



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL PAPEL DE *Swo1* DE *Trichoderma atroviride* EN LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE CHILE VARIEDAD MIRASOL

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

PRESENTA

M. en B. RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL**

**CO-DIRECTOR DE TESIS
DR. EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ**

CUERNAVACA, MORELOS 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de Chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOF



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2022-02-14 11:50:58 | Firmante

LihAqhaEuZxP9z5QOnNyrFK4X7cWpm7GSB/kOafIXvZ3G8at7QQvHujTKWphhWdmKROtBjUAIInxQJDID9qQYYWBA+IAph+a4pgTWF7IS/baPHxws8MbFJAxwvkDM8bbCxnX8nvU93BWur39bybs9yceRo9ntkbeGOi1jZLiOAJEz/c6B76cJCNxZMxgO5t36kryD6+ckvFGILG/TCP48Ovx5cGFluEPAz/nFZ1mRYpW8FZqdmY2RvRV+78PTjFpVY2GRyktxAA3o9zGOott3gFTIPXCgtFuhINhBQoPuyYn8Hlho5t1/gbOYrO+b9xpbC5HEhFge8OM5xz9jiwztQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[d3OaRYUsi](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8i8c95Xm7A34Giwnhl9ezwh0wAF9VUx>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. VERÓNICA LIRA RUAN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2022-03-03 10:34:34 | Firmante

nlaY99lpoFa890milgEYh/7k1mSfkXxHP1ql7+HKZrD/zcbwnRgZe/uWMXxpd6fh7NojH4LpIWEOPM0Utsctf6gnAlqSthC88C0HOO8dAFCfWDWLR0in4pGbBGXlht5ZNYKJg/G2RS
VuOS+7bgeBPRaRs3KTqxHy9NBGsNppZC/hEYH+85qM71bgvLQ710wRjldg3fm5R3RZctM5HWUED0QhSC5gJZgNY8mbz0Qmf0jXO9Kuc314cgGYvAcEKGCfz0Hh4KZLUeod
EnVf+BhagfEf6cqC0xIEVyuL2yNZUdQv5tBAjQBgEEZ6BfJNz/OassL1N0Micll2fjg5wlYuhQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[3o6vmKJtS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4j27O8oNraPGxiJWf2yjErQkg5cfett3>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-03-13 20:08:47 | Firmante

mgKAF7kOTxFcqBS9lR1BMhbFfkChgnuyPNongr6u+59Xl93iqFR12JrY69eNVBMd4LawJXYBYFxd0OqKq0IKVaCRywtTIEFEXIm7o1TZ6S5wi5eykyKiwXMqQLAytrJOKhBLtakE
eVNDIhL3KvDQPJ3cT6hXWwtldb6TavzbCuBujllZdFFqEo3RFP2yt/KSFBjgUKPGpfpDm5JK5AXSGpaRgW4zvd0U20A2jExBDtJOUUYV39BoMb+/gP3v+/Joio0mASORBvbPpvDef
kqH9oDuK7wSYzpArhIRgflXSJvwTF4hSSDuq/zyU+zBAldKHZILYUJefYWJszGwjQ4LOA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[YSezpRuZ2](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wZfNRxPKORFT2AkraX71WuJe8ac7Hdx>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ DE JESÚS ARELLANO GARCÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE DE JESUS ARELLANO GARCIA | Fecha:2022-02-14 18:35:29 | Firmante

f3TAfcLQL7+++VquZ2HL1COPXYk/Eh16gUiEicfv51RlaaLkfj/+dwNJQomHett+3xzdXMTDmcpXGzBbzUHsqFMc+nCSFw2CIHJPQOcs+NrdtFeH9W0xwBMuG4xYDnQBg/tDvrQTmgK8YQdVDnw/E2C1hiDcHRpIS71wyK+84fdHrMRPr4cAy1KavZo460SHxJrAnG5Sb5H9tMevemtl8ugQGxJKuAeR3nV3wShw0k/dZkTJsZuj1p8qOyTgn7BwQ853R7kqL4tN5TXzuOX4lhAXhx2qeUn0zFmrlP1OC+xrtVcYxJ3HssgWY1Z8ZnUFiK5hl01JK67URpAKkVaQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



