Cruciferae) roots on growth of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **110**, 217-225.

Gobbato, E. (2015). Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **26**, 1-7.

Goldman GH, Pellizzon CH, Marins GH, McInerney JO y Goldman MHS. (1998). *Trichoderma* spp. genome and gene structure. En *Trichoderma and Gliocladium* (vol. 1) (eds. Kubicek CP y Harman GE), Taylor & Francis: Londres, Reino Unido. pp. 209-224.

González-Guerrero, M., Escudero, V., Saéz, Á., & Tejada-Jiménez, M. (2016). Transition metal transport in plants and associated endosymbionts: Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1-21.

Grabinski, E. (2014). Characterization of the role of salicylic acid in plant-pathogen interactions in moss. Thesis dissertation, Butler University.

Gray, J., & Shaffer, K. (2017). Effect of salicylic acid on abiotic stress resistance. In *Proceedings of the Plant Biology Symposium*.

Green, H., Larsen, J., Olsson, P. A., Jensen, D. F., & Jakobsen, I. (1999). Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in Root-Free Soil. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 1428-1434.

Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F., Bridge, P. D., & Garcia-Acha, I. (1997). Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Applied & Environmental Microbiology*, **63**, 3189-3198.

Groves, E., Howard, K., Hardy, G., & Burgess, T. (2015). Role of salicylic acid in phosphite-induced protection against Oomycetes; a *Phytophthora cinnamomi-Lupinus augustifolius* model system. *European Journal of Plant Pathology*, **141**, 559-569.

Grubb, C., Zipp, B. J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M. N., Molinski, T. F., & Abel, S. (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *The Plant Journal*, **40**, 893-908.

Grümberg, B. C., Urcelay, C., Shroeder, M. A., Vargas-Gil, S., & Luna, C. M. (2015). The role of inoculum identity in drought stress mitigation by arbuscular mycorrhizal fungi in soybean. *Biology & Fertility of Soils*, **51**, 1-10.

Guo, X., & Stotz, H. U. (2007). Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **20,** 1384-1395.

Gupta, M. M., Naqvi, N., & Kumar, P. (2017). i AMF–Centralized database of arbuscular mycorrhizal distribution, phylogeny and taxonomy. *Journal of Recent Advances in Applied Sciences*, **30**, 1-5.

Gupta, S., Rautela, P., Maharana, C., & Singh, K. P. (2017). Priming host defense against biotic stress by arbuscular mycorrhizal fungi. In *Agro-Environmental Sustainability* (pp. 255-270). Springer International Publishing.

Hajiboland, R. (2013). Role of arbuscular mycorrhiza in amelioration of salinity. In *Salt Stress in Plants*. Springer.

Hakeem, K. R., & Akhtar, M. S. (Eds.). (2016). *Plant, Soil and Microbes: Volume 2: Mechanisms and Molecular Interactions*. Springer.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.

Handelsman, J., & Stabb, E. V. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*, **8**, 1855-1869.

Hanschen, F. S., Pfitzmann, M., Witzel, K., Stützel, H., Schreiner, M., & Zrenner, R. (2018). Differences in the enzymatic hydrolysis of glucosinolates increase the defense metabolite diversity in 19 *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Physiology & Biochemistry*. In Press.

Hanschen, F. S., Lamy, E., Schreiner, M., & Rohn, S. (2014). Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 11430-11450.

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

Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2002). *Trichoderma and gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics* (Vol. 1). CRC Press.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 43-56.

Harmon, F. G., & Kay, S. A. (2003). The F box protein AFR is a positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling. *Current Biology*, **13**, 2091-2096.

Hartley, S. E., & Gange, A. C. (2009). Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. *Annual Review of Entomology*, **54**, 323-342.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Inafuku, M., Oku, H., & Fujita, M. (2017). Salicylic acid: an all-rounder in regulating abiotic stress responses in plants. In *Phytohormones-Signaling Mechanisms and Crosstalk in Plant Development and Stress Responses*. InTech.

Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Plant kelch containing F-box proteins: structure, evolution and functions. *RSC Advances*, **5**, 42808-42814.

Haughn, G., & Kunst, L. (2010). *Arabidopsis thaliana*: a model organism for molecular genetic studies in plants: How and why was arabidopsis chosen over other plants? *Biology on the Cutting Edge: Concepts, Issues, and Canadian Research around the Globe (Pearson Canada, Toronto) pp*, 7-11.

Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R., & Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology*, **130**, 1213-1220.

Heidari, M., & Karami, V. (2014). Effects of different mycorrhiza species on grain yield, nutrient uptake and oil content of sunflower under water stress. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, **13**, 9-13.

Heijden, M. G., Martin, F. M., Selosse, M. A., & Sanders, I. R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, **205**, 1406-1423.

Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, **99**, 464-469.

Hermosa R, Cardoza RE, Rubio MB, Gutiérrez S y Monte E. (2014). *Trichoderma*: Their uses and application in bioengineering and biotechnology. En *Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of Trichoderma*. (eds. Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Druzhinina I, Upadhyay RS y Tuohy M), Elsevier: Amsterdam, Holanda. pp. 125-137.

Hermosa, M. R., Grondona, I., Iturriaga, E. T., Diaz-Minguez, J. M., Castro, C., Monte, E., & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied & Environmental Microbiology*, **66**, 1890-1898.

Hermosa, M. R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaíno, J. A., & Monte, E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, **108**, 897-906.

Hermosa, R., Botella, L., Keck, E., Jiménez, J. Á., Montero-Barrientos, M., Arbona, V., & Nicolás, C. (2011a). The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1295-1302.

Hermosa, R., Botella, L., Montero-Barrientos, M., Alonso-Ramírez, A., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., & Nicolás, C. (2011b). Biotechnological applications of the gene transfer from the beneficial fungus *Trichoderma harzianum* spp. to plants. *Plant Signaling & Behavior*, **6**, 1235-1236.

Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, **16**, 69-80.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, **158**, 17-25.

Herrera, M. M. (2008). *Estudio sobre la participación y función de moléculas señal en la regulación de la simbiosis micorriza arbuscular*. Tesis doctoral, Universidad de Granada.

Herrera-Medina MJ, Gagnon H et al. (2003). Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*, **164**, 993-998.

Herrera-Medina, J., Gagnon, H., Piché, Y., Ocampo, J. A., Garcí, J. M., & Vierheilig, H. (2003). Root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi is affected by the salicylic acid content of the plant. *Plant Science*, **164**, 993-998.

Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., & Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 171.

Hetrick, B. D., Kitt, D. G., & Wilson, G. T. (1986). The influence of phosphorus fertilization, drought, fungal species, and nonsterile soil on mycorrhizal growth response in tall grass prairie plants. *Canadian Journal of Botany*, **64**, 1199-1203.

Hill, E. M., Robinson, L. A., Abdul-Sada, A., Vanbergen, A. J., Hodge, A., & Hartley, S. E. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant chemical defence: effects of colonisation on aboveground and belowground metabolomes. *Journal of Chemical Ecology*, **44**, 1-11.

Hinds, L., Kenny, O., Hossain, M. B., Walsh, D., Sheehy, E., Evans, P., & Rai, D. K. (2017). Evaluating the antibacterial properties of polyacetylene and glucosinolate compounds with further identification of their presence within various carrot (*Daucus carota*) and broccoli (*Brassica oleracea*) cultivars using high-performance liquid chromatography with a diode array detector and ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **65**, 7186-7191.

Hoebeeck, J., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). Real-time quantitative PCR as an alternative to Southern blot or fluorescence in situ hybridization for detection of gene copy number changes. In *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*, pp. 205-226.

Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, **24**, 393-416.

Hoseinzadeh, S., Shahabivand, S., & Aliloo, A. A. (2017). Toxic metals accumulation in *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*. *Microbiology*, **86**, 728-736.

Howell, C. R. (2006). Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology*, **96**, 178-180.

Howell, C. R., & Stipanovic, R. D. (1995). Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology*.

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

Hoyos-Carvajal L, Orduz S y Bissett J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, **51**, 409-416.

Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, **62**, 299-334.

Huuskonen, A., Wiebe, M. G., & Paasikallio, T. (2017). Scaling up and scaling down the production of galactaric acid from pectin using *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*, **16**, 119-130.

Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, **15**, 574-599.

Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., & Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **426**, 302-306.

Imaz I (2012). *Colza, manejo y evaluación varietal en la región mesoclimática alavesa*. Tesis de Máster, Agrobiología Ambiental, Universidad Pública de Navarra.

Inbar, J., & Chet, I. (1996). The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. In *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases* (pp. 229-231). Springer US.

Ingham, D. J., Beer, S., Money, S., & Hansen, G. (2001). Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques*, **31**, 132-141.

Jacobs S, Zechmann B, Molitor A, Trujillo M, Petutsching E, Likpa V, Kogel KH, Schafer P (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, **156**, 726-740.

Jamali, S., Panjehkeh, N., & Mohammadi, A. H. (2016). Inhibition of *Trichoderma* species from growth and zoospore production of *Phytophthora drechsleri* and their effects on hydrolytic enzymes. *Journal of Nuts*, **7**, 137-148.

Jansen, S., Baas, P., & Smets, E. (2001). Vestured pits: their occurrence and systematic importance in eudicots. *Taxon*, **50**, 135-167.

Jargeat, P., Cosseau, C., Ola'h, B., Jauneau, A., Bonfante, P., Batut, J., & Becard, G. (2004). Isolation, free-living capacities, and genome structure of "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Journal of Bacteriology*, **186**, 6876-6884.

Jia, Y., Gu, H., Wang, X., Chen, Q., Shi, S., Zhang, J., & Ma, H. (2012). Molecular cloning and characterization of an F-box family gene *CarF-box1* from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Biology Reports*, **39**, 2337-2345.

Johnston, J. S., Pepper, A. E., Hall, A. E., Chen, Z. J., Hodnett, G., Drabek, J., & Price, H. J. (2005). Evolution of genome size in Brassicaceae. *Annals of Botany*, **95**, 229-235.

