



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

**Marcas epigenéticas y heredabilidad
relacionadas con la aplicación del agente de
biocontrol *Trichoderma atroviride* en plantas
de tomate**

Epigenetic marks and heritability related to the application of
the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* in tomato plants

Trabajo Fin de Grado: 22TFG345

Facultad de Biología. Grado en Biología

Curso 2021-2022

Daniel Martín Jiménez

Resumen

Trichoderma spp. es un género de hongos oportunista ampliamente distribuido que se encuentra englobado dentro de la división Ascomycota. Por sus numerosas cualidades y las relaciones que establece con el rizobioma de su hospedador vegetal, cuenta con numerosas posibles aplicaciones en lo relativo al control biológico y a la bioestimulación de cultivos agrarios. Se ha evidenciado en investigaciones previas que *Trichoderma* spp. ejerce un efecto de *priming* o preparación de la defensa en las plantas con las que establece relación. En el presente estudio mediante la aplicación de *Trichoderma atroviride* T11 se ha analizado el efecto que ejerce este hongo en el crecimiento de plantas de tomate, y por otro lado los niveles de expresión de ciertos genes involucrados en el desarrollo vegetal mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) tanto en plantas parentales como de primera generación, centrándose en examinar la posible heredabilidad de estos factores. Finalmente, se concluyó que la cepa T11 promueve el crecimiento de las plantas de tomate parentales comparado con plantas control sin tratar. En lo respectivo a la heredabilidad no se pudo observar ningún patrón claro ni en relación al crecimiento ni a la expresión génica.

Palabras clave: *Trichoderma atroviride*, heredabilidad, epigenética, control biológico, *Solanum lycopersicum*.

Abstract

Trichoderma spp. is a widely distributed genus of opportunistic fungi belonging to the division Ascomycota. Due to its numerous qualities and the relationships established with the rhizobiome of its plant host, these fungi have many potential applications in biological control and biostimulation of agricultural crops. Previous research has shown that *Trichoderma* spp. exerts a priming effect on the plants with which it establishes a relationship. In the present study, by means of the application of *Trichoderma atroviride* T11, the effect of this fungus on phenotypic growth of tomato plants has been analysed, as well as the expression levels of certain genes involved in plant development by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) on both parental and first-generation plants, focusing on examining the possible heritability of these factors. Finally, it was concluded that strain T11 promotes the growth of parental tomato plants compared to untreated control plants. In terms of heritability, no clear pattern could be observed in relation to either growth or gene expression.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, heritability, epigenetic, biological control, *Solanum lycopersicum*.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos	4
3. Materiales y métodos.....	5
3.1. <i>Microorganismos y semillas de tomate</i>	5
3.2. <i>Diseño del experimento, tratamiento de las plantas, medidas y toma de muestras</i>	5
3.3. <i>Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)...</i>	7
3.4. <i>Análisis de datos</i>	8
4. Resultados.....	8
4.1. <i>Efecto de T. atroviride T11 en el crecimiento de plantas de tomate</i>	8
4.1.1. <i>Efecto de T. atroviride T11 en el crecimiento de plantas parentales (F0)</i>	8
4.1.2. <i>Efecto de T. atroviride T11 en el crecimiento de plantas de primera generación (F1)...</i>	9
4.1.3. <i>Comparación del efecto de T. atroviride T11 en el crecimiento de individuos parentales respecto a individuos de primera generación</i>	10
4.2. <i>Efecto de T. atroviride T11 sobre los niveles de expresión génica en plantas de tomate</i>	11
4.2.1. <i>Efecto de T. atroviride T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas parentales (F0)</i>	11
4.2.1. <i>Efecto de T. atroviride T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas de primera generación (F1).....</i>	11
4.2.3. <i>Comparación del efecto de T. atroviride T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas parentales (F0) respecto a individuos de primera generación (F1)</i>	12
5. Discusión.....	13
6. Conclusiones.....	17
7. Bibliografía.....	18

1. Introducción

Trichoderma spp. es un género de hongos de la familia Hypocreaceae contenida dentro de la división Ascomycota. Abarca más de 250 especies, pudiendo ser teleomorfas (*Hypocrea*) o anamorfas (*Trichoderma*) (Bissett et al., 2015), entre las que encontramos desde simbioses mutualistas de plantas, patógenas o parásitas de otros hongos, e incluso otras que pueden resultar nocivas para humanos y animales (Sandoval-Denis et al., 2014). Es característico por su alta producción de enzimas hidrolíticas, principalmente enzimas degradantes de la pared fúngica (CWDE), metabolitos secundarios, compuestos orgánicos volátiles (VOC), especies reactivas de oxígeno (ROS), y por su capacidad de transferencia lateral de genes, cualidades que le dotan de especial interés en el control biológico (Druzhinina et al., 2018; Hermosa et al., 2014; Kubicek et al., 2011). Gracias a su carácter oportunista, su alta tasa de crecimiento y la amplia variedad de relaciones que establece, este género goza de un gran éxito, pudiéndose encontrar en una gama muy diversa de ambientes y sustratos alrededor de todo el planeta, desde zonas tropicales a desérticas o heladas (Hermosa et al., 2004; Kamel Madbouly, 2021). Sin embargo, las especies que nos traen al motivo de este estudio son aquellas predominantes en el rizobioma de ecosistemas vegetales a las cuales se puede sacar provecho en el ámbito de la agricultura, donde son de especial interés dada su utilidad aplicada a cultivos como agente de biocontrol o como suplemento para el crecimiento y producción de las plantas (Tyśkiewicz et al., 2022).

Los mecanismos mediante los cuales *Trichoderma* spp. actúa como agente de biocontrol son los siguientes (Figura 1): 1) por parasitismo, nutriéndose a costa del patógeno acabando finalmente con él; 2) por antibiosis, excretando moléculas en sus inmediaciones que retrasen el crecimiento del patógeno o directamente lo destruyan; 3) por competencia directa consumiendo de manera más rápida y eficiente la fuente nutricional del patógeno; 4) mediante resistencia sistémica inducida (ISR) y/o resistencia sistémica adquirida (SAR) a la planta modificando su metabolismo y haciendo que sintetice compuestos que reduzcan o eliminen por completo al patógeno. Mientras que los tres primeros puntos serían una forma directa de biocontrol, desencadenar la ISR de las plantas se considera una forma indirecta (Monte y Hermosa, 2021). Al margen de sus mecanismos aplicados al biocontrol sus efectos como suplemento en el crecimiento se dan principalmente por inducción de la extensión de la pared celular, el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares laterales

(aumentando la capacidad de absorción de nutrientes) e incrementando la tasa fotosintética de las plantas (Hermosa et al., 2013).