PIH827U4m

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3AO2pTlqUeoJ7aPGZQiGjUloMrmvzaHr>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALFONSO LEIJA SALAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALFONSO LEIJA SALAS | Fecha:2022-03-15 11:54:52 | Firmante

UFO/6l23aODZYb0Cutkl4jGm7xhF6TGOiU3CI9K2KliTTWiiZwhxebOyY/aFTU+qRojFAi0vDGvxvC7jOv57MkeRVqnu/wk1He6gKB8fihBKSgSYGPzZe2orMS7YefXolRvGdoMLxW9YEVy7LO4yaZT5akri0oBl+eHR6ImRA60YT6AxNA2LbBrflaUl6VsGnL41Mrc7BbDVzE3ncE/bUDQVwOoG+eTQw27HRmaaK3iv37VnrucWel+/MAmd1GyvSrHOGC2y8ispjvNk4X2YpACAh7qn7w+hYEnw+tmLLQa9JCAinYT58VFLUWAxlzSmhTZu9ruimrw11jZ8YbQTXsg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jQG63hgpD](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vi4FAES0C89rs6lwEvjx9MkzN5bGwskE>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

EDGAR BALCÁZAR LÓPEZ | Fecha:2022-03-15 19:33:18 | Firmante

ATX1NRmY7kprcyUBDbUFrmsehbs1kdfzd4ub8ONAmVxE+2jreuW2jPGUirrOqnd1/g4g7ys20Tqn9IT3YbV2WIRFyL+7F8BTsoWT1SGHHjjA0u0uiODY1q+VsZ/CYRPJwxohpeM7m08F8/fdfRD2ctm9/uEMeE DnNFfiwhro3MBOeOwy/niH3C4ftVK84mmzL1O0oojpGySjVF7AqKTUxy+tp710mh5+q4C+eM2n//+nLhLyVvHlVcWQUBmj9bd5Rg2FSXeQoYSzf3b9ONiXMcLj5uikjeG5tOC7ZZAKWeiP2gj+pZMNpjcps+6AFG9QwHypF+X8o83oGr+rE3mQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[L9OQNhxwS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/LyJaHAMjTlkgf6HiBUUDjgfHg5HhILq0>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 11 de enero del 2021

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Jorge Luis Folch Mallof (director de tesis, CEIB-UAEM)

Dr. Edgar Balcázar López (codirector U de G)

Dra. María del Rayo Sánchez Carbente (CEIB-UAEM)

Dr. José de Jesús Arellano García (CEIB-UAEM)

Dr. Alfonso Leija Salas (CCG-UNAM)

Dra. Verónica Lira Ruan (CIDC-UAEM)

Dr. Ayixon Sánchez Reyes (IB-UNAM)

Tesis: Evaluación del papel de Swo1 de *Trichoderma atroviride* en la interacción con plantas de chile variedad Mirasol.

Alumno que lo presenta a revisión: RICARDO SÁNCHEZ CRUZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. AYIXON SÁNCHEZ REYES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AYIXON SÁNCHEZ REYES | Fecha:2022-03-01 14:06:29 | Firmante

C2weXb+6DVksVgzQIPc85mGVtjVd7NXJXInqb4YSWqLRPHRle2aUeMu0rnEIRjSaRMjQ2PvtjRe2UQyLu3Pmn5ApmewZf1QKQt5/+I7zuZAoNsuBLVzIKMLDk/Fq40tP0shkhalzS51w5Sh/a8oFDw1ozTDtq1+QIMVWTz5q7IAyfud8Y3QtPnhFyBKJ0Kpf62iGF4wf7TjTCu2ezCmARKqYPmllqnOXEckp161Jkryg7cpTgCP8Eixa7PF0ckNlczig+5cjb7iauCugy19aDc tfiufeE3+AyhsW6v3j6e063F3lyPdYjXbp82nrh6ZvhfMBNDjeQXNciPXNS1NDOZw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



79hzW5xEJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TqguVMV51RSx1T21yoYKQmdMJRXSNusa>



AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios, por lo bueno y malo, algunas lecciones pero muchas más son bendiciones, el hecho de estar escribiendo esto... es una de ellas.