Kabir, Z., O'Halloran, I. P., & Hamel, C. (1997). The proliferation of fungal hyphae in soils supporting mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. *Mycorrhiza*, **6**, 477-480.

Kachroo, A., & Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **16**, 527-533.

Kakizaki, T., & Ishida, M. (2017). Genetic profile of glucosinolate biosynthesis. In *The Radish Genome* (pp. 137-150). Springer, Cham.

Kaldorf, M., & Ludwig-Müller, J. (2000). AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, **109**, 58-67.

Kamel, L., Keller-Pearson, M., Roux, C., & Ané, J. M. (2017). Biology and evolution of arbuscular mycorrhizal symbiosis in the light of genomics. *New Phytologist*, **213**, 531-536.

Kaplan, I., Halitschke, R., Kessler, A., Rehill, B. J., Sardanelli, S., & Denno, R. F. (2008). Physiological integration of roots and shoots in plant defense strategies links above-and belowground herbivory. *Ecology Letters*, **11**, 841-851.

Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K. G. (2002a). Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum* L) to enhance the concentration and quality of essential oil. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **82**, 339-342.

Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K. G. (2002b). *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in dill (*Anethum graveolens* L.) and carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**, 459-463.

Kapoor, R., Giri, B., & Mukerji, K. G. (2004). Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology*, **93**, 307-311.

Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, **7**, 193-195.

Kashyap, P. L., Rai, P., Srivastava, A. K., & Kumar, S. (2017). *Trichoderma* for climate resilient agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **33**, 155.

Kasliwal S. & Srinivasamurthy K.M. (2016). Studies on the effect of interactions of arbuscular mycorrhiza (*Glomus mosseae*) and plant growth promoting rhizomicroorganisms (*Aspergillus awamori* and *Trichoderma harzianum*) on growth and development of *Catharanthus roseus* (L.). *International Journal of Science and Research*, **5**, 2061-2065.

Katongole, C. B., Bakeeva, A., Passoth, V., & Lindberg, J. E. (2017). Effect of solid-state fermentation with *Arxula adeninivorans* or *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) on hygienic quality and *in-vitro* digestibility of banana peels by mono-gastric animals. *Livestock Science*, **199**, 14-21.

Katsarou, D., Omirou, M., Liadaki, K., Tsikou, D., Delis, C., Garagounis, C., & Papadopoulou, K. K. (2016). Glucosinolate biosynthesis in *Eruca sativa*. *Plant Physiology & Biochemistry*, **109**, 452-466.

Kawano, T., Hiramatsu, T., & Bouteau, F. (2013). Signaling role of salicylic acid in abiotic stress responses in plants. In *Salicylic Acid* (pp. 249-275). Springer Netherlands.

Keith, R. A., & Mitchell-Olds, T. (2017). Testing the optimal defense hypothesis in nature: Variation for glucosinolate profiles within plants. *PLOS One*, **12**, e0180971.

Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 937-947.

Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B. K., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **98**, 533-544.

Khaledi, N., & Taheri, P. (2016). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Plant Protection Research*, **56**, 21-31.

Khan, M. I. R., Fatma, M., Per, T. S., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 462-479.

Khan, M. R., Rizvi, H., & Ansari, R. A. (2013). Role of salicylic acid and phenols in the resistance of tagetes species against *Meloidogyne incognita*. *Indian Journal of Nematology*, **43**, 82-85.

Khansili, N., & Rattu, G. (2017). A comparative study of hidden characteristics of canola & mustard oil. *IJCS*, **5**, 632-635.

Kidwai, M. K., & Nehra, M. (2017). Biotechnological applications of *Trichoderma* species for environmental and food security. In *Plant Biotechnology: Recent Advancements & Developments* (pp. 125-156). Springer Singapore.

Kim, H. S., & Delaney, T. P. (2002). *Arabidopsis* SON1 is an F-box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, **14**, 1469-1482.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., & Stalpers, J. A. (2001). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi* (No. Ed. 9). CABI publishing.

Kissen, R., & Bones, A. M. (2009). Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 12057-12070.

Klein, D., & Eveleigh, D. E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. *Trichoderma & Gliocladium*, **1**, 57-74.

Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, **15**, 23.

Klessig, D. F., Tian, M., & Choi, H. W. (2016). Multiple targets of salicylic acid and its derivatives in plants and animals. *Frontiers in Immunology*, **7**, 1-10.

Klopsch, R., Witzel, K., Börner, A., Schreiner, M., & Hanschen, F. S. (2017). Metabolic profiling of glucosinolates and their hydrolysis products in a germplasm collection of Brassica rapa turnips. *Food Research International*, **100**, 392-403.

Kobae, Y., & Hata, S. (2010). Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant & Cell Physiology*, **51**, 341-353.

Konvalinková, T., Püschel, D., Řezáčová, V., Gryndlerová, H., & Jansa, J. (2017). Carbon flow from plant to arbuscular mycorrhizal fungi is reduced under phosphorus fertilization. *Plant & Soil*, **419**, 319-333.

Koornneef, M., & Scheres, B. (2001). *Arabidopsis thaliana* as an experimental organism. *eLS*. Nature Publising Group.

Korkmaz, M. N., Ozdemir, S. C., & Uzel, A. (2017). Xylanase production from marine derived *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 strain isolated from Mediterranean coastal sediments. *Journal of Basic Microbiology*, **57**, 839-851.

Korolev, N., David, D. R., & Elad, Y. (2008). The role of phytohormones in basal resistance and Trichoderma-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *BioControl*, **53**, 667-683.

Koshle, S., Mahesh, S., & Swamy, S. N. (2016). Isolation and identification of *Trichoderma harzianum* from groundwater: An effective biosorbent for defluoridation of groundwater. *Journal of Environmental Biology*, **37**, 135.

Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D. G., & Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **131**, 952-962.

Kowalska, J. (2014). Organically grown *Brassica napus*–use of border strips and *Trichoderma*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, **64**, 529-536.

Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C., & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics & Biology*, **38**, 310-319.

Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., & Mukherjee, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, **12**, 1-15.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., & Kubicek, C. P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 7755-7760.

Kumar, G., Tuli, H. S., Mittal, S., Shandilya, J. K., Tiwari, A., & Sandhu, S. S. (2015). Isothiocyanates: a class of bioactive metabolites with chemopreventive potential. *Tumor Biology*, **36**, 4005-4016.

Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., & Prasad, R. (2017). *Probiotics in Agroecosystem*. Springer.

Kumar, V., Parkhi, V., Kenerley, C. M., & Rathore, K. S. (2009). Defense-related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens* in response to interaction with *Rhizoctonia solani*. *Planta*, **230**, 277-291.

Lace, B., Genre, A., Woo, S., Faccio, A., Lorito, M., & Bonfante, P. (2015). Gate crashing arbuscular mycorrhizas: in vivo imaging shows the extensive colonization of both symbionts by *Trichoderma atroviride*. *Environmental Microbiology Reports*, **7**, 64-77.

Lahrmann, U., Strehmel, N., Langen, G., Frerigmann, H., Leson, L., Ding, Y., & Zuccaro, A. (2015). Mutualistic root endophytism is not associated with the reduction of saprotrophic traits and requires a noncompromised plant innate immunity. *New Phytologist*, **207**, 841-857.

Lalitha, M., Kumar, K. A., Dharumarajan, S., Balakrishnan, N., Srinivasan, R., Nair, K. M., & Singh, S. K. (2017). Role of vesicular-arbuscular mycorrhizae in mobilization of soil phosphorus. In *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 317-331). Springer, Singapore.

Lambers, H., & Teste, F. P. (2013). Interactions between arbuscular mycorrhizal and non-mycorrhizal plants: do non-mycorrhizal species at both extremes of nutrient availability play the same game? *Plant, Cell & Environment*, **36**, 1911-1915.

Lambers, H., Ahmedi, I., Berkowitz, O., Dunne, C., Finnegan, P. M., Hardy, G. E. S. J., & Teste, F. P. (2013). Phosphorus nutrition of phosphorus-sensitive Australian native plants: threats to plant communities in a global biodiversity hotspot. *Conservation Physiology*, 1, 1-21.

Lambers, H., Martinoia, E., & Renton, M. (2015). Plant adaptations to severely phosphorus-impoverished soils. *Current Opinion in Plant Biology*, **25**, 23-31.

Larichev, V. F., Smirnova, I. P., Syatkin, S. P., Myandina, G. I., Chibisov, S. M., & Ryskina, E. A. (2017). Effects of L-lysine-α-oxidase from *Trichoderma in vitro* experiments on the model of viruses as sindbis, tick-borne encephalitis, West Nile, Tahyna and Dhori. *Research Journal of Pharmacy & Technology*, **10**, 765-768.

Latef, A. A. H. A., Hashem, A., Rasool, S., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Egamberdieva, D., & Ahmad, P. (2016). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: A review. *Journal of Plant Biology*, **59**, 407-426.

Le, M. H. A., Buchet, A. D. G., Beltranena, E., Gerrits, W. J. J., & Zijlstra, R. T. (2017). Digestibility and intestinal fermentability of canola meal from *Brassica juncea* and *Brassica napus* fed to ileal-cannulated grower pigs. *Animal Feed Science & Technology*, **234**, 43-53.

Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., & Dangl, J. L. (2015). Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, **349**, 860-864.

Lee, J. M., Kim, Y. R., Kim, J. K., Jeong, G. T., Ha, J. C., & Kong, I. S. (2015). Characterization of salt-tolerant β-glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from Bacillus sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, **38**, 1335-1346.

Lee, J., Lee, S., & Young, J. P. W. (2008). Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, **65**, 339-349.

Lee, Y., Krishnamoorthy, R., Selvakumar, G., Kim, K., & Sa, T. (2015). Alleviation of salt stress in maize plant by co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and *Methylobacterium oryzae* CBMB20. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **58**, 533-540.