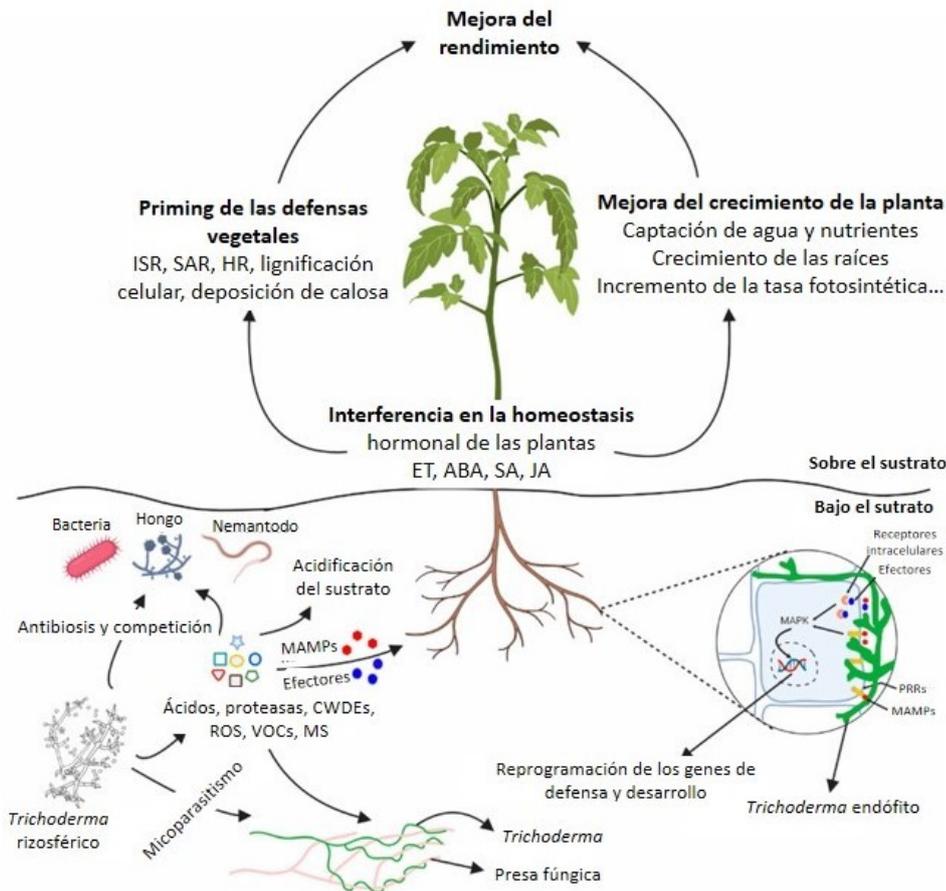


Figura 1: Mapa de interacciones *Trichoderma*-planta-patógeno. *Trichoderma* produce patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) y efectores, que se unen a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y a los receptores intracelulares que activan cascadas de quinasa activadas por mitógenos (MAPK), lo que conduce a la reprogramación de varias vías de la planta relacionadas con la defensa, es decir la respuesta sistémica innata (ISR), la respuesta sistémica adquirida (SAR) y la respuesta hipersensible (HR), así como la interferencia en la homeostasis hormonal, es decir, las vías del etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA). Las interacciones entre *Trichoderma* y los patógenos toman varias formas a través de la acción de diversas secreciones, entre las que se encuentran compuestos orgánicos volátiles (VOC), enzimas degradantes de la pared celular (CWDE), especies reactivas de oxígeno (ROS) y metabolitos secundarios (MS). Mediante la formación de estas interacciones, *Trichoderma* aumenta la tolerancia de las plantas contra el estrés biótico y abiótico, ya sea preparando las defensas de la planta, aumentando el crecimiento de la planta o liberando la presión del patógeno, lo que conduce a una respuesta mejorada del crecimiento (modificado de Alfiky y Weisskopf, 2021).

Como se menciona anteriormente, el efecto de las diferentes cepas de *Trichoderma* spp. sobre la respuesta defensiva de las plantas con las que establece relación resulta de gran interés por su

posible aplicación en cultivos de aprovechamiento humano, pudiéndose usar para combatir plagas y/o diferentes tipos de estrés, dejando a un lado poco a poco otros remedios químicos menos sostenibles para el medio ambiente y adaptándose al cambio global que vivimos (Mukherjee et al., 2013). En este sentido *Trichoderma* spp. provoca un fenómeno conocido como *priming* o preparación de la defensa, el cual se basa en estimular la capacidad defensiva de la planta, provocando una inducción más rápida, potente y eficiente de la resistencia basal, manteniendo a ésta en una especie de estado de alerta sin tener las defensas constantemente activadas (Conrath et al., 2015). Esta preparación de la planta por parte de *Trichoderma* spp. puede aportar una mayor resistencia frente al estrés abiótico y biótico alterando múltiples vías en la que se ven implicadas diferentes fitohormonas, entre las que están: el ácido salicílico (SA), involucrado en la SAR que actúa frente patógenos biotróficos o hemibiotróficos, la cual se activa por la acumulación de SA y por la detección de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Gaffney et al., 1993); los jasmonatos (JAs) y el etileno (ET), involucrados en las ISR que actúa en la inmunidad contra necrótrofos, la cual se activa con la acumulación de éstos y por la interacción planta-microorganismo con bacterias y hongos no patógenos de la rizosfera como es el caso de *Trichoderma* spp. (Van Wees et al., 2008); y el ácido abscísico (ABA), las auxinas (IAA) y las giberelinas (GA), siendo en conjunto importantes en la regulación del crecimiento y la defensa de la planta.

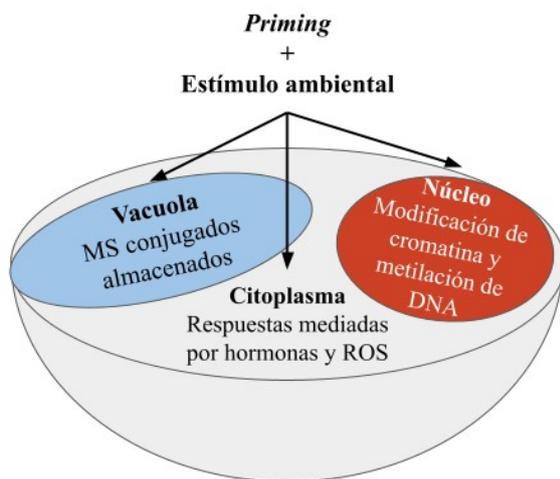


Figura 2: Localización celular de las dianas del *priming*. Las vacuolas almacenan metabolitos secundarios que pueden ser hidrolizados y liberados al citoplasma. En el citoplasma, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden interactuar con vías dependientes de varias hormonas. En el núcleo puede actuar a través de mecanismos epigenéticos, como son la modificación de histonas y la metilación de DNA.

El *priming* inducido por el contacto inicial entre *Trichoderma* y la planta involucra varias localizaciones celulares (Figura 2), actuando sobre objetivos como: metabolitos secundarios conjugados almacenados en vacuolas, que pueden ser hidrolizados, activados y liberados al

citoplasma; ROS, que pueden interactuar con vías dependientes de SA, JA y/o ABA; y por último mediante cambios epigenéticos a nivel de núcleo (Pastor et al., 2013).

La epigenética se puede definir como cualquier regulación de la expresión génica que no implique cambios en la secuencia del DNA. Esta describe el fenómeno en el cual células u organismos que son genéticamente idénticos expresan sus genomas de forma diferente, causando diferencias fenotípicas. Las modificaciones epigenéticas inducidas por la interacción planta-*Trichoderma* y el ambiente que los rodea pueden ejercer su efecto de *priming* más allá de las plantas de la generación parental, llegando a ser heredadas a la primera generación (F1) e incluso a su posterior descendencia (Morán-Diez et al., 2021).

Sin entrar en demasiados detalles de la compleja regulación de las marcas epigenéticas, uno de los mecanismos es el mediado por sRNAs (*small RNAs*), fragmentos de RNA de entre 21 y 24 nucleótidos que van a provocar ciertas regulaciones génicas actuando de diferentes maneras, ya sea uniéndose a DNA, mRNA o sRNAs complementarios, bloqueando así su transcripción, haciendo que cierta proteína no se sintetice o bloqueando su traducción respectivamente. Entre los sRNAs tenemos diferentes tipos, siendo los más relevantes los siRNA (RNA de silenciamiento) o miRNA (micro RNA) (Morán-Diez et al., 2021).