A mi Familia que a pesar de la distancia siempre están conmigo.

Al Dr. Jordi, muy especialmente, una persona que aprecio mucho, quien confió en mí en cada etapa de mi proceso de formación, quien no solo me dio enseñanzas académicas, sino también humanas.

Al Dr. Arnoldo quien siempre me ha brindado su apoyo, sin duda un gran mentor.

Al Dr. Edgar mi co-tutor y un gran amigo, por su apoyo, dedicación y comprensión, para poder desarrollar este proyecto.

A mi comité sinodal, por su guía, por su empeño en formar de mí un profesionista.

A mis amigos y compañeros, por estar ahí compartiendo algo tan valioso como lo es su tiempo.

A Norely por su apoyo incondicional, confianza y cariño.

A María del Rocío Rodríguez Hernández, por su apoyo, por sus enseñanzas y dedicación.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB/UAEM), por permitirme trabajar y culminar con mi proyecto de doctorado.

DEDICATORIA

Quiero dedicar muy especialmente esta etapa de mi vida, a mis padres, Bartola y Rosalino, por todo su amor y confianza en mí.

A mi hijo Ricardo, sin duda uno de mis motivos más lindos y fuertes para continuar.



Albert Einstein

“Cualquier momento es perfecto para aprender algo nuevo...”

RESUMEN

EVALUACIÓN DEL PAPEL DE Swo1 DE *Trichoderma atroviride* EN LA INTERACCIÓN CON PLANTAS DE CHILE VARIEDAD MIRASOL

Palabras claves: Endófitos, swollenina, PGPM, tolerancia, estrés abiótico, resistencia a hongos fitopatógenos

El cultivo de chile (*Capsicum annuum*) es considerado uno de los cultivos más importantes del mundo. Uno de los principales desafíos que presenta la diversidad de chiles en México, como muchos otros cultivos, es la disminución de su producción. Las principales causas son el crecimiento deficiente de las plantas y la destrucción de cultivos debido a factores bióticos y abióticos. El cultivo productivo del chile implica un uso excesivo e indiscriminado de agentes químicos; para reducir el uso de estos químicos y contrarrestar los daños que estos producen tanto al ambiente como al ser humano, una alternativa ha sido implementar el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) por su capacidad de estimular directamente el crecimiento de las plantas e inducir resistencia sistémica a través de diversos mecanismos. El género *Trichoderma* tiene una larga tradición de uso en la agricultura y la industria. Varias especies de *Trichoderma* establecen una relación simbiótica con las raíces de cultivos económicamente importantes. Se ha sugerido que la capacidad de incrementar el crecimiento y la productividad de las plantas a través de la colonización por *Trichoderma* implica la solubilización de nutrientes minerales y la producción de fitohormonas. Además de los beneficios del desarrollo vegetal, se ha reportado que las cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de influir en la resistencia sistémica de las plantas protegiéndolas principalmente de bacterias, virus y hongos fitopatógenos, aunque también hay reportes de que puede activar la resistencia sistémica, que puede influir positivamente frente al estrés abiótico y biótico. Algunas vías que *Trichoderma* activa en la planta para mantener condiciones intracelulares estables en presencia de factores ambientales de estrés, es aumentar su potencial osmótico a través de la acumulación de osmolitos intracelulares como prolina, glicina, betaína, manitol y trehalosa (Wang et al., 2007).