Leelavathi, M. S., Vani, L., & Reena, P. (2014). Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *Int. J. Curr. Microbiological Applied Science* **3**, 96-103.

Lenoir, I., Fontaine, J., & Sahraoui, A. L. H. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry*, **123**, 4-15.

Leonetti, P., Zonno, M. C., Molinari, S., & Altomare, C. (2017). Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Reports*, **36**, 621-631.

Leplat, J., Heraud, C., Gautheron, E., Mangin, P., Falchetto, L., & Steinberg, C. (2016). Colonization dynamic of various crop residues by *Fusarium graminearum* monitored through real-time PCR measurements. *Journal of Applied Microbiology*, **121**, 1394-1405.

Lewis, J. A., & Papavizas, G. C. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology*, **74**, 1240-1243.

Li, B., Li, C., Lin, F., Zhou, L., Qin, L., Jin, M., & Zhou, Z. (2017). Cellulase hyper-production by *Trichoderma reesei* mutant *SEU-7* on lactose. *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 228-243.

Li, F., Zhang, X., Hu, R., Wu, F., Ma, J., Meng, Y., & Fu, Y. (2013). Identification and molecular characterization of *FKF1* and *GI* homologous genes in soybean. *PLOS One*, **8**, e79036.

Li, H. Y., Luo, Y., Zhang, X. S., Shi, W. L., Gong, Z. T., Shi, M., & Song, X. Y. (2014). Trichokonins from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2 induce resistance against Gram-negative *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Chinese cabbage. *FEMS Microbiology Letters*, **354**, 75-82.

Li, J. (2014). Role of *WRKY* transcription factors in *Arabidopsis* development and stress responses. Academic Dissertation, University of Helsinki.

Li, T., Liu, T., Zheng, C., Kang, C., Yang, Z., Yao, X., & Zhang, C. (2017). Changes in soil bacterial community structure as a result of incorporation of *Brassica* plants compared with continuous planting eggplant and chemical disinfection in greenhouses. *PLOS One*, **12**, e0173923.

Li, X., & Kushad, M. M. (2004). Correlation of glucosinolate content to myrosinase activity in horseradish (*Armoracia rusticana*). *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **52**, 6950-6955.

Li, Z., Hansen, J. L., Liu, Y., Zemetra, R. S., & Berger, P. H. (2004). Using real-time PCR to determine transgene copy number in wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**, 179-188.

Libardi, N., Soccol, C. R., Góes-Neto, A., de Oliveira, J., & de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, **57**, 190-199.

Lieckfeldt, E., Samuels, G. J., Nirenberg, H. I., & Petrini, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 2418-2428.

Lin X., Kaul S., Rounsley S., Shea T.P., Benito M.I., ... & Venter J.C. (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **402**,761-768.

Lin, M., Shen, X., & Chen, X. (2010). PAIR: the predicted *Arabidopsis* interactome resource. *Nucleic Acids Research*, *39*, 1-17.

Lin, J., Zhang, X., Song, B., Xue, W., Su, X., Chen, X., & Dong, Z. (2017). Improving cellulase production in submerged fermentation by the expression of a *Vitreoscilla* hemoglobin in *Trichoderma reesei*. *AMB Express*, **7**, 203.

Lindahl, B. D., & Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi–potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist*, **205**, 1443-1447.

Liu, M., Sun, Z. X., Zhu, J., Xu, T., Harman, G. E., & Lorito, M. (2004). Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *Journal-Zhejiang University Science*, **5**, 133-136.

Liu, N. Y., Bao, Z. R., Li, J., Ao, X. Y., Zhu, J. Y., & Chen, Y. H. (2017). Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma atroviride* strain SS003 in the presence of cell wall of *Cronartium ribicola*. *Genes & Genomics*, *39*, 473-484.

Liu, X., Rockett, K. S., Kørner, C. J., & Pajerowska-Mukhtar, K. M. (2015). Salicylic acid signalling: new insights and prospects at a quarter-century milestone. *Essays in Biochemistry*, **58**, 101-113.

Liu, Z., Ding, Y., Wang, F., Ye, Y., & Zhu, C. (2016). Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants. *Plant Cell Reports*, **35**, 719-731.

Lo, C. T., Nelson, E. B., & Harman, G. E. (1996). Biological control of turfgrass diseases with a rhizosphere competent strain of *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease*.

Lopez, C. M., Govoni, S., Battaini, F., Bergamaschi, S., Longoni, A., Giaroni, C., & Trabucchi, M. (1991). Effect of a new cognition enhancer, alpha-glycerylphosphorylcholine, on scopolamine-induced amnesia and brain acetylcholine. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **39**, 835-840.

López-Ráez, J. A., Charnikhova, T., Gómez-Roldán, V., Matusova, R., Kohlen, W., De Vos, R., & Bouwmeester, H. (2008). Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytologist*, **178**, 863-874.

López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fernández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V., & Pozo, M. J. (2010). Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 2589-2601.

Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2004). *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **16**, 1938-1950.

Lorito M, Woo SL, Harman GE, Monte E (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathol*, **48**, 395-418.

Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., & Tuzun, S. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, ***95***, 7860-7865.

Lovelock, D. A. (2013). *Salicylic acid and its role in defence against Plasmodiophora brassicae* (Thesis Dissertation). Deakin University.

Lu, Q., Zhang, T., Zhang, W., Su, C., Yang, Y., Hu, D., & Xu, Q. (2018). Alleviation of cadmium toxicity in *Lemna minor* by exogenous salicylic acid. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, **147**, 500-508.

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., & Jansson, J. K. (2004). *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied & Environmental Microbiology*, **70**, 3073-3081.

Lumini, E., Bianciotto, V., Jargeat, P., Novero, M., Salvioli, A., Faccio, A., & Bonfante, P. (2007). Presymbiotic growth and sporal morphology are affected in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* cured of its endobacteria. *Cellular Microbiology*, **9**, 1716-1729.

Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., & Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 183-193.

Luo, B., Wang, J., Li, X., Lu, W., Yang, J., Hu, Y., & Wen, S. (2017). New mild and simple approach to isothiocyanates: a class of potent anticancer agents. *Molecules*, **22**, 773-785.

Mackay, J. E., Cavagnaro, T. R., Stöver, D. S. M., Macdonald, L. M., Grønlund, M., & Jakobsen, I. (2017). A key role for arbuscular mycorrhiza in plant acquisition of P from sewage sludge recycled to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **115**, 11-20.

Madaure, J. T., & Mashela, P. W. (2017). Influence of cucurbitacin-containing phytonematicides on nematode biocontrol agent: *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Ecological & Wildlife Sciences*, **4**.

Mahesh, H. M., Murali, M., Pal, M. A. C., Melvin, P., & Sharada, M. S. (2017). Salicylic acid seed priming instigates defense mechanism by inducing PR-proteins in *Solanum melongena* L. upon infection with *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Physiology & Biochemistry*, 117, 12-23.

Malboobi M.A. & Lefebvre D.D. (1997). A phosphate-starvation inducible-glucosidase gene (*psr3.2*) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family**.** *Plant Molecular Biology*, **34,** 57–68,

Malmierca MG, Barua J, McCormick SP, Izquierdo-Bueno I, Cardoza RE, Alexander NJ, Hermosa R, Collado IG, Monte E & Gutiérrez S. (2015a). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environmental Microbiology*, **17**, 1103-1118.

Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Collado IG, Hermosa R, Monte E & Gutierrez S. (2013). Relevance of trichothecenes in fungal physiology: disruption of *tri5* in *Trichoderma arundinaceum*. *Fungal Genetics & Biology*, **53**, 22-33.

Malmierca MG, Cardoza RE, Alexander NJ, McCormick SP, Hermosa RM, Monte E & Gutiérrez S. (2012). Involvement of *Trichoderma trichothecenes* in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied Environmental Microbiology*, **78**, 4856-4868.

Malmierca, M. G., McCormick, S. P., Cardoza, R. E., Monte, E., Alexander, N. J., & Gutiérrez, S. (2015b). Trichodiene production in a *Trichoderma harzianum erg1*-silenced strain provides evidence of the importance of the sterol biosynthetic pathway in inducing plant defense-related gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **28**, 1181-1197.

Manavalan, T., Liu, R., Zhou, Z., & Zou, G. (2017). Optimization of acetyl xylan esterase gene expression in *Trichoderma reesei* and its application to improve the saccharification efficiency on different biomasses. *Process Biochemistry*, **58**, 160-166.

Manoharachary, C., & Kunwar, I. K. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi: the Nature's gift for sustenance of plant wealth. In *Plant Biology & Biotechnology* (pp. 217-230). Springer India.

MAPAMA (2017). Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Cultivos Herbáceos e Industriales. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España. Consultada en Noviembre de 2017 (http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/sup_oleag_ue_201617_tcm7-362824.pdf).

Marmeisse, R., & Girlanda, M. (2016). 10 Mycorrhizal fungi and the soil carbon and nutrient cycling. In *Environmental and Microbial Relationships* (pp. 189-203). Springer International Publishing.

Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., & Gigante, S. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*, **50**, 307-321.

Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Veneault-Fourrey, C., & Hibbett, D. S. (2016). Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, **14**, 760-773.

Martínez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M y Baccou JC. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heatdenatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*, **127**, 334-344.

Martinez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A., & Godeas, A. (2004). Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza*, **14**, 79-84.

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., & Danchin, E. G. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, **26**, 553.

Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., & Danchin, E. G. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. Hypocrea jecorina). *Nature Biotechnology*, **26**, 553-560.

Martínez-Ballesta, MC., & Carvajal, M. (2015). Myrosinase in Brassicaceae: the most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochemistry Reviews*, **14**, 1045-1051.