2. Objetivos

Trichoderma es un hongo que conforma gran parte de los compuestos de control biológico comercializados (Sood et al., 2020; Verma et al., 2007), habiendo sido su eficiencia demostrada aplicándose tanto para combatir patógenos como para favorecer el crecimiento y la mejora de la producción en cultivos vegetales. Los efectos asociados a su aplicación pueden aportar beneficios a las plantas con las que establece relación más allá de la generación en la que establece contacto, heredando la progenie ciertas regulaciones involucradas en la inducción de la defensa y el crecimiento (Monte y Hermosa, 2021).

La hipótesis de este Trabajo de Fin de Grado es poder determinar los efectos de la cepa T11 de *Trichoderma atroviride* sobre plantas de tomate tanto parentales, como la progenie de primera

generación con el fin de comprobar si puede haber un factor heredable ligado a ciertas marcas epigenéticas inducidas por la interacción *Trichoderma*-tomate.

Los objetivos específicos del presente estudio son:

1. Evaluar *in vivo* el potencial de *T. atroviride* como suplemento en el crecimiento de plantas de tomate bajo condiciones controladas.
2. Analizar el efecto de *T. atroviride* T11 en los niveles de expresión de genes relacionados con la defensa en tomate y el crecimiento y ver si este efecto pudiese ser heredado por la siguiente generación.

3. Materiales y métodos

3.1. Microorganismos y semillas de tomate

Trichoderma atroviride IMI 352941 (CABI Bioscience, Egham, Reino Unido) y referenciada en este estudio como cepa T11, fue obtenida del cultivo previo en placas de Petri con medio sólido agar de patata dextrosa (PDA) a 28°C de temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

Todas las semillas de tomate utilizadas en este estudio corresponden a la variedad *Solanum lycopersicum* “Marmande” (Eurogarden, Barcelona, España). Previamente a este estudio, semillas de tomate de primera generación (F1) fueron obtenidas de un estudio en el que plantas de tomate fueron tratadas con T11 y comparadas con las plantas control sin tratar bajo condiciones controladas de luz, temperatura, humedad ambiental y humedad del suelo de las macetas en invernadero (Morán-Diez et al., sin publicar).

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% en agitación durante 10 minutos, seguido de 10 minutos sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50%. Finalmente las semillas se lavaron con agua estéril durante 1 minuto, repitiendo este último paso tres veces antes de su uso final.

3.2. Diseño del experimento, tratamiento de las plantas, medidas y toma de muestras

Antes de comenzar el ensayo se establecieron los diferentes tratamientos a aplicar en cada grupo de plantas, utilizando 3 réplicas biológicas por cada uno, teniendo finalmente 6 tratamientos: F0-C y F0+T11 (plantas parentales sin tratar y tratadas con la cepa T11, respectivamente); F1-C y F1-T11 (plantas de primera generación cuyas semillas se obtuvieron de los tratamientos F0-C y

F0+T11, respectivamente, y sin tratamiento adicional); y F1-C+T11 y F1-T11+T11 (plantas de primera generación cuyas semillas se obtuvieron de los tratamientos F0-C y F0+T11, respectivamente, y que fueron tratadas con la cepa T11).

La suspensión de conidios de *Trichoderma* se obtuvo de placas con medio PDA ya esporuladas vertiendo 1 mL de agua estéril, mediante deslizamiento con asa de siembra a lo largo del cultivo y haciendo pasar la solución resultante a través de lana de vidrio, traspasándolo finalmente a otro tubo para eliminar posibles restos de micelio y medio de cultivo. La solución de esporas resultante fue sometida a una dilución seriada hasta obtener una concentración 1/100 respecto a la inicial.

Su concentración fue determinada mediante microscopia en una cámara de recuento Thoma. Se preparó 1 mL de suspensión de 1×10^8 de conidios de *T. atroviride* T11 para cada 40 semillas de tomate desinfectadas, o bien, 1 mL de agua estéril para cada 40 semillas usadas como control, después fueron desecadas por separado en placas de Petri dentro de una campana de flujo laminar en condiciones de asepsia.

Se prepararon 6 bandejas de plástico con 60 alvéolos de $4 \times 4 \times 4$ cm conteniendo una mezcla 3:1 de sustrato (50% de arcilla y 50% de fibra de coco; $0,8 \text{ kg/m}^3$ de NPK 14-16-18 (N-P2O5-K2O) y pH 6-6,5) y vermiculita; y se inundó cada una de las bandejas con 1 L de agua. Se sembró una semilla por alvéolo, se cubrió cada bandeja con papel film para retener la humedad durante la fase de germinación y se pasaron las bandejas a una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de humedad (60%), un fotoperiodo de 16 horas de luz y una temperatura de 20 °C.

Durante los días posteriores se hizo un seguimiento del porcentaje de germinación, siendo la media superior al 91% al 7º día de pasar las semillas al sustrato. Se aplicó un riego de 3 mL/planta y 0,5 L por bandeja de solución Hoagland a 0.5X de concentración. En el 14º día se realizó un trasplante de 30 plantas de cada condición a alvéolos de $6 \times 6 \times 6$ cm, aplicando un riego de 50 mL/planta de agua para asentar el sustrato, quedando un total de 180 plantas (5 plantas por réplica biológica y 3 réplicas biológicas por tratamiento). Las plantas se regaron cada 2 días alternando 50 mL/planta de agua con una solución de Hoagland (0.5X) hasta la recogida de muestras. A los 28 días desde la germinación se tomaron fotografías comparativas y las medidas de todos los individuos para evaluar los efectos de cada tratamiento, apuntando la longitud que tenía cada planta desde los cotiledones hasta la parte superior más joven del ápice. Posteriormente, se llevó a cabo la toma de muestras, recogiendo para la medida de la expresión génica posterior material vegetal correspondiente al ápice y a los folíolos más jóvenes e inmediatamente fueron pasadas a nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80°C hasta el momento de la extracción de RNA.

Finalmente contamos con 54 muestras, 18 por réplica biológica, teniendo un total de 9 plantas por cada uno de los 6 tratamientos.