Se sabe que *Trichoderma* libera moléculas como: xilanasas, peptaiboles, ceratoplataninas, swolleninas, entre otras, que la planta reconoce y a través de la interacción del sistema radicular, estimula los mecanismos de defensa que conducen a la acumulación de componentes de las vías de señalización del ácido jasmónico y etileno (hormonas ampliamente estudiadas en la respuesta a diferentes tipos de estrés), así como hidroperóxido liasa, peroxidasa y fenilalanina amonio liasa que inducen la lignificación (Druzhinina *et al.*, 2011). En este trabajo de investigación se evaluó el papel de una proteína tipo expansina (swollenina) de *Trichoderma atroviride* (cepas mutantes y sobreexpresantes) en la respuesta al estrés abiótico (sequía). Se demostró además que el tratamiento con las cepas sobreexpresantes de swollenina aumentó el tiempo de supervivencia (13 días) de las plantas ante un déficit hídrico, comparado a los 9 días de supervivencia de las plantas inoculadas con la cepa silvestre de *T. atroviride*. Se comprobó que hubo un aumento significativo mayor de prolina en estas plantas en comparación con el resto de los tratamientos. De igual forma se evaluó la respuesta de plantas de chile guajillo frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, donde las plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes presentaron un porcentaje de daño mucho menor que las plantas no inoculadas e inoculadas con la cepa silvestre.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLE OF *Swo1* OF *Trichoderma atroviride* IN THE INTERACTION WITH PLANTS OF CHILE VARIETY MIRASOL.

Keywords: Endophyte, Swollenin, PGPM, Phytopathogen resistance, abiotic stress tolerance.

Abstract. Chili peppers (*Capsicum annuum*) are considered one of the most important crops in the world. A principal challenge presented by the diversity of chili peppers in México, like many other crops, is the decrease in their production. The main causes are poor plant growth and crop destruction due to biotic and abiotic factors.

To counteract the damage produced by agrochemicals and reduce its use, in recent years an alternative has been the use of plant-growth promotion microorganisms (PGPM), because of its ability to directly stimulate the growth of plants and induce systemic resistance through various mechanisms. The genus *Trichoderma* has a long tradition of use in agriculture and industry. Several *Trichoderma* species establish a symbiotic relationship with roots of economically important crops. It has been suggested that the ability to increase the growth and productivity of plants through colonization by *Trichoderma* involves the solubilization of mineral nutrients and the production of phytohormones. In addition to the benefits of plant development, it has been reported that *Trichoderma* strains have the ability to influence the systemic resistance of plants, thus protecting them mainly from bacteria, viruses and phytopathogenic fungi, although there are also reports that it can activate the Systemic Resistance against abiotic stress. Some pathways that *Trichoderma* activates in the plant to maintain stable intracellular conditions in the presence of environmental stress factors, is to increase its osmotic potential through the accumulation of intracellular osmolytes such as proline, glycine, betaine, mannitol and trehalose (Wang *et al.*, 2007).

Trichoderma is known to release molecules such as: xylanases, peptaibols, ceratoplatanins, swollenins, among others, which the plant recognizes and,

through the interaction of the root system, stimulate the defence mechanisms that leads to the accumulation of components of the acid signalling pathways. Jasmonic acid and ethylene (hormones widely studied in the response to different types of stress), as well as hydroperoxide lyase, peroxidase and phenylalanine ammonium lyase that induce lignification (Druzhinina et al., 2011). This project evaluated the role of an expansin-like protein (Swollenin) from *Trichoderma atroviride* (overexpressing and mutant strains) in response to abiotic stress (drought). It was demonstrated that the treatment with the overexpressing strains of Swollenin increased the survival time (13 days) of the plants in the face of a water deficit, compared to 9 days of those plants inoculated with the wild strain of *T. atroviride*. We verified that there was a significantly higher increase in proline in these plants compared to the rest of the treatments. Similarly, the response of guajillo chili plants against the phytopathogen *Rhizotocnia solani* was evaluated, when the were plants treated with the overexprsessor strains they showed a much lower percentage of damage than the non-inoculated plants or plants inoculated with the wild type strain.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS USADOS EN ESTA TESIS