Martínez-Medina, A., Appels, F. V., & Van Wees, S. C. (2017). Impact of salicylic acid-and jasmonic acid-regulated defences on root colonization by *Trichoderma harzianum* T-78. *Plant Signaling & Behavior*, **12**, e1345404.

Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A., & Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 206-218.

Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Lloret, E., & Roldán, A. (2009). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on *Fusarium* wilt in melon plants grown in seedling nurseries. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **89**, 1843-1850.

Martínez-Medina, A., Pascual, J. A., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., & Roldán, A. (2010). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology*, **100**, 682-688.

Martínez-Medina, A., Roldán, A., & Pascual, J. A. (2011). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology*, **47**, 98-105.

Martínez-Medina, A., Van Wees, S., & Pieterse, C. M. (2017). Airborne signals by *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell & Environment*, **40**, 2691-2705.

Maselli, G. A., Slamovits, C. H., Bianchi, J. I., Vilarrasa-Blasi, J., Caño-Delgado, A. I., & Mora-García, S. (2014). Revisiting the evolutionary history and roles of protein phosphatases with Kelch-like domains in plants. *Plant Physiology*, **164**, 1527-1541.

Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M., & Accotto, G. P. (2002). Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology*, **2**, 20-30.

Massalha, H., Korenblum, E., Tholl, D., & Aharoni, A. (2017). Small molecules below-ground: the role of specialized metabolites in the rhizosphere. *The Plant Journal*, **90**, 788-807.

Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, **100**, 1213-1221.

Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of Lotus japonicus. *Microbes & Environments*, **26**, 128-134.

Mathys, J., De Cremer, K., Timmermans, P., Van Kerckhove, S., Lievens, B., Vanhaecke, M., ... & De Coninck, B. (2012). Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 108-133.

Mazin, M., Andreadis, S. S., Jenkins, N. E., & Rajotte, E. G. (2017). The mushroom sciarid fly, *Lycoriella ingenua*, benefits from its association with green mold disease (*Trichoderma aggressivum*) in commercial mushroom production. *Journal of Pest Science*, **9**, 815-822.

McAllister, C. Á., Garcia-Romera, I., Godeas, A., & Ocampo, J. A. (1994). Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. *Soil Biology & Biochemistry*, **26**, 1363-1367.

Mejicanos, G. A., Regassa, A., & Nyachoti, C. M. (2017). Effect of high canola meal content on growth performance, nutrient digestibility and fecal bacteria in nursery pigs fed either corn or wheat based diets. *Animal Feed Science & Technology*, **231**, 59-66.

Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, **32**, 62-85.

Millet, Y. A., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D., & Ausubel, F. M. (2010). Innate immune responses activated in *Arabidopsis* roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell*, **22**, 973-990.

Minic, Z. (2008). Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta*, **227**, 723-740.

Miransari, M. (2016). Stress and mycorrhizal plant. In *Recent Advances on Mycorrhizal Fungi* (pp. 63-79). Springer.

Mishra, A. (2017). Journey of *Trichoderma*: plant stress amelioration to nanosynthesis. *Genetics & Molecular Biology Research*, **1**, 1-2.

Miyazaki, Y., Yoshizumi, T., Takase, T., Matsui, M., & Kiyosue, T. (2011). Overexpression of LOV KELCH PROTEIN 2 enhances cell elongation and increases cell number and ploidy in the hypocotyl of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, **28**, 267-272.

Moghadam, R. G., Yazdanpanah-Samani, M., Zamani, M. R., & Motallebi, M. (2015). Heterologous expression of *chit36* gene from *Trichoderma atroviride* in canola reduces development of lesion caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Iranian Journal of Science & Technology*, **39**, 331-339.

Mohammadi, K., & Rokhzadi, A. (2012). An integrated fertilization system of canola (*Brassica napus* L.) production under different crop rotations. *Industrial Crops & Products*, **37**, 264-269.

Monte, E. (2001). Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*, **4**, 1-4.

Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Nicolas, C., & Monte, E. (2010). Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum hsp70* gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, **167**, 659-665.

Mora, A. A., & Earle, E. D. (2001). Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Molecular Breeding*, **8**, 1-9.

Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M., & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**, 1021-1031.

Morán-Diez, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E., & Nicolás, C. (2012). Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 614-620.

Morán-Diez, M. E., Trushina, N., Lamdan, N. L., Rosenfelder, L., Mukherjee, P. K., Kenerley, C. M., & Horwitz, B. A. (2015). Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. *BMC Genomics*, **16**, 8-33.

Morton, J. B., & Benny, G. L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, **37**, 471-491.

Mukherjee, M., Hadar, R., Mukherjee, P. K., & Horwitz, B. A. (2003). Homologous expression of a mutated beta-tubulin gene does not confer benomyl resistance on *Trichoderma virens*. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 861-867.

Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S., & Kenerley, C. M. (2012). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology*, **158**, 155-165.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., & Kenerley, C. M. (2013). *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology*, **51**, 105-129.

Mukherjee, P. K., Wiest, A., Ruiz, N., Keightley, A., Moran-Diez, M. E., McCluskey, K., & Kenerley, C. M. (2010). Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. *Journal of Biological Chemistry*, **30**, 1-21.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.

Mutawila C, Vinale F, Halleen F, Lorito M y Mostert L. (2016). Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by *Trichoderma* species used for the control of grapevine trunk diseases. *Plant Pathology*, **65**, 104-115.

Muthulakshmi, S., & Lingakumar, K. (2017). Role of salicylic acid (SA) in plants–A review. *International Journal of Advanced Research*, **3**, 33-37.

Nakano, R. T., Piślewska-Bednarek, M., Yamada, K., Edger, P. P., Miyahara, M., Kondo, M., & Hara-Nishimura, I. (2017). PYK10 myrosinase reveals a functional coordination between endoplasmic reticulum bodies and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, ***89*,** 204-220.

Nathan, V. K., Rani, M. E., Rathinasamy, G., & Dhiraviam, K. N. (2017). Low molecular weight xylanase from *Trichoderma viride* VKF3 for bio-bleaching of newspaper pulp. *BioResources*, **12**, 5264-5278.

Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, **67**, 149-156.

Newsham, K. K., Upson, R., & Read, D. J. (2009). Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. *Fungal Ecology*, **2**, 10-20.

Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K., & Monte, E. (2014). Trichoderma genes in plants for stress tolerance-status and prospects. *Plant Science*, **228**, 71-78.

Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1-18.

Niño-Sánchez, J., Tello, V., Casado-del Castillo, V., Thon, M. R., Benito, E. P., & Díaz-Mínguez, J. M. (2015). Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)

by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 234-248.

Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., & Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, **301**, 969-972.

Nongmaithem, N., Roy, A., & Bhattacharya, P. M. (2017). Potential of *Trichoderma* spp. on growth promotion and mitigating cadmium uptake in rice plant under the metal stress ecosystem. *International Journal of Current Microbiology Appied Science* **6**, 992-1010.

Nour-Eldin, H. H., Madsen, S. R., Engelen, S., Jørgensen, M. E., Olsen, C. E., Andersen, J. S., & Halkier, B. A. (2017). Reduction of antinutritional glucosinolates in Brassica oilseeds by mutation of genes encoding transporters. *Nature Biotechnology*, **35**, 377-382.

Novais, C. B. D., Pepe, A., Siqueira, J. O., Giovannetti, M., & Sbrana, C. (2017). Compatibility and incompatibility in hyphal anastomosis of arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola*, **74**, 411-416.

Obregón-Cano, S. (2016). Estudio del contenido y valor nutracéutico de los glucosinolatos y otros compuestos presentes en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) cultivados en el sur de España. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

Ocampo, J. A. (1986). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of "host" and "non-host" plants: effect on the growth responses of the plants and competition between them. *Soil Biology & Biochemistry*, **18**, 607-610.

Ocampo, J. A., Martin, J., & Hayman, D. S. (1980). Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. *New Phytologist*, **84**, 27-35.

Olsson, P. A., & Tyler, G. (2004). Occurrence of non-mycorrhizal plant species in south Swedish rocky habitats is related to exchangeable soil phosphate. *Journal of Ecology*, **92**, 808-815.

Opassiri, R., Maneesan, J., Akiyama, T., Pomthong, B., Jin, S., Kimura, A., & Cairns, J. R. K. (2010). Rice Os4BGlu12 is a wound-induced β-glucosidase that hydrolyzes cell wall-β-glucan-derived oligosaccharides and glycosides. *Plant Science*, **179**, 273-280.

Oros, G., & Naár, Z. (2017). Mycofungicide: *Trichoderma* based preparation for foliar applications. *American Journal of Plant Sciences*, **8**, 113-125.

Osbourn, A. (2010). Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. *Trends in Genetics*, **26**, 449-457.

Oszust, K., Pawlik, A., Siczek, A., Janusz, G., Gryta, A., Bilińska-Wielgus, N., & Frąc, M. (2017). Efficient cellulases production by *Trichoderma atroviride* G79/11 in submerged culture based on soy flour-cellulose-lactose. *BioResources*, **12**, 8468-8489.

Paasikallio, T., Huuskonen, A., & Wiebe, M. G. (2017). Scaling up and scaling down the production of galactaric acid from pectin using *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell FActories*, **16**, 1-11.

Pal, S., Singh, H. B., Farooqui, A., & Rakshit, A. (2016). Commercialization of arbuscular mycorrhizal technology in agriculture and forestry. In *Agriculturally Important Microorganisms* (pp. 97-105). Springer Singapore.

Palmer, I. A., Shang, Z., & Fu, Z. Q. (2017). Salicylic acid-mediated plant defense: Recent developments, missing links, and future outlook. *Frontiers in Biology*, **12**, 258-270.

Pan, D., Li, Q. X., Lin, Z., Chen, Z., Tang, W., Pan, C., & Zeng, D. (2017). Interactions between salicylic acid and antioxidant enzymes tilting the balance of H_2O_2 from photorespiration in non-target crops under halosulfuron-methyl stress. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, **143**, 214-223.

Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Shelat, H. N., & Vyas, R. V. (Eds.). (2018). *Microorganisms for Green Revolution: Volume 2: Microbes for Sustainable Agro-ecosystem* (Vol. 7). Springer.

Panpatte, D. G., Jhala, Y. K., Vyas, R. V., & Shelat, H. N. (Eds.). (2017). *Microorganisms for Green Revolution: Volume 1: Microbes for Sustainable Crop Production* (Vol. 6). Springer.

Parnetti, L., Mignini, F., Tomassoni, D., Traini, E., & Amenta, F. (2007). Cholinergic precursors in the treatment of cognitive impairment of vascular origin: ineffective approaches or need for re-evaluation? *Journal of the Neurological Sciences*, **257**, 264-269.

Paulitz, T. C. (1990). Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. *New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Proceedings of a UCLA colloquim held at Frisco, Colorado, January 20-27, 1989.*, 713-724.

Pawar, P. B., Khadilkar, J. P., Kulkarni, M. V., & Melo, J. S. (2018). An approach to enhance nutritive quality of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seed oil through endo mycorrhizal fertigation. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, **14**, 18-22.

Peele, H. M. (2015). *Defense gene responses toward necrotrophic fungi in Arabidopsis thaliana*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

Pelagio-Flores, R., Esparza-Reynoso, S., Garnica-Vergara, A., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, A. (2017). *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in Arabidopsis root growth and determines fungal phytostimulation. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 822-835.

Peleg-Grossman S, Golani Y, Kaye Y, Melamed-Book N, Levine A (2009). NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLOS ONE*, **4**, e8399.

Pellegrino, E., Öpik, M., Bonari, E., & Ercoli, L. (2015). Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. *Soil Biology & Biochemistry*, **84**, 210-217.

Pérez, E., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Bettiol, W., Monte, E., & Hermosa, R. (2015). The importance of chorismate mutase in the biocontrol potential of *Trichoderma parareesei*. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1-14.

Persoon CH. (1794). *Dispositio methodica fungorum in Classes, Ordines, Familias et Genera*.

Peterson, R. L. (2012). 11 Ectendomycorrhizas: occurrence, structural characteristics, and possible roles. In *Fungal Associations* (pp. 197-205). Springer Berlin Heidelberg.

Peterson, R. L., Massicotte, H. B., & Melville, L. H. (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45-e45.

Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, **5**, 308-316.

Pirozynski, K. A., & Malloch, D. W. (1975). The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems*, **6**, 153-164.

Pitann, B., Heyer, C., & Mühling, K. H. (2017). The effect of sulfur nutrition on glucosinolate patterns and their breakdown products in vegetable crops. In *Sulfur Metabolism in Higher Plants-Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects* (pp. 61-73). Springer, Cham.

Podsędek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT-Food Science & Technology*, **40**, 1-11.

Pongrac, P., Vogel-Mikuš, K., Poschenrieder, C., Barceló, J., Tolrà, R., & Regvar, M. (2013). Arbuscular mycorrhiza in glucosinolate-containing plants: the story of the metal hyperaccumulator Noccaea (Thlaspi) praecox (Brassicaceae). *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, **2**, 1023-1032.

Poosakkannu, A., Nissinen, R., & Kytöviita, M. M. (2017). Native arbuscular mycorrhizal symbiosis alters foliar bacterial community composition. *Mycorrhiza*, **27**, 801-810.

Poveda J. (2017). El triángulo del género *Brassica*. *DiarioE*.

Pozo, M. J., & Azcón-Aguilar, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 393-398.

Pozo, M. J., Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & Barea, J. M. (2013). Root allies: arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. In *Symbiotic Endophytes* (pp. 289-307). Springer Berlin Heidelberg.

Pozo, M. J., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & García-Garrido, J. M. (2015). Phytohormones as integrators of environmental signals in the regulation of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, **205**, 1431-1436.

Pozo, M. J., Verhage, A., García-Andrade, J., García, J. M., & Azcón-Aguilar, C. (2009). Priming plant defence against pathogens by arbuscular mycorrhizal fungi. In *Mycorrhizas-functional processes and ecological impact* (pp. 123-135). Springer, Berlin, Heidelberg.

Priyadharsini, P., & Muthukumar, T. (2016). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and potassium-solubilizing microorganisms on agricultural productivity. In *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (pp. 111-125). Springer.

Provedo R & Díez-Antolínez R (2006). *El cultivo de la colza en Castilla y León*. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

Qian, Y., Zhong, L., Gao, J., Sun, N., Wang, Y., Sun, G., & Zhong, Y. (2017). Production of highly efficient cellulase mixtures by genetically exploiting the potentials of *Trichoderma reesei* endogenous cellulases for hydrolysis of corncob residues. *Microbial Cell Factories*, **16**, 207.

Quandt, H. J., Pühler, A., & Broer, I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **6**, 699-706.

Quiroga, G., Erice, G., Aroca, R., Chaumont, F., & Ruiz-Lozano, J. M. (2017). Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1-15.

Rai, S. (2017). *Genomic diversity of antagonistic Trichoderma species against phytopatogen of Lycopersicon esculentum Mill.* Doctoral Dissertation, Sam Higginbottom University.

Rajinikanth, R., Rao, M. S., Pavani, K. V., & Umamaheswari, R. (2016). Molecular characterization of chitinase (*chi18-5*) and its expression in *Trichoderma viride*: role on nematode egg parasitism. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, **5**, 56-64.

Rapparini, F., & Peñuelas, J. (2014). Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1* (pp. 21-42). Springer, New York, NY.

Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant & Soil*, **244**, 149-163.

Ray, G., Noori, M. T., & Ghangrekar, M. M. (2017). Novel application of peptaibiotics derived from *Trichoderma* sp. for methanogenic suppression and enhanced power generation in microbial fuel cells. *RSC Advances*, **7**, 10707-10717.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 89-123.

Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R., & Zeilinger, S. (2005). The G protein α subunit Tga1 of Trichoderma atroviride is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics & Biology*, **42**, 749-760.

Rich, M. K., Nouri, E., Courty, P. E., & Reinhardt, D. (2017). Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: bread and butter? *Trends in Plant Science*, 22, 652-660.

Rifai, M. A. (1969). Revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, **116**, 1-56.

Rinaudo, V., Bàrberi, P., Giovannetti, M., & van der Heijden, M. G. (2010). Mycorrhizal fungi suppress aggressive agricultural weeds. *Plant & Soil*, **333**, 7-20.

Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A., & Herrera-Estrella, A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-protein α-subunit gene tga1 is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryotic Cell*, **1**, 594-605.

Rodríguez, S. G. (2006). *Efecto de las micorrizas arbusculares sobre la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado en plantas de tomate ("Solanum esculentum")*. Editorial de la Universidad de Granada.

Ron, M., & Avni, A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell*, **16**, 1604-1615.

Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J. M., Schuster, S., & Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *The Plant Journal*, **32,** 1049-1055.

Roth, R., & Paszkowski, U. (2017). Plant carbon nourishment of arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **39,** 50-56.

Roth-Bejerano, N., Navarro-Ródenas, A., & Gutiérrez, A. (2014). Types of mycorrhizal association. In *Desert Truffles* (pp. 69-80). Springer Berlin Heidelberg.

Rouphael, Y., Franken, P., Schneider, C., Schwarz, D., Giovannetti, M., Agnolucci, M., & Colla, G. (2015). Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, **196**, 91-108.

Roychowdhury, D., Majumder, A., & Jha, S. (2013). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges. In *Biotechnology for medicinal plants* (pp. 29-68). Springer Berlin Heidelberg.

Ruano-Rosa, D., Prieto, P., Rincón, A. M., Gómez-Rodríguez, M. V., Valderrama, R., Barroso, J. B., & Mercado-Blanco, J. (2016). Fate of *Trichoderma harzianum* in the olive rhizosphere: time course of the root colonization process and interaction with the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. *BioControl*, **61**, 269-282.

Rubio, M. B., Domínguez, S., Monte, E., & Hermosa, R. (2012). Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology*, **158**, 119-128.

Rubio, M. B., Hermosa, R., Vicente, R., Gómez-Acosta, F. A., Morcuende, R., Monte, E., & Bettiol, W. (2017). The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1-14.

Rubio, M. B., Quijada, N. M., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E., & Hermosa, R. (2014). Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Applied & Environmental Microbiology*, **80**, 1864-1873.

Ryu, S. M., Lee, H. M., Song, E. G., Seo, Y. H., Lee, J., Guo, Y., & Lee, D. (2017). Antiviral activities of trichothecenes isolated from *Trichoderma albolutescens* against Pepper Mottle Virus. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **65**, 4273-4279.

Sadfi-Zouaoui, N., Hannachi, I., Rouaissi, M., Hajlaoui, M. R., Rubio, M. B., Monte, E., & Hermosa, M. R. (2009). Biodiversity of *Trichoderma* strains in Tunisia. *Canadian Journal of Microbiology*, **55**, 154-162.

Sahu, G. K. (2013). Salicylic acid: Role in plant physiology and stress tolerance. In *Molecular Stress Physiology of Plants* (pp. 217-239). Springer India.

Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & 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*, **131**, 15-26.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Samolski I (2014). Identificación de genes inducidos en la cepa de biocontrol *Trichoderma harzianum* CECT 2413 durante la interacción con plantas de tomate. caracterización biológico-funcional de los genes *qid74* y *asp1*". Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.

Samolski, I., Rincón, A. M., Pinzón, L. M., Viterbo, A., & Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, **158**, 129-138.

Sánchez, G. R., Mercado, E. C., de la Cruz, H. R., & Pineda, E. G. (2013). El acido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, **12**, 90-95.

Sánchez-Pujante, P. J., Borja-Martínez, M., Pedreño, M. Á., & Almagro, L. (2017). Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant in vitro cultures. *Planta*, **246**, 19-32.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **74**, 5463-5467.