3.3. Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La extracción de RNA se realizó a partir de 100 mg de material vegetal usando el reactivo TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), comprobando la calidad en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y midiendo sus datos de absorbancia a 260 y 280 nm para determinar su concentración y pureza a través del espectrofotómetro “NanoDrop Spectrophotometer® ND-1000” (Thermo Scientific); la posterior síntesis de cDNA se realizó tratando primeramente la muestra con DNase RQ1 (Promega, España) utilizando una mezcla de primers oligo(dT) y de primers hexámeros aleatorios (Random 6-mers) (Takara Inc., Tokio, Japón), siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Se seleccionaron ocho genes marcadores relacionados con la biosíntesis de SA [*ICS1* (síntesis de la proteína isocorismato sintasa 1) y *PAL5* (síntesis de la proteína fenilalanina amonio-liasa 5)] y de JA [*TomLoxC* (síntesis de la proteína lipoxigenasa C)], las vías de defensa dependientes de SA [*PR1b1* (síntesis de la proteína relacionada con la patogénesis 1b1)], JA [*PINII* (síntesis de la proteína inhibidora de la proteinasa inducida por la herida II)] y *MYC2* (factor de transcripción *MYC2*), y los genes *AREB2* y *LERBOH1* que codifican una proteína de unión al elemento de respuesta al ABA y una NADPH oxidasa implicada en el estallido oxidativo, respectivamente. El análisis se llevó a cabo mediante qRT-PCR utilizando el kit SYBR FAST KAPA (Biosystems, Buenos Aires, Argentina) en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), estableciendo un programa con 3 min a 95 °C para su desnaturalización inicial, seguidos de 40 ciclos de 3 s a 95 °C (desnaturalización) y 30 s a 60 °C (anillamiento), y finalmente una curva de fusión (15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C). Estos genes marcadores fueron elegidos por su utilidad en estudios transcriptómicos previos sobre las interacciones *Trichoderma*-tomate (Rubio et al., 2014; Malmierca et al., 2015; Medeiros et al., 2017). Todas las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen total de 10 µL. Los oligonucleótidos utilizados para comprobar la expresión de estos genes se pueden consultar en la tabla adjunta (Tabla 1), cuyas pendientes y eficiencias fueron calculadas con anterioridad. Los niveles de expresión relativa se calcularon a partir del ciclo umbral (Ct) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen y Livak, 2008) y como gen de referencia endógeno el transcrito de α -actina.

Tabla 1: Lista de oligos específicos usados en este estudio.

Gen	Vía de señalización vegetal	Secuencias oligos (5'-3') (Sentido/Antisentido)
<i>ACT</i>	Gen endógeno	CACCACTGCTGAACGGGAA
		GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT
<i>AREB</i>	Respuesta del ácido abscísico (ABA)	GGTATCCCTGATCCAGCACTC
		CACATAAGGAACTGGAGATACAG
<i>ICS1</i>	Vía del shikimato para la síntesis de ácido salicílico (SA)	GTTCTCTCCAAGAAATGTCC
		TCCTTCAAGCTCATCAAACCTC
<i>LERBOH1</i>	Biosíntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS)	GTCAGGCTTCTACAGAAAAC
		GTTGATTACAGTAGCCGGTTC
<i>MYC2</i>	Respuesta de jasmonatos (JAs)	CTGAAAAGAAGCCGAGGAAGC
		GCATCTCCAAGAAGTGATGCC
<i>PR1b1</i>	Respuesta de SA	GCACTAAACCTAAAGAAAAATGGG
		AAGTTGGCATCCCAAGACATA
<i>PINII</i>	Respuesta de JAs	GGCCAAATGCTTGCACCTTT
		CGTGGTACATCCGGTGGGATA
<i>TomLoxC</i>	Biosíntesis de ácido jasmónico	TCCGGCAACACCGTTTACTC
		GTC AATGGCCGGAAAATGTG
<i>PAL5</i>	Vía de los fenilpropanoides para la biosíntesis de SA	ACGGGTTGCCATCTAATCTG
		TGGCTGAAATTAAGCCCAAG

3.4. Análisis de datos

Los datos fueron obtenidos a partir de las tres réplicas biológicas. Las medidas de altura y los niveles de expresión génica de las plantas de tomate se sometieron a un análisis tipo ANOVA con el programa informático StatView 5 (SAS Institute Inc.) con un intervalo de confianza del 95% (test LSD de Fisher ($p < 0,05$)).

4. Resultados

4.1. Efecto de *T. atroviride* T11 en el crecimiento de plantas de tomate

Los datos de altura fueron tomados anotando la medida comprendida desde los cotiledones hasta el ápice de 9 plantas de cada condición a los 28 días de crecimiento bajo condiciones controladas de humedad y temperatura en una cámara de cultivo como se especifica en el apartado 3.2 de Materiales y métodos.

4.1.1. Efecto de *T. atroviride* T11 en el crecimiento de plantas parentales (F0)

El análisis de las plantas parentales mostró una mayor altura en aquellas que fueron tratadas con la cepa T11 (F0+T11) con respecto a las plantas control sin tratar (F0-C) (Figura 3A), siendo la diferencia entre ambos tratamientos significativa (Figura 3B).

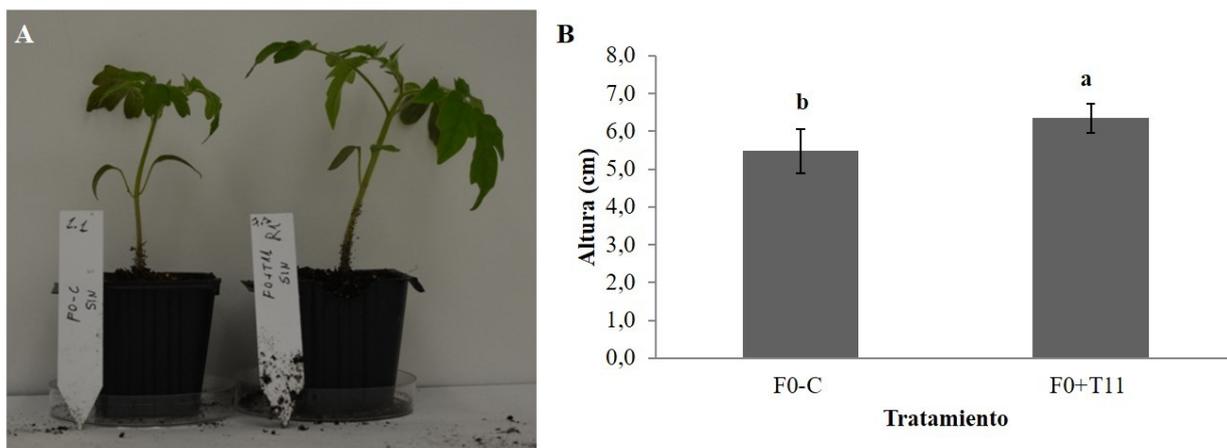


Figura 3. Análisis comparativo de plantas de tomate parentales de 28 días de crecimiento tratadas con la cepa T11 (F0+T11) y control sin tratar (F0-C). **(A)** fotografía del porte de una de las plantas de cada tratamiento; **(B)** medidas estadísticas. Los valores son la media de nueve plantas ($n = 9$) con sus respectivas desviaciones estándar. Valores seguidos por diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p < 0,05$).

4.1.2. Efecto de *T. atroviride* T11 en el crecimiento de plantas de primera generación (F1)

Las semillas F1 provenientes de plantas de tomate parentales tratadas con la cepa T11 (F1-T11) dieron lugar a un fenotipo opuesto al observado en dichas plantas parentales (F0+T11) cuando se comparó con su control (F1-C). En este caso, las plantas del tratamiento F1-C fueron significativamente más altas que las del tratamiento F1-T11 (Figura 4).