Abreviación	Significado
6-PP	6-pentil-2H-piran-2-ona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la Varianza
Apo	Apoplasto
ARN	Ácido ribonucleico
Avr	Proteínas de Avirulencia
CBD	Dominio de unión a celulosa
CBM	Módulo de Unión a Carbohidratos
CEIB	Centro en investigación en biotecnología
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas
Cyto	Citoplasma
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
EIX	Xilanasa inductora de etileno
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
ET	Etileno
Etc.	Etcétera
ETI	Inmunidad activada por efectores
ETI	Effector triggered immunity
ETS	Susceptibilidad activada por efectores

FCWDE	Enzimas que degradan las paredes celulares de los hongos
FT	Factores de transcripción
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HR	Respuesta Hipersensible
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
ISR	Resistencia sistémica inducida
J1	Defensina
JA	Ácido jasmónico
LBMH	Laboratorio de Biología molecular de hongos
MAMP	Patrones moleculares asociados a los microbios
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
mVOCs	Compuestos orgánicos volátiles microbianos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAPs	Plaguicidas considerados altamente peligrosos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCWDE	Enzimas degradadoras de la pared celular de la planta
PDA	Papa dextrosa agar
PDB	Caldo papa dextrosa
PGPM	Microorganismos promotores del crecimiento vegetal
PRs	Proteínas relacionadas con la patogénesis
PTI	Inmunidad activada por PAMP/MAMP
PTI	PAMP-triggered immunity

qPCR	PCR cuantitativa
R	Proteínas de Resistencia
ROS	Especie reactiva de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
Sl α -DOX1	α -dioxigenasa
SICEVI16	Peroxidasa
SICHI9	Endoquitinasa Clase I
SIGLUA	β -1, 3-glucanasa isoforma clase II
SLPR-5	Osmotina
SITLRP	Proteína de la pared celular del tomate
SM1 / EPL1	Ceratoplatanina
Sp.	Según la especie
Spp.	Según las especies
<i>swo1</i>	Gen de la swollenina
Swo1	Proteína swollenina
<i>T.aSsw01</i>	Cepa que sobreexpresa de swollenina
<i>T.aSsw01-28</i>	Cepa que sobreexpresa de swollenina
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de Morelos

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Uso de químicos en la agricultura.....	3
Microorganismos benéficos una alternativa al uso de agroquímicos	4
<i>Trichoderma</i> sp.....	6
Interacción Trichoderma – planta.....	7
Infección de plantas por Trichoderma.	9
Efecto de MAMP/efectores en la planta huésped	16
Efectos benéficos de Trichoderma en plantas	18
Inducción del sistema de defensa en plantas ISR y SAR	19
Agente de biocontrol.....	22
El cultivo de chile en México.....	26
Problemática en el cultivo de chile.....	27
<i>Phytophthora capsici</i>	27
<i>Rhizoctonia solani</i>.....	28
Factores abióticos.....	28
ANTECEDENTES.....	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS.....	35
OBJETIVO GENERAL	35

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
METODOLOGÍA.....	36
Material de trabajo	36
Medios de cultivo utilizados	38
Pases monospóricos.....	39
Desinfección y germinación de semillas de chile	39
Inoculación de plántulas con las cepas de <i>Trichoderma atroviride</i>	39
Tolerancia al estrés abiótico de las plantas de chile	40
Cuantificación de osmolitos por HPLC	40
Determinación de prolina.....	41
Evaluación de la resistencia a infección por <i>Rhizoctonia solani</i>.....	41
Cuantificación de la expresión de genes marcadores de resistencia en plantas de chile inoculadas con las cepas de <i>T. atroviride</i> por q-PCR.....	41
RESULTADOS	43
Evaluación la capacidad de colonización	47
Evaluación de la respuesta a estrés biótico	48
Cuantificación de la expresión de genes de defensa.....	50
Estrés por sequía.....	53
Cuantificación de osmoprotectores	56
Verificación de mutantes.....	59