Santander, C., Aroca, R., Ruiz-Lozano, J. M., Olave, J., Cartes, P., Borie, F., & Cornejo, P. (2017). Arbuscular mycorrhiza effects on plant performance under osmotic stress. *Mycorrhiza*, **27**, 639-657.

Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J. A., Llobell, A., Hermosa, R., & Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*, **46**, 277-286.

Scapicchio, P. L. (2013). Revisiting choline alphoscerate profile: a new, perspective, role in dementia? *International Journal of Neuroscience*, **123**, 444-449.

Schirmböck, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., & Kubicek, C. P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied & Environmental Microbiology*, **60**, 4364-4370.

Schmitz, J., Heinrichs, L., Scossa, F., Fernie, A. R., Oelze, M. L., Dietz, K. J., & Häusler, R. E. (2014). The essential role of sugar metabolism in the acclimation response of *Arabidopsis thaliana* to high light intensities. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1619-1636.

Schreiner, R., & Koide, R. T. (1993). Antifungal compounds from the roots of mycotrophic and non-mycotrophic plant species. *New Phytologist*, **123**, 99-105.

Schumann, N., Navarro-Quezada, A., Ullrich, K., Kuhl, C., & Quint, M. (2011). Molecular evolution and selection patterns of plant F-box proteins with C-terminal kelch repeats. *Plant Physiology*, **155**, 835-850.

Schuster, A., Bruno, K. S., Collett, J. R., Baker, S. E., Seiboth, B., Kubicek, C. P., & Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, **5,** 1-10.

Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., & Trillas, I. (2010). *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology*, **59**, 141-149.

Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E., & Trillas, I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, **7**, 3943-3952.

Segarra, G., Van der Ent, S., Trillas, I., & Pieterse, C. M. J. (2009). MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, **11**, 90-96.

Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., & Kubicek, C. P. (2006). Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *The FEBS Journal*, **273**, 4346-4359.

Seyfferth, C., & Tsuda, K. (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 1-10.

Shah, J. M., Raghupathy, V., & Veluthambi, K. (2009). Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Biotechnology Letters*, **31**, 239.

Shane, M. W., & Lambers, H. (2005). Cluster roots: a curiosity in context. *Plant & Soil*, **274**, 101-125.

Shane, M. W., Cawthray, G. R., Cramer, M. D., Kuo, J., & Lambers, H. (2006). Specialized 'dauciform'roots of Cyperaceae are structurally distinct, but functionally analogous with 'cluster'roots. *Plant, Cell & Environment*, **29**, 1989-1999.

Shanmugam, S., Ulaganathan, P., Swaminathan, K., Sadhasivam, S., & Wu, Y. R. (2017). Enhanced biodegradation and detoxification of malachite green by *Trichoderma asperellum* laccase: Degradation pathway and product analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **125**, 258-268.

Sharma, E., Anand, G., & Kapoor, R. (2017). Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Annals of Botany*, **119**, 791-801.

Sharma, M., & Pandey, G. K. (2016). Expansion and function of repeat domain proteins during stress and development in plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 1-15.

Sharma, M., Gupta, S. K., Majumder, B., Maurya, V. K., Deeba, F., Alam, A., & Pandey, V. (2017). Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics*, **163**, 28-51.

Sharma, N., Yadav, K., & Aggarwal, A. (2016). Synergistic effect of arbuscular mycorrhizae and *Trichoderma* sp. on growth, nutrient uptake and yield of *Phaseolus mungo* L. cultivars. *Journal of Tropical Plant Physiology*, **8**, 23-31.

Sharma, V., Salwan, R., & Sharma, P. N. (2017). The comparative mechanistic aspects of *Trichoderma* and probiotics: scope for future research. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, **100**, 84-96.

Sheng, M., Tang, M., Zhang, F., & Huang, Y. (2011). Influence of arbuscular mycorrhiza on organic solutes in maize leaves under salt stress. *Mycorrhiza*, **21**, 423-430.

Shin, H., Min, K., & Arora, R. (2017). Exogenous salicylic acid improves freezing tolerance of spinach (Spinacia oleracea L.) leaves. *Cryobiology*, **81**, 192-200.

Shoresh, M., & Harman, G. E. (2008). Genome-wide identification, expression and chromosomal location of the genes encoding chitinolytic enzymes in *Zea mays*. *Molecular Genetics & Genomics*, **280**, 173.

Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, **48**, 21-43.

Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, **95**, 76-84.

Singh, P. K., & Gautam, S. (2013). Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 2345-2353.

Singh, U. B., Singh, S., Malviya, D., Chaurasia, R., Imran, M., & Rai, J. (2017). Harnessing biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* for control of *Meloidogyne incognita* in tomato. *Indian Phytopathology*, **70**, 331-335.

Singhania, R. R., Patel, A., Pandey, A., & Gnasounou, E. (2017). Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresource Technology*, DOI: 10.1016.

Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Trichoderma a& Gliocladium Basic Biology Taxonomy & Genetics*, **1**, 139-191.

Sivasubramanian, R., Mukhi, N., & Kaur, J. (2015). *Arabidopsis thaliana*: a model for plant research. In *Plant Biology and Biotechnology* (pp. 1-26). Springer India.

Smily, J. R. M. B., & Sumithra, P. A. (2017). Optimization of chromium biosorption by fungal adsorbent, *Trichoderma* sp. BSCR02 and its desorption studies. *HAYATI Journal of Biosciences*, **24**, 65-71.

Song, P., Cai, C., Skokut, M., Kosegi, B., & Petolino, J. (2002). Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS™-derived transgenic maize. *Plant Cell Reports*, **20**, 948-954.

Sorahinobar, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Behmanesh, M., & Enferadi, S. T. (2016). Central role of salicylic acid in resistance of wheat against *Fusarium graminearum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, **35**, 477-491.

Souza, A. A., Leitão, V. O., Ramada, M. H., Mehdad, A., de Castro Georg, R., Ulhôa, C. J., & de Freitas, S. M. (2016). *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. *PLOS One*, **11**, e0150455.

Souza, A. P., O'Donovan, A., Santos, C. A., Ferreira-Filho, J. A., Tuohy, M. G., & Gupta, V. K. (2017). Production of a recombinant swollenin from *Trichoderma harzianum* in *Escherichia coli* and its potential synergistic role in biomass degradation. *Microbial Cell Factories*, **16**, 83-94.

Sridevi, A., Ramanjaneyulu, G., & Devi, P. S. (2017). Biobleaching of paper pulp with xylanase produced by *Trichoderma asperellum*. *3 Biotech*, **7**, 266-275.

Stacey G, McAlvin CB, Kim SY, Olivares J, Soto MJ (2006). Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, **141**, 1473-1481.

Steiger, M. G., Vitikainen, M., Uskonen, P., Brunner, K., Adam, G., Pakula, T., & Mach-Aigner, A. R. (2011). Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 114-121.

Su, S., Zeng, X., Bai, L., Williams, P. N., Wang, Y., Zhang, L., & Wu, C. (2017). Inoculating chlamydospores of *Trichoderma asperellum* SM-12F1 changes arsenic availability and enzyme activity in soils and improves water spinach growth. *Chemosphere*, **175,** 497-504.

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., & Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, ***65,*** 46-55.

Sugimura, Y., & Saito, K. (2017). Comparative transcriptome analysis between *Solanum lycopersicum* L. and *Lotus japonicus* L. during arbuscular mycorrhizal development. *Soil Science and Plant Nutrition*, **63**, 127-136.

Sun, F., Fan, G., Hu, Q., Zhou, Y., Guan, M., Tong, C., & Liu, W. (2017). The high-quality genome of *Brassica napus* cultivar 'ZS11'reveals the introgression history in semi-winter morphotype. *The Plant Journal*, **92**, 452-468.

Svenningsen, N. B., Watts-Williams, S. J., Joner, E. J., Battini, F., Efthymiou, A., Cruz-Paredes, C., & Jakobsen, I. (2018). Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *The ISME Journal*, **12**, 1296-1307.

Szűcs, Z., Plaszkó, T., Cziáky, Z., Kiss-Szikszai, A., Emri, T., Bertóti, R., & Gonda, S. (2018). Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate-myrosinase-isothiocyanate system. *BMC Plant Biology*, **18**, 85.

Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Kotani, H., Kato, T., Asamizu, E., & Kawashima, K. (2000). Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 823-826.

Taha, A. S. J. (2017). Different methods and carriers for immobilization cellulase from *Trichoderma viride* and its remaining activity. *Pharmaceutical & Biological Evaluations*, **4**, 9-13.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* 5th Ed. Sunderland: Sinauer Assoc.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology & Development*. Sinauer Associates, Incorporated.

Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., & Takeda, N. (2013). TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Plant & Cell Physiology*, **54**, 433-447.

Takase, T., Miyazaki, Y., Yasuhara, M., Mitsui, S., & Kiyosue, T. (2015). Pleiotropic phenotype of transgenic *Arabidopsis* plants that produce the LOV domain of LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2). *Plant Biotechnology*, **32**, 273-280.

Talaat, N. B., & Shawky, B. T. (2011). Influence of arbuscular mycorrhizae on yield, nutrients, organic solutes, and antioxidant enzymes of two wheat cultivars under salt stress. *Journal of Plant Nutrition & Soil Science*, **174**, 283-291.

Tanaka, S., Han, X., & Kahmann, R. (2014). Microbial effectors target multiple steps in the salicylic acid production and signaling pathway. *Frontiers in Plant Science*, **6,** 349-349.

Tanwar, A., Aggarwal, A., Kaushish, S., & Chauhan, S. (2013). Interactive effect of AM fungi with *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and yield of broccoli. *Plant Protect Scicience*, **49**, 137-145.

Tauseef, M., Iqbal, S., Saleem, M., Farooq, U., Rehman, K., & Nasrullah, M. Z. (2017). Evaluation of canola genotypes to different nitrogen regimes for yield and yield components. *International Journal of Agria & Environmet Resolutions*, **3**, 182-187.