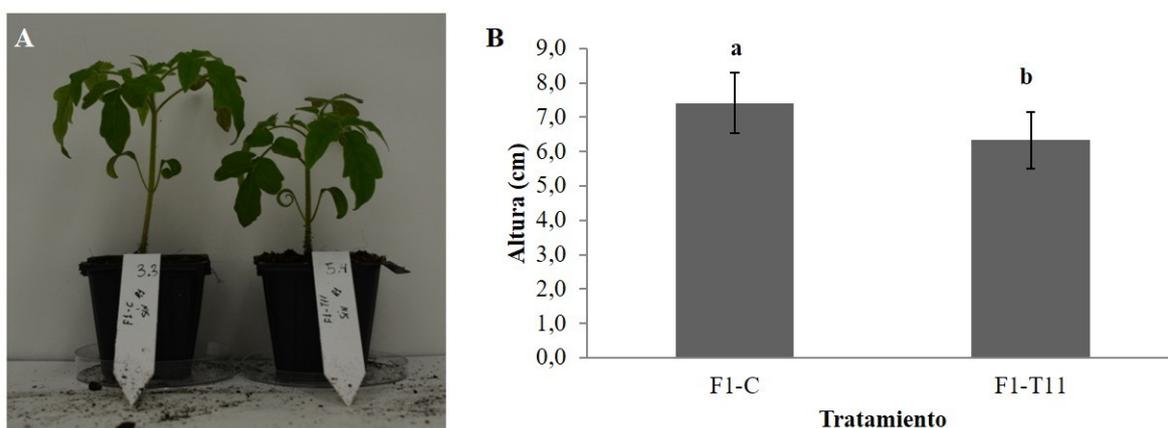


Figura 4. Análisis comparativo de plantas de tomate de la primera generación (F1) de 28 días de crecimiento provenientes de plantas tratadas con la cepa T11 (F1-T11) y control sin tratar (F1-C). **(A)** fotografía del porte de una de las plantas de cada tratamiento; **(B)** medidas estadísticas. Los valores son la media de nueve plantas ($n = 9$) con sus respectivas desviaciones estándar. Valores seguidos por diferente letra en el superíndice son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p < 0,05$).

4.1.3. Comparación del efecto de *T. atroviride* T11 en el crecimiento de individuos parentales respecto a individuos de primera generación

Teniendo en cuenta los resultados observados en las plantas F1, se incluyó en el estudio un tercer tratamiento en el cual las semillas F1 (F1-C y F1-T11) fueron tratadas con la cepa T11 (F1-C+T11 y F1-T11+T11). Entre los individuos de primera generación los tratamientos mediante los cuales se alcanzó mayor altura fueron F1-C, F1-C+T11 y F1-T11+T11. El hecho de añadir T11 a las semillas del tratamiento F1-T11 parece revertir el menor desarrollo de la planta observado con respecto a su control (comparativa entre F1-C y F1-T11) ya que entre las plantas F1-C, F1-C+T11 y F1-T11+T11 no se observaron diferencias significativas (Figura 5). Mientras que las plantas control parentales (F0-C) y su progenie (F1-C) mostraron diferencias significativas, siendo las plantas de primera generación (F1-C) de mayor tamaño, las plantas F1-T11 mostraron una altura similar a las plantas parentales tratadas con T11 (F0+T11) (Figura 5). Si comparamos las plantas del tratamiento F0+T11 con las del tratamiento F1-T11, las cuales no fueron tratadas con la cepa T11, se pudo observar un tamaño similar de las plantas, incluso en ausencia de T11. Una vez añadido T11 (plantas del tratamiento F1-T11+T11), el tamaño de las plantas incrementó significativamente comparado a las plantas F1-T11. No obstante hay que tener en cuenta que las plantas control de la progenie (F1-C) y las que fueron tratadas con la cepa T11 (F1-C+T11) también presentaron un incremento en la altura.

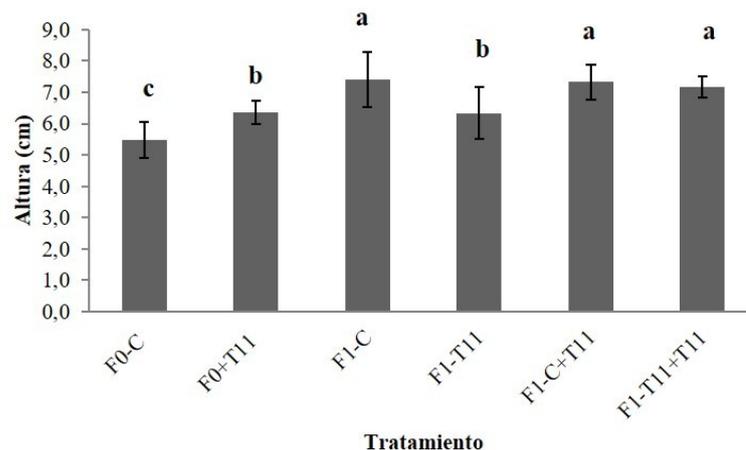


Figura 5. Altura media en plantas de tomate parentales (F0) y de primera generación (F1) en relación a los diferentes tratamientos aplicados. Valores seguidos por diferente letra son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p < 0,05$).

4.2. Efecto de *T. atroviride* T11 sobre los niveles de expresión génica en plantas de tomate

Los datos de expresión génica fueron evaluados a partir de hojas de plantas de tomate de 28 días de crecimiento bajo condiciones controladas de humedad y temperatura en una cámara de cultivo como se especifica en el apartado 3.2 de Materiales y métodos.

4.2.1. Efecto de *T. atroviride* T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas parentales (F0)

Los genes evaluados están relacionados con distintos procesos celulares como la defensa, el metabolismo o el desarrollo. Las plantas tratadas con la cepa T11 mostraron una disminución en la expresión de los genes *AREB2*, *LERBOH1*, y *PINII* comparado con las plantas control. En cambio, la expresión de los genes *PR1b1* y *MYC2* aumentó significativamente en las plantas del tratamiento F0+T11. El resto de genes analizados no mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos analizados (Figura 6).

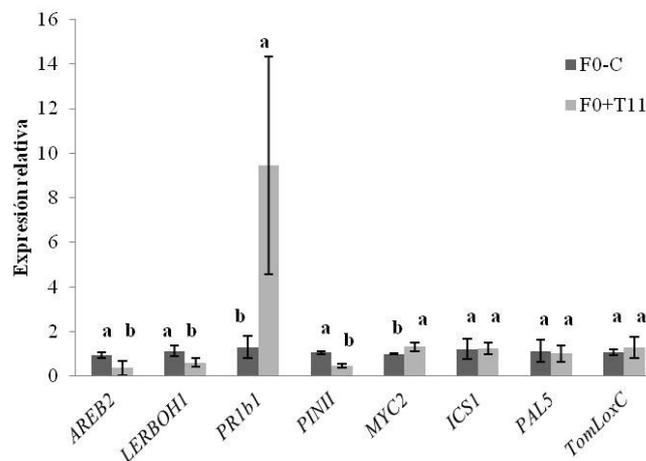


Figura 6: Expresión relativa de los genes *AREB2*, *LERBOH1*, *PR1b1*, *PINII*, *MYC2*, *ICSI*, *PAL5*, y *TomLoxC* en plantas de tomate parentales de los tratamientos F0-C (control) y F0+T11 (plantas tratadas con T11). Los datos son expresados como la cuantificación relativa de la expresión génica. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición parental control (F0-C) sin T11 ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). Valores seguidos por diferente letra son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

4.2.2. Efecto de *T. atroviride* T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas de primera generación (F1)

En relación a la progenie, la comparativa entre los tratamientos F1-C y F1-T11 no mostró diferencias significativas en ninguno de los genes evaluados (Figura 7).