DISCUSIÓN	62
<i>Trichoderma atroviride</i> sobreexpresando a Swo1, incrementa el crecimiento de las plantas de Chile vs la cepa silvestre	62
Resistencia a estrés biótico inducido por <i>T. atroviride</i>	63
Resistencia a estrés por sequía inducido por <i>T. atroviride</i>.....	65
Evaluación de la expresión de genes de defensa	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ARTÍCULO PUBLICADO DEL PROYECTO DE DOCTORADO	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Interacción de microorganismos con plantas.....	5
Figura 2: <i>Trichoderma</i> sp. crecida in vitro.....	7
Figura 3: Representación de la interacción de micorrizas.....	8
Figura 4: Modelo de infección de <i>Trichoderma</i> sp.....	9
Figura 5: Proteínas de desestructuración de la celulosa.....	11
Figura 6: Composición estructural de la pared celular de las plantas...	12
Figura 7: Modelo de infección de <i>Trichoderma</i> sp en plantas.....	15
Figura 8: Modelo zigzag de Jones y Dangl.....	17
Figura 9: Inducción de vías de defensa en plantas.....	20
Figura 10: interacción de microorganismo con plantas.....	22
Figura 11: Proceso de micoparasitismo de <i>Trichoderma</i>	23
Figura 12: Composición química de la pared celular de hongos.....	24
Figura 13: Estructura de las proteínas tipo expansina.....	32
Figura 14: <i>Trichoderma atroviride</i> induce el crecimiento en plantas.....	44
Figura 15: Las cepas sobreexpresantes incrementan la longitud de las plantas.....	45
Figura 16: Las cepas sobreexpresantes incrementan la biomasa de las plantas.....	46
Figura 17: La sobreexpresión de la swollenina incrementa la colonización.....	47 y 48

CONTINÚA ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 18: El usos de cepas de <i>T. atroviride</i> reducen el daño causado por <i>R. solani</i>	49
Figura 19: Las cepas sobreexpresantes reducen el daño causado por el hongo fitopatógeno <i>R. solani</i>	50
Figura 20: Integridad del ARN extraído de plantas.....	51
Figura 21: La inoculación con <i>Trichoderma</i> induce la expresión de genes relacionados con la defensa en plantas.....	52
Figura 22: Plantas sometidas a estrés por sequía durante 13 días.....	54
Figura 23: Las cepas sobreexpresantes inducen resistencia a sequía..	55
Figura 24: Las cepas sobreexpresoras disminuyen la mortalidad.....	56
Figura 25: La inoculación de <i>T. atroviride</i> no incrementan la concentración de osmolitos.....	57 y 58
Figura 26: Las cepas sobreexpresoras incrementan significativamente la concentración de prolina.....	59
Figura 27: Secuencia del gen <i>sw01</i>	60
Figura 28: Amplificación de la región del gen <i>sw01</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efectores de proteínas de <i>Trichoderma</i>	18
Tabla 2: Cepas utilizadas en este trabajo.....	36
Tabla 3: Información de oligos utilizados en este trabajo.....	37

INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile es considerado una de las hortalizas más importantes a nivel mundial. En el género *Capsicum* podemos encontrar 31 especies, sin embargo, solo algunas han sido domesticadas, dentro de estas podemos encontrar a *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*. Por la extensión de su cultivo y el valor económico que representa su producción, *C. annuum* es una de las especies cultivadas más importante en todo el mundo, y es en México donde se encuentra la mayor diversidad.

En América desde hace unos 7,500 años el chile ha sido considerado uno de los principales productos dentro de la alimentación. Los datos indican que en México se domesticó hace más de 6000 años, principalmente desde la región sur de Puebla, el norte de Oaxaca hasta el sureste de Veracruz (Carrizo García *et al*, 2018). Culturalmente es un símbolo que da identidad a los mexicanos, pero igualmente forma parte importante de diversas culturas (India, China, Polinesia, etc.) por su impacto en la gastronomía internacional, la amplia aceptación de este cultivo se debe a la versatilidad que permite elaborar una amplia gama de alimentos, gracias a sus características de picor, aroma, sabor, etc. En el país existen alrededor de 170 000 hectáreas sembradas con cerca de 3 millones de toneladas anuales de chile seco y verde. Esto representa un valor comercial de aproximadamente 13 224 millones de pesos. México se ubica como el principal exportador de chile verde a escala internacional y es el segundo productor mundial (Aguirre y Muñoz, 2015).