Tayo, T., Dutta, N. & Sharma, K. (2012). Effect of feeding canola-quality rapeseed mustard meal on animal production—a review. *Agricultural Reviews*, **33**, 114–121.

Tedersoo, L., & Brundrett, M. C. (2017). Evolution of ectomycorrhizal symbiosis in plants. In *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (pp. 407-467). Springer International Publishing.

Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, **17**, 260-270.

Thiel, H., Hleibieh, K., Gilmer, D., & Varrelmann, M. (2012). The P25 pathogenicity factor of Beet necrotic yellow vein virus targets the sugar beet 26S proteasome involved in the induction of a hypersensitive resistance response via interaction with an F-box protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 1058-1072.

T**hompson, A. M. G., Iancu, C. V., Neet, K. E., Dean, J. V., & Choe, J. Y.** (2017). Differences in salicylic acid glucose conjugations by UGT74F1 and UGT74F2 from *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, **7**, 1-11.

Tian, S., Lei, P., Liu, X., Zhang, X., & Shan, Y. (2017). Microbiota: a mediator to transform glucosinolate precursors in cruciferous vegetables to the active isothiocyanates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 1255-1260.

Tijerino, A., Cardoza, R. E., Moraga, J., Malmierca, M. G., Vicente, F., Aleu, J., & Hermosa, R. (2011). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genetics and Biology*, **48**, 285-296.

Timmusk, S., Kim, S. B., Nevo, E., Abd El Daim, I., Ek, B., Bergquist, J., & Behers, L. (2015). Sfp-type PPTase inactivation promotes bacterial biofilm formation and ability to enhance wheat drought tolerance. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 387-400.

Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., & Ferrol, N. (2012). The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist*, **193**, 755-769.

Tounekti, T., Hernández, I., & Munné-Bosch, S. (2013). Salicylic acid biosynthesis and role in modulating terpenoid and flavonoid metabolism in plant responses to abiotic stress. In *Salicylic acid* (pp. 141-162). Springer Netherlands.

Tramontina, R., de Andrades, D., Henn, C., Silva, J. L., Simão, R. C., Maller, A., & Kadowaki, M. K. (2015). Characterization of a novel *Aspergillus niger* beta-glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass products and fermentation inhibitors. *Chemical Papers*, **69**, 1050-1057.

Trevor, E. Y., Egger, K. N., & Peterson, L. R. (2001). Ectendomycorrhizal associations–characteristics and functions. *Mycorrhiza*, **11**, 167-177.

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chaudhry, V., Mishra, S., Tripathi, R. D., & Nautiyal, C. S. (2013). *Trichoderma* inoculation ameliorates arsenic induced phytotoxic changes in gene expression and stem anatomy of chickpea (*Cicer arietinum*). *Ecotoxicology & Environmental Safety*, **89**, 8-14.

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Srivastava, S., Chauhan, R., Awasthi, S., & Tripathi, R. D. (2017). Arsenic tolerant *Trichoderma* sp. reduces arsenic induced stress in chickpea (*Cicer arietinum*). *Environmental Pollution*, **223**, 137-145.

Tsunoda, T., Krosse, S., & van Dam, N. M. (2018). Root and shoot glucosinolate allocation patterns follow optimal defence allocation theory. *Journal of Ecology*, **105**, 1256-1266.

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**, 341-354.

Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T., & Saito, M. (2002). Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist*, **154**, 761-768.

Umadevi, P., Anandaraj, M., Srivastav, V., & Benjamin, S. (2017). *Trichoderma harzianum* MTCC 5179 impacts the population and functional dynamics of microbial community in the rhizosphere of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*. In Press.

Vadassery, J., Ranf, S., Drzewiecki, C., Mithöfer, A., Mazars, C., Scheel, D., & Oelmüller, R. (2009). A cell wall extract from the endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes growth of *Arabidopsis* seedlings and induces intracellular calcium elevation in roots. *The Plant Journal*, **59**, 193-206.

Valetti, L., Iriarte, L., & Fabra, A. (2016). Effect of previous cropping of rapeseed (*Brassica napus* L.) on soybean (*Glycine max*) root mycorrhization, nodulation, and plant growth. *European Journal of Soil Biology*, **76**, 103-106.

Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A., & García-Viguera, C. (2002). Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, **82**, 1293-1297.

van Spronsen, P. C., Tak, T., Rood, A. M., van Brussel, A. A., Kijne, J. W., & Boot, K. J. (2003). Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**, 83-91.

van Wees SCM, Van der Ent S, Pieterse CMJ (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion of Plant Biology*, **11**, 1-6.

Vargas WA, Mandawe JC y Kenerley CM. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology*, **151**, 792-808.

Vargas, J. T., Rodríguez-Monroy, M., Meyer, M. L., Montes-Belmont, R., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2017). *Trichoderma asperellum* ameliorates phytotoxic effects of copper in onion (Allium cepa L.). *Environmental & Experimental Botany*, **136**, 85-93.

Vargas, W. A., Mukherjee, P. K., Laughlin, D., Wiest, A., Moran-Diez, M. E., & Kenerley, C. M. (2014). Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology*, **160**, 2319-2330.

Vázquez, M. M., César, S., Azcón, R., & Barea, J. M. (2000). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*, **15**, 261-272.

Veiga, R. S., Howard, K., & van der Heijden, M. G. (2012). No evidence for allelopathic effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the non-host plant *Stellaria media*. *Plant & Soil*, **360**, 319-331.

Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., & Herrera-Estrella, A. (2011). Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **24**, 1459-1471.

Veresoglou, S. D., & Rillig, M. C. (2013). Accounting for the adaptation deficit of non-mycorrhizal plants in experiments. *Plant & Soil*, **366**, 33.

Veresoglou, S. D., Chen, B., & Rillig, M. C. (2012). Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology & Biochemistry*, **46**, 53-62.

Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, **16**, 86-96.

Verzeaux, J., Hirel, B., Dubois, F., Lea, P. J., & Tétu, T. (2017). Agricultural practices to improve nitrogen use efficiency through the use of arbuscular mycorrhizae: Basic and agronomic aspects. *Plant Science*, **264**, 48-56.

Veysi, H., Heidari, G., & Sohrabi, Y. (2017). The effect of mycorrhizal fungi and humic acid on yield and yield components of sunflower. *Būm/shināsī-i kishāvarzī*, **8**, 567-582.

Vidhyasekaran, P. (2015). Salicylic acid signaling in plant innate immunity. In *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity* (pp. 27-122). Springer Netherlands.

Vieira, P. M., Santos, M. P., Andrade, C. M., Souza-Neto, O. A., Ulhoa, C. J., & Aragão, F. J. L. (2017). Overexpression of an aquaglyceroporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology & Biochemistry*, **121**, 38-47.

Vierheilig, H., Alt, M., Mohr, U., Boller, T., & Wiemken, A. (1994). Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and ß-1, 3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *Journal of Plant Physiology*, **143**, 337-343.

Vierheilig, H., Bennett, R., Kiddle, G., Kaldorf, M., & Ludwig-Müller, J. (2000). Differences in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species. *New Phytologist*, **146**, 343-352.

Vierheilig, H., Schweiger, P., & Brundrett, M. (2005). An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, **125**, 393-404.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**, 1-10.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Ruocco, M., Wood, S., & Lorito, M. (2012). *Trichoderma* secondary metabolites that affect plant metabolism. *Natural Product Communications*, **7**, 1545-1550.

Viterbo A, Landau U, Kim S, Chernin L y Chet I. (2010). Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett*, **305**, 42-48.

Viterbo, A. D. A., & Chet, I. (2006). *TasHyd1*, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*, **7**, 249-258.

Viterbo, A. D. A., Wiest, A. R. I. C., Brotman, Y., Chet, I. L. A. N., & Kenerley, C. (2007). The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 737-746.

Viterbo, A., Harel, M., & Chet, I. (2004). Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. *FEMS Microbiology Letters*, **238**, 151-158.

Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A., & Chet, I. (2002). Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Current Genetics*, **42**, 114-122.

Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovelli, S., Sofo, A., Valerio, M., & Nuzzaci, M. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1-11.

Vizcaíno, J. A., González, F. J., Suárez, M. B., Redondo, J., Heinrich, J., Delgado-Jarana, J., & Rey, M. (2006). Generation, annotation and analysis of ESTs from *Trichoderma harzianum* CECT 2413. *BMC Genomics*, **7**, 193-207.

Vizcaino, J. A., Sanz, L., Basilio, A., Vicente, F., Gutierrez, S., Hermosa, M. R., & Monte, E. (2005). Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, **109**, 1397-1406.

Von Mark, V. C., & Dierig, D. A. (Eds.). (2014). *Industrial crops: breeding for bioenergy and bioproducts* (Vol. 9). Springer.

Walters, D. R., & McRoberts, N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science*, **11**, 581-586.

Wamberg, C., Christensen, S., Jakobsen, I., Müller, A. K., & Sørensen, S. J. (2003). The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry*, **35**, 1349-1357.

Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, **16**, 299-363.

Wang, B., Liu, L., Gao, Y., & Chen, J. (2009). Improved phytoremediation of oilseed rape (*Brassica napus*) by *Trichoderma* mutant constructed by restriction enzyme-mediated integration (REMI) in cadmium polluted soil. *Chemosphere*, **74**, 1400-1403.

Wang, B., Yeun, L. H., Xue, J. Y., Liu, Y., Ané, J. M., & Qiu, Y. L. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytologist*, **186**, 514-525.

Wang, B., Guo, X., Wang, C., Ma, J., Niu, F., Zhang, H., & Jiang, Y. Q. (2015). Identification and characterization of plant-specific NAC gene family in canola (*Brassica napus* L.) reveal novel members involved in cell death. *Plant Molecular Biology*, **87**, 395-411.