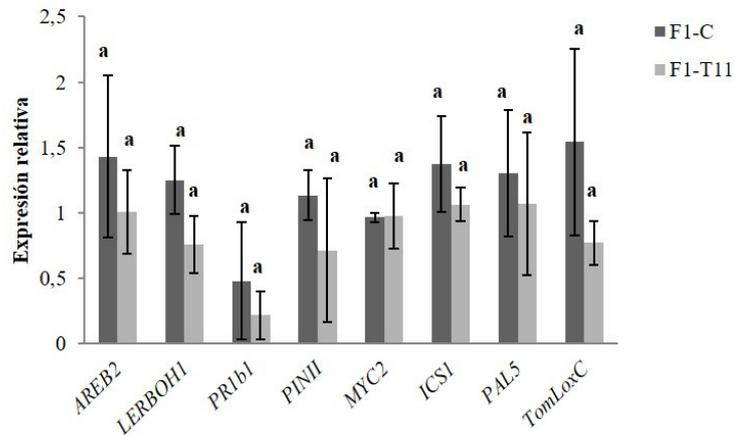


Figura 7: Expresión relativa de los genes *AREB2*, *LERBOH1*, *PR1b1*, *PINII*, *MYC2*, *ICS1*, *PAL5*, y *TomLoxC* en plantas de tomate de la primera generación (F1) de los tratamientos F1-C (control) y F1-T11 [de semillas obtenidas de plantas tratadas con T11 (F0+T11)]. Los datos son expresados como la cuantificación relativa de la expresión génica. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de la condición control (F1-C) sin T11 ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). Valores seguidos por diferente letra son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

4.2.3. Comparación del efecto de *T. atroviride* T11 en la expresión de genes de respuesta a distintos procesos celulares de plantas parentales (F0) respecto a individuos de primera generación (F1)

Para poder tener una visión global de los patrones de expresión de los genes analizados en las comparativas entre las plantas parentales y las plantas F1, se realizó un análisis de la varianza de cada gen para cada uno de los tratamientos evaluados en su conjunto, tomando como referencia la condición F0-C (ver Tabla 2). Los genes *PINII*, *ICS1*, *PAL5*, y *TomLoxC* no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. La expresión del gen *AREB2* fue diferencialmente menor en plantas de los tratamientos F0+T11 y F1-C+T11 en comparación con las de F1-T11+T11. Plantas parentales tratadas con la cepa T11 (F0+T11) mostraron una reducción en la expresión del gen *LERBOH1* significativa con respecto al tratamiento F1-C. En cuanto al gen *PR1b1*, se pudo observar un aumento muy considerable de su expresión relativa en los parentales tratados con T11 (F0+T11) en comparación a todas las demás condiciones. Por último, en lo que respecta a la expresión del gen *MYC2*, ésta fue significativamente mayor en los tratamientos F1-C y F1-T11 respecto al resto de tratamientos, exceptuando F0+T11, con el cual no se pudieron apreciar diferencias significativas.

Tabla 2. Expresión relativa de genes implicados en diversos procesos celulares en plantas de tomate de 28 días parentales (F0) y de primera generación (F1) de los seis tratamientos analizados (F0-C, F0+T11, F1-C, F1-T11, F1-C+T11, y F1-T11+T11).

Gen	F0-C	F0+T11	F1-C	F1-T11	F1-C+T11	F1-T11+T11
<i>AREB2</i>	0,94 ± 0,12bc*	0,37 ± 0,32c	0,56 ± 0,25bc	0,40 ± 0,13bc	0,83 ± 0,29c	1,10 ± 0,78ab
<i>LERBO H1</i>	1,14 ± 0,23bc	0,60 ± 0,20c	1,21 ± 0,25ab	0,73 ± 0,21bc	1,07 ± 0,56bc	1,08 ± 0,26bc
<i>PR1b1</i>	1,30 ± 0,48b	9,46 ± 4,88a	0,75 ± 0,21b	1,09 ± 0,13b	0,25 ± 0,23b	0,54 ± 0,32b
<i>PINII</i>	1,05 ± 0,07a	0,46 ± 0,08a	0,85 ± 0,14a	0,75 ± 0,22a	0,72 ± 0,67a	0,97 ± 0,16a
<i>MYC2</i>	1,00 ± 0,01b	1,31 ± 0,18ab	1,35 ± 0,05a	1,35 ± 0,08a	1,16 ± 0,15b	1,29 ± 0,10b
<i>ICS1</i>	1,22 ± 0,47a	1,24 ± 0,27a	1,34 ± 0,42a	1,06 ± 0,12a	1,43 ± 0,75a	1,59 ± 0,48a
<i>PAL5</i>	1,13 ± 0,49a	1,02 ± 0,37a	1,22 ± 0,45a	1,00 ± 0,50a	1,18 ± 0,27a	1,36 ± 0,45a
<i>TomLox C</i>	1,07 ± 0,12a	1,30 ± 0,48a	1,54 ± 0,71a	0,77 ± 0,17a	1,18 ± 0,76a	1,14 ± 0,33a

*Los datos son expresados como la cuantificación relativa de la expresión génica ± la desviación estándar. Se tomó como condición basal los niveles de transcrito obtenidos en plantas de condición control (F0-C) ($2^{-\Delta\Delta CT} = 1$). Valores seguidos por diferente letra para cada gen son significativamente diferentes, de acuerdo al test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

5. Discusión

Trichoderma es un género de hongos complejo que incluye alrededor de 400 especies según el *International Committee on Taxonomy of Trichoderma* (ICTT) (<https://trichoderma.info/>). Su aplicación requiere un estudio exhaustivo a nivel molecular ya que su uso como agente de biocontrol o como bioestimulante no debe ser considerado en el amplio espectro del género sino a nivel de especie e incluso de cepa. En este estudio analizamos el comportamiento de plantas de tomate de la variedad “Marmande” en su interacción con *T. atroviride* T11 y si un posible efecto “Trichoderma” desencadenado en las plantas parentales puede ser heredado por la progenie.

5.1. La cepa T11 estimula el crecimiento de plantas de tomate de 4 semanas en F0 pero su efecto no parece ser heredado por la progenie (F1)

En las condiciones establecidas para nuestro estudio hemos observado un efecto positivo en el desarrollo de plantas F0 tratadas con la cepa T11 (F0+T11) en comparación con las plantas control (F0-C). El papel de distintas especies de *Trichoderma* como promotor del crecimiento está bien documentado (Salas-Marina et al., 2011; Tucci et al., 2011; Vinale et al., 2008); no obstante, cada vez hay más estudios que sugieren que esta propiedad no es específica de todas las especies de *Trichoderma*, sino que está fuertemente conectada a otro tipo de factores como pueden ser la especificidad con la planta hospedadora, el método de aplicación de la cepa, y las condiciones ambientales de crecimiento del sistema entre otros (Morán-Diez et al., 2020; Nieto-Jacobo et al.,

2017; Shukla et al., 2015; Singh et al., 2016; Zhang et al., 2016). Un estudio realizado por Tucci et al. (2011) mostraba que la elección de la cepa de *Trichoderma* así como la variedad de planta de tomate utilizada eran puntos clave para conseguir resultados de promoción del crecimiento de la planta. En este caso, la cepa *T. atroviride* P1 no generaba una promoción del crecimiento en todas las variedades de tomate, resaltando así la importancia del genotipo de la planta tratada con *Trichoderma* (Tucci et al., 2011).