Uno de los principales retos que presenta el cultivo de chile en México, al igual que muchos otros cultivos, es la disminución en la producción. Las causas más comunes que provocan ésta son el crecimiento deficiente de plantas y la destrucción de cosechas por factores bióticos y abióticos. Los agricultores en busca de rebasar estos retos y por la alta demanda del producto los conlleva al uso indiscriminado, no regulado de agentes químicos (fertilizantes y plaguicidas). Sin embargo, esto lleva a un deterioro de la calidad de los suelos, provocando principalmente la infertilidad de estos. De igual manera el daño que provocan a la flora y a la fauna cada vez es más notorio.

En busca de una solución amigable con el ambiente, en los últimos años se ha implementado el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y nutrientes (Crowley *et al.*, 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede *et al.*, 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996b). Algunas bacterias que se han descrito como PGPM son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, entre otros (Karakurty Aslantas, 2010), por otro lado, existen hongos beneficiosos para las plantas, que tienen la capacidad de formar una asociación benéfica, mejor conocido como micorriza, un ejemplo claro de la interacción planta-hongo es *Trichoderma* sp.

MARCO TEÓRICO

Actualmente debido al alto nivel de exigencias en cuanto alimentos, la agricultura convencional intensiva se ve forzada a producir de manera masiva a nivel mundial, a pesar de la amplia experiencia científica que existe, aún no se ha logrado disminuir radicalmente los graves impactos ambientales así como los problemas de productividad y rendimiento, por lo que existe la necesidad de incrementar la producción total de alimentos sobre bases sostenibles, sin comprometer los recursos naturales y el medio ambiente.

El uso de microorganismos benéficos puede influir significativamente en la producción de cultivos de interés como lo es el chile, siendo una estrategia adecuada para conservar y mejorar el equilibrio ecológico de sistemas productivos, principalmente reduciendo el uso de agroquímicos (Ángel - Núñez, 2000).

Uso de químicos en la agricultura

La producción de cultivos agrícolas conlleva al uso de químicos que se utilizan como elementos para incrementar la producción y rendimiento de los plantíos de interés, los agroquímicos comúnmente llamado cuando referimos a los químicos utilizados en la agricultura principalmente son: los fertilizantes y los plaguicidas.

El uso de agroquímicos tiene larga trayectoria con nosotros, los beneficios a corto plazo y en gran escala los hacen muy atractivos para implementarlos prácticamente en cualquier cultivo de interés, cumplen una función de reconocida importancia en la agricultura y tienen un impacto positivo en la alimentación mundial, todas estas ventajas han hecho que esta tecnología se posicione rápidamente en todo el mundo.

Sin embargo el manejo y la mala planeación, no dejando de un lado los efectos adversos indirectos han conllevado a daños severos en el ambiente, en la salud y en la sociedad. Actualmente la mayoría de los países desarrollados han implementado leyes que regularizan el uso de estos agentes químicos e incluso han prohibido la implementación de algunos principalmente en plaguicidas.

El uso de plaguicidas en dosis elevadas o un mal manejo, interfiere con el medio ambiente, esto ocurre cuando la cantidad suministrada no solamente llega a la plaga de interés, si no que afecta a organismo benéficos e incluso la salud humana, sin dejar de un lado el daño que causa en la flora y fauna, contaminando aguas y los alimentos.

La Organización Mundial de la Salud, se ha pronunciado en el caso de los alimentos con cantidades altas de residuos de agroquímicos, cada país tiene reglamentos internos que regulan la entrada y salida de alimentos provenientes del campo bajo ciertas