Wang, D. W., Peng, X. F., Xie, H., Xu, C. L., Cheng, D. Q., Li, J. Y., & Wang, K. (2016). *Arabidopsis thaliana* as a suitable model host for research on interactions between plant and foliar nematodes, parasites of plant shoot. *Scientific Report*, **6**, 1-13.

Wang, Q., Chen, L., Yu, D., Lin, H., Shen, Q., & Zhao, Y. (2017). Excellent waste biomass-degrading performance of *Trichoderma asperellum* T-1 during submerged fermentation. *Science of The Total Environment*, **609**, 1329-1339.

Webster J. (1980). Introduction to Fungi, 2ª Ed., Cambridge University Press: Cambridge, Reino Unido.

Weidmann, S., Sanchez, L., Descombin, J., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., & Gianinazzi-Pearson, V. (2004). Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 1385-1393.

Weiss, P. H., Álvares, A. C., Gomes, A. A., Miletti, L. C., Skoronski, E., da Silva, G. F., & Magalhães, M. L. (2015). Beta glucosidase from *Bacillus polymyxa* is activated by glucose-6-phosphate. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, **580**, 50-56.

Weng, H., Pan, A., Yang, L., Zhang, C., Liu, Z., & Zhang, D. (2004). Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time PCR assay with *HMG I/Y* as an endogenous reference gene. *Plant Molecular Biology Reporter*, **22**, 289-300.

White, R. F. (1979). Acetylsalicylic acid induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, **99**, 410–412.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.

Winde, I., & Wittstock, U. (2011). Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate–myrosinase system. *Phytochemistry*, **72**, 1566-1575.

Wittstock, U., & Burow, M. (2007). Tipping the scales-specifier proteins in glucosinolate hydrolysis. *Iubmb Life*, **59**, 744-751.

Wittstock, U., & Burow, M. (2010). Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *The Arabidopsis Book*, e0134.

Wittstock, U., Meier, K., Dörr, F., & Ravindran, B. M. (2016). NSP-dependent simple nitrile formation dominates upon breakdown of major aliphatic glucosinolates in roots, seeds, and seedlings of *Arabidopsis thaliana* Columbia-0. *Frontiers in Plant Science*, **7,** 1-15.

Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *The Open Mycology Journal*, **8,** 71-126.

Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*, **96**, 181-185.

Woo, S. L., & Lorito, M. (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management* (pp. 107-130). Springer, Dordrecht.

Wu, J., Cho, E., Giovannucci, E. L., Rosner, B. A., Sastry, S. M., Schaumberg, D. A., & Willett, W. C. (2017). Dietary intake of α-linolenic acid and risk of age-related macular degeneration, 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **105**, 1483-1492.

Wu, J., Wilson, K. M., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Giovannucci, E. L. (2018). A 24-year prospective study of dietary α-linolenic acid and lethal prostate cancer. *International Journal of Cancer*. In Press.

Wu, Q. S. (Ed.). (2017). *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants*. Springer.

Wu, X., Sun, J., Haytowitz, D. B., Harnly, J. M., Chen, P., & Pehrsson, P. R. (2017). Challenges of developing a valid Dietary Glucosinolate Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, **64**, 78-84.

Xin, Z., Baihui, R., Songlin, W., Yuqing, S., Baodong, C., & Li, R. (2017). *Rhizophagus irregularis* influences As and P uptake by alfafa and the neighboring non-host pepperweed growing in an As-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, **67**, 36-44.

Xu, E. (2015). *Interaction between hormone and apoplastic ROS signaling in regulation of defense responses and cell death*. Doctoral Dissertation, University of Helsinki.

Xu, X. B., Ma, X. Y., Lei, H. H., Song, H. M., Ying, Q. C., Xu, M. J., & Wang, H. Z. (2015). Proteomic analysis reveals the mechanisms of *Mycena dendrobii* promoting transplantation survival and growth of tissue culture seedlings of *Dendrobium officinale*. *Journal of Applied Microbiology*, **118**, 1444-1455.

Xue, D. S., Chen, H. Y., Ren, Y. R., & Yao, S. J. (2012). Enhancing the activity and thermostability of thermostable β-glucosidase from a marine *Aspergillus niger* at high salinity. *Process Biochemistry*, **47**, 606-611.

Xue, F., & Cooley, L. (1993). Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell*, **72**, 681-693.

Yalcin, H., & Çapar, T. D. (2017). Bioactive Compounds of Fruits and Vegetables. In *Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables* (pp. 723-745). Springer US.

Yamagishi, K., Ikeda, A., Chei, C. L., Noda, H., Umesawa, M., Cui, R., & Okada, T. (2017). Serum α-linolenic and other ω-3 fatty acids, and risk of disabling dementia: Community-based nested case–control study. *Clinical Nutrition*, **36**, 793-797.

Yang, L., Ding, J., Zhang, C., Jia, J., Weng, H., Liu, W., & Zhang, D. (2005). Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. *Plant Cell Reports*, **23**, 759-763.

Yang, L., Li, B., Zheng, X. Y., Li, J., Yang, M., Dong, X., & Deng, X. W. (2015). Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids. *Nature Communications*, **6**, 1-12.

Yasmeen, R., & Siddiqui, Z. S. (2018). Ameliorative effects of *Trichoderma harzianum* on monocot crops under hydroponic saline environment. *Acta Physiologiae Plantarum*, **40**, 4-28.

Yedidia I, Srivastva AK, Kapulnik Y y Chet I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant & Soil*, **235**, 235-242.

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

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 1061-1070.

Yi, C. X., Zhang, J., Chan, K. M., Liu, X. K., & Hong, Y. (2008). Quantitative real-time PCR assay to detect transgene copy number in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Analytical Biochemistry*, **375**, 150-152.

Young, J. P. W. (2015). Genome diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **26**, 113-119.

Yu, J., Tehrim, S., Wang, L., Dossa, K., Zhang, X., Ke, T., & Liao, B. (2017). Evolutionary history and functional divergence of the cytochrome *P450* gene superfamily between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* species uncover effects of whole genome and tandem duplications. *BMC Genomics*, **18**, 1-21.

Yuan, J. S., Burris, J., Stewart, N. R., Mentewab, A., & Stewart, C. N. (2007). Statistical tools for transgene copy number estimation based on real-time PCR. In *BMC Bioinformatics* (Vol. 8, No. 7, p. S6). BioMed Central.

Yusuf, M., Hayat, S., Alyemeni, M. N., Fariduddin, Q., & Ahmad, A. (2013). Salicylic acid: physiological roles in plants. In *Salicylic Acid* (pp. 15-30). Springer Netherlands.

Zamioudis, C., & Pieterse, C. M. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **25**, 139-150.

Zapata, L., Ding, J., Willing, E. M., Hartwig, B., Bezdan, D., Jiao, W. B., & Schneeberger, K. (2016). Chromosome-level assembly of *Arabidopsis thaliana* Ler reveals the extent of translocation and inversion polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 1-9.

Zavala-Gonzalez, E. A., Rodríguez-Cazorla, E., Escudero, N., Aranda-Martinez, A., Martínez-Laborda, A., Ramírez-Lepe, M., & Lopez-Llorca, L. V. (2017). *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytologist*, **213**, 351-364.

Zebire, D. A. (2017). Role of phytohormones (indol acetic acid, jasmonic acid, salcylic acid, and ethylene) in nematode-plant interactions. *African Journal of Agricultural Research*, **12**, 1612-1617.

Zeilinger, S., Reithner, B., Scala, V., Peissl, I., Lorito, M., & Mach, R. L. (2005). Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Applied & Environmental Microbiology*, **71**, 1591-1597.

Zhang, X., Gou, M., & Liu, C. J. (2013). *Arabidopsis* Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *The Plant Cell*, **25**, 4994-5010.

Zhang, X., Gou, M., Guo, C., Yang, H., & Liu, C. J. (2015). Down-regulation of Kelch domain-containing F-box protein in *Arabidopsis* enhances the production of (poly) phenols and tolerance to ultraviolet radiation. *Plant Physiology*, **167**, 337-350.

Zhang, X., Ren, B., Wu, S., Sun, Y., Chen, B., & Li, R. (2017). *Rhizophagus irregularis* influences As and P uptake by alfafa and the neighboring non-host pepperweed growing in an As-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*. **67**, 36-44.

Zhang, Y., Huai, D., Yang, Q., Cheng, Y., Ma, M., Kliebenstein, D. J., & Zhou, Y. (2015). Overexpression of three glucosinolate biosynthesis genes in *Brassica napus* identifies enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS One*, **10**, e0140491.

Zhipeng, W. U., Weidong, W. U., Shenglu, Z. H. O. U., & Shaohua, W. U. (2016). Mycorrhizal inoculation affects Pb and Cd accumulation and translocation in Pakchoi (*Brassica chinensis* L.). *Pedosphere*, **26**, 13-26.

Zhu, H., Zhang, R., Chen, W., Gu, Z., Xie, X., Zhao, H., & Yao, Q. (2015). The possible involvement of salicylic acid and hydrogen peroxide in the systemic promotion of phenolic biosynthesis in clover roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, **178**, 27-34.

Ziaei, M., Motallebi, M., Zamani, M. R., Panjeh, N. Z., & Jahromi, Z. M. (2016). A comparative study of transgenic canola (*Brassica napus* L.) harboring either chimeric or native *Chit42* genes against phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, **25**, 358-366.

Ziemann, S., Linde, K., Lahrmann, U., Acar, B., Kaschani, F., Colby, T., & Holton, N. (2018). An apoplastic peptide activates salicylic acid signalling in maize. *Nature Plants*, **4**, 172-180.

Zinoviadou, K. G., & Galanakis, C. M. (2017). Glucosinolates and Respective Derivatives (Isothiocyanates) from Plants. In *Food Bioactives* (pp. 3-22). Springer International Publishing.