Son pocos los estudios que abordan la heredabilidad del efecto “Trichoderma” en plantas de tomate. Medeiros et al. (2017) observaron un incremento en la biomasa de plantas de primera generación provenientes de plantas parentales tratadas con la cepa T11. En nuestro estudio, no obstante, las plantas del tratamiento F1-T11 mostraron un tamaño menor en comparación con su control F1-C, a pesar de que estos autores utilizaron el mismo método de aplicación de la cepa, y la misma concentración en la solución de conidios con la que se realizó el pildorado de las semillas (1×10^8 esporas/mL); sin embargo, el tiempo de desarrollo con el que evaluaron las plantas fue menor (dos semanas) en comparación a los 28 días de desarrollo de las plantas de nuestro estudio (Medeiros et al., 2017). En nuestro caso parece no haber efecto memoria del factor “Trichoderma” aunque, si bien es cierto que, las plantas presentan un porte similar a sus parentales (F0+T11) sin haber aplicado la cepa T11. No obstante, el hecho de que las plantas F1 control presentan a su vez un mayor porte que su control parental (F0-C) no permite llegar a una conclusión certera respecto a la heredabilidad de dicho efecto.

Casi todos los estudios de heredabilidad están relacionados con marcas de memoria frente a estreses abióticos y bióticos como pueden ser HAGs, AGO y/o metilaciones y desmetilaciones que actúan en promotores de genes relacionados con estas regulaciones frente al estrés (De Palma et al., 2019). El caso de *Trichoderma* es particular ya que no es patógeno pero al establecer su primer contacto con la planta, en la respuesta temprana, ésta lo asimila inicialmente como un ataque, lo cual desencadena una serie de eventos: la rápida liberación de ROS, deposición de callosa, afluencia de calcio y acumulación SA en el sitio de contacto con *Trichoderma*, así como la activación de la defensa sistémica. *Trichoderma* spp. y la planta terminaran por equilibrar esta respuesta temprana vegetal en un beneficio mutuo, regulando la homeostasis y reduciendo la síntesis de polímeros de barrera lipídica de la planta, así como disminuyendo la producción de SA (Alonso-Ramírez et al., 2014). Esto marca un punto importante a tener en cuenta respecto al momento de la internación y desarrollo de la planta en el que tomar la muestra de material vegetal para su posterior análisis,

pudiendo variar los niveles de expresión dependiendo del estadio en el que se encuentre la interacción planta-*Trichoderma* y la etapa vital de la planta.

5.2. Los genes de respuesta a distintos procesos celulares no presentan un patrón claro que pudiera ser considerado heredable

Una primera aproximación al estudio molecular de este efecto se enfocó en el estudio de la expresión génica de varios genes involucrados en rutas de señalización hormonal. Muchos de los genes parecen estar regulados por miRNAs que pueden alterar la expresión de éstos ya que se ven regulados por factores de transcripción (Morán-Diez et al., 2021). Así el miRNA393 está relacionado con procesos de desmetilación de regiones promotoras de genes como *MYC2* que es un regulador de un amplio número de procesos biológicos que ocurren en la planta, entre ellos actuando como un eje regulador dentro de la señalización fitohormonal integrando en una compleja red señales endógenas y exógenas que dan forma al crecimiento y desarrollo de la planta (Kazan y Manners, 2013). En nuestro estudio el gen *MYC2* aumentó su expresión en plantas F0+T11 comparadas con su control (F0-C) (Figura 6). Estos resultados han sido observados por otros autores, por poner un ejemplo, se mostró que la aplicación de *T. asperellum* TaspHu1 provocaba un incremento de la expresión de *MYC2* respecto a los controles sin tratar (Yu et al., 2021). Sin embargo diferentes estudios han encontrado que la aplicación de *Trichoderma* no produce un cambio significativo en la expresión del gen *MYC2* o como mucho una ligera represión después de 24 horas (Morán-Diez et al., 2021), la explicación más sencilla a esto es que la planta pasa a priorizar su crecimiento mientras permiten la colonización de las raíces por *Trichoderma*. No obstante, este efecto no se observó en la progenie donde las plantas del tratamiento F1-T11 no mostraron una diferencia significativa en la expresión de este gen en comparación con las plantas control (F1-C) (Figura 7).

En el caso de *AREB2*, es un factor de transcripción involucrado en la regulación del ABA, modula el crecimiento vegetal mediante su unión a promotores de genes que intervienen en el transporte de azúcares, esta señal activa transcripcionalmente la expresión de *SUT2* (y probablemente de otros genes regulados por *AREB2*), resultando finalmente en la acumulación de azúcares solubles que van a influir en la germinación, la tolerancia al estrés abiótico, la senescencia foliar, la calidad de la fruta y el crecimiento y desarrollo de la planta (Ma et al., 2017; Yoshida et al., 2010). Además, este factor de transcripción puede verse regulado por ciertas marcas epigenéticas que afectan a sus promotores como pueden ser la modificación de la estructura de la

cromatina, metilaciones, transposones y otras provocadas por la actuación de siRNAs (Vendramin et al., 2020). En los resultados del presente estudio pudimos observar como la expresión de *AREB2* se veía significativamente reducida en los parentales tratados con T11 (F0+T11) respecto al tratamiento control (F0-C) (Figura 6), algo que también se observó en el estudio de Rubio et al. (2017) donde la aplicación de *T. harzianum* T34 disminuía la expresión de *AREB2* frente a sus respectivos controles sin tratar. No obstante, otros estudios indican que la aplicación de *T. parareesei* T6 incrementaba la expresión de *AREB2* frente a los controles sin T6 (Rubio et al., 2014). De nuevo observamos la variabilidad entre las distintas especies de *Trichoderma*. Sin embargo, cuando se analizan los distintos tratamientos en su conjunto (Tabla 2), se observó una tendencia al aumento de la expresión en plantas de la progenie, concretamente, aquellos tratamientos con T11 (F1-C+T11 y F1-T11+T11) con respecto a sus controles (F1-C y F1-T11) aunque estas diferencias no llegaron a ser significativas. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de expresión en las F1-T11 respecto a los parentales con T11 (F0+T11).

Por otro lado, el gen *TomLoxC* y otros de la familia de las lipoxigenasas desempeñan un papel importante en los procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la maduración de los frutos, la producción de semillas y la senescencia, a su vez desempeñan un papel clave en las respuestas de defensa contra el estrés ambiental biótico y abiótico (Viswanath et al., 2020). Además tiene un gran interés debido a que está involucrado en la producción de compuestos volátiles C5, los cuales tienen un papel relevante en el sabor de los tomates frescos (Shen et al., 2014). Aunque se ha observado que la expresión de *TomLoxC* se veía aumentada significativamente en dos especies diferentes de tomate tras la aplicación de *Trichoderma* (Risoli et al., 2022), en nuestro estudio se pudo observar como los niveles de expresión de *TomLoxC* no presentaban diferencias significativas entre ninguno de los seis tratamientos (Tabla 2).

Aunque los resultados obtenidos en este estudio no muestran un patrón claro, tanto de crecimiento como de expresión génica, entre las plantas parentales (F0) y las plantas de primera generación no tratadas con la cepa T11 (F1-C y F1-T11), ni se pueda hacer una conclusión certera sobre la heredabilidad del efecto “Trichoderma”, se ve necesario abordar otros estudios a nivel molecular enfocados a la identificación de miRNAs en estas muestras y los genes dianas afectados por ellos, así como el análisis de la expresión de los genes abarcados en este estudio, y de otros, ante la presencia de un estrés biótico o abiótico. De esta manera, se podrá tener una visión más precisa de si existe realmente un efecto “Trichoderma” que pudiera ser heredado por las plantas de

la primera generación en relación no solo al desarrollo de la planta, sino a las defensas, lo cual podría tener interesantes aplicaciones tanto en el biocontrol como en la bioestimulación de cultivos de interés agrícola y/o poblaciones vegetales de interés conservacionista afectadas por ciertos patógenos.

6. Conclusiones

1. La cepa T11 promueve el crecimiento de las plantas de tomate parentales comparado con plantas control sin tratar.
2. La progenie de plantas que fueron tratadas con la cepa T11 (F1-T11) no parecen mostrar un efecto memoria en relación al crecimiento observado en sus parentales.
3. No se observa una correlación en cuanto a la expresión de genes relacionados con rutas de señalización en plantas de tomate parentales y plantas de la primera generación que pueda llevar a pensar en una heredabilidad del efecto “Trichoderma”.

7. Bibliografía

- Alfiky, A., & Weisskopf, L. (2021). Deciphering *Trichoderma*–Plant–Pathogen Interactions for Better Development of Biocontrol Applications. *Journal of Fungi*, 7(1), 61. <https://doi.org/10.3390/jof7010061>
- 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(8), 823-831. <https://doi.org/10.1111/mpp.12141>
- Bissett, J., Gams, W., Jaklitsch, W., & Samuels, G. J. (2015). Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 263-295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for Enhanced Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>
- De Palma, M., Salzano, M., Villano, C., Aversano, R., Lorito, M., Ruocco, M., Docimo, T., Piccinelli, A. L., D'Agostino, N., & Tucci, M. (2019). Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. *Horticulture Research*, 6, 5. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0079-1>
- Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Zhang, J., Atanasova, L., Yang, D., Miao, Y., Rahimi, M. J., Grujic, M., Cai, F., Pourmehdi, S., Salim, K. A., Pretzer, C., Kopchinskiy, A. G., Henrissat, B., Kuo, A., Hundley, H., Wang, M., Aerts, A., Salamov, A., ... Kubicek, C. P. (2018). Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007322. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007322>
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., & Ryals, J. (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science*, 261(5122), 754-756. <https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>
- Hermosa, M. R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaíno, J. A., Grondona, I., & Monte, E. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 108(Pt 8), 897-906. <https://doi.org/10.1017/s0953756204000358>
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2014). Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma*. En *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 125-137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00010-2>
- Hermosa, R., & Rubio, M. B. (2013). The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 16, 69-80. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.181>
- Kamel Madbouly, A. (2021). *Biodiversity of Genus Trichoderma and Their Potential Applications* (pp. 429-460). https://doi.org/10.1007/978-3-030-67561-5_13
- ICTT: International Commission on Trichoderma Taxonomy. 2021. Available online: <https://trichoderma.info/> (accessed on 6 July 2021).
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: The Master in Action. *Molecular Plant*, 6(3), 686-703. <https://doi.org/10.1093/mp/sss128>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martínez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A., Mukherjee, P. K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L. D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M. G., Challacombe, J., Chertkov, O., ... Grigoriev, I. V. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(4), R40. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>
- Ma, Q.-J., Sun, M.-H., Lu, J., Liu, Y.-J., Hu, D.-G., & Hao, Y.-J. (2017). Transcription Factor *AREB2* Is Involved in Soluble Sugar Accumulation by Activating Sugar Transporter and Amylase Genes. *Plant Physiology*, 174(4), 2348-2362. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00502>

- Malmierca, M. G., Barua, J., McCormick, S. P., Izquierdo-Bueno, I., Cardoza, R. E., Alexander, N. J., Hermosa, R., Collado, I. G., Monte, E., & Gutiérrez, S. (2015). Novel aspinolide production by *Trichoderma arundinaceum* with a potential role in *Botrytis cinerea* antagonistic activity and plant defence priming. *Environmental Microbiology*, *17*(4), 1103-1118. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12514>
- Medeiros, H. A. de, Araújo Filho, J. V. de, Freitas, L. G. de, 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*, 40216. <https://doi.org/10.1038/srep40216>
- Monte, E., & Hermosa, R. (2021). *The use of Trichoderma spp. To control plant diseases* (pp. 401-428). <https://doi.org/10.19103/AS.2021.0093.13>
- Morán-Díez, M. E., Martínez de Alba, Á. E., Rubio, M. B., Hermosa, R., & Monte, E. (2021). *Trichoderma* and the Plant Heritable Priming Responses. *Journal of Fungi*, *7*(4), 318. <https://doi.org/10.3390/jof7040318>
- Moran-Díez, M., Tranque, E., Bettiol, W., Monte, E., & Hermosa, R. (2020). Differential Response of Tomato Plants to the Application of Three *Trichoderma* Species When Evaluating the Control of *Pseudomonas syringae* Populations. *Plants*, *9*, 626. <https://doi.org/10.3390/plants9050626>
- 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*(1), 105-129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., De Souza, J. T., Jimenez-Bremont, J. F., Ohkura, M., Stewart, A., & Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00102>
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, *94*, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013>
- Risoli, S., Cotrozzi, L., Sarrocco, S., Nuzzaci, M., Pellegrini, E., & Vitti, A. (2022). *Trichoderma*-Induced Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum* Species: A Meta-Analysis. *Plants*, *11*(2), 180. <https://doi.org/10.3390/plants11020180>
- Rubio, B., Quijada, N., Pérez, E., Domínguez, S., Monte, E., & Hermosa, R. (2014). Identifying Beneficial Qualities of *Trichoderma parareesei* for Plants. *Applied and environmental microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.03375-13>
- 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*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00294>
- Salas-Marina, M., Silva-Flores, M., Uresti-Rivera, 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 jasmonate and salicylate pathways. *European Journal of Plant Pathology*, *131*, 15-26. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>
- Sandoval-Denis, M., Sutton, D. A., Cano-Lira, J. F., Gené, J., Fothergill, A. W., Wiederhold, N. P., & Guarro, J. (2014). Phylogeny of the Clinically Relevant Species of the Emerging Fungus *Trichoderma* and Their Antifungal Susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(6), 2112-2125. <https://doi.org/10.1128/JCM.00429-14>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

- Shen, J., Tieman, D., Jones, J. B., Taylor, M. G., Schmelz, E., Huffaker, A., Bies, D., Chen, K., & Klee, H. J. (2014). A 13-lipoxygenase, *TomloxC*, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, *65*(2), 419-428. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert382>
- Shukla, N., Awasthi, R. p., Rawat, L., & Kumar, J. (2015). Seed biopriming with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. *Annals of Applied Biology*, *166*(2), 171-182. <https://doi.org/10.1111/aab.12160>
- Singh, V., Upadhyay, R. S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. *Microbiological Research*, *193*, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>
- Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., Araniti, F., & Sharma, A. (2020). *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. *Plants*, *9*(6), 762. <https://doi.org/10.3390/plants9060762>
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. On tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, *12*(4), 341-354. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>
- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuk-Ściśeł, J. (2022). *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2329. <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*(4), 443-448. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Vendramin, S., Huang, J., Crisp, P. A., Madzima, T. F., & McGinnis, K. M. (2020). Epigenetic Regulation of ABA-Induced Transcriptional Responses in Maize. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *10*(5), 1727-1743. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400993>
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, *37*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M. J., Li, H., Woo, S., & Lorito, M. (2008). A novel role for The *Trichoderma*–plant interaction *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *72*, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. *Journal of Plant Biology*, *63*(2), 83-95. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09241-x>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). *AREB1*, *AREB2*, and *ABF3* are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *61*(4), 672-685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>
- Yu, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Liu, Z. (2021). Biocontrol and growth-promoting effect of *Trichoderma asperellum* TaspHu1 isolate from *Juglans mandshurica* rhizosphere soil. *Microbiological Research*, *242*, 126596. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126596>
- Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2016). Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01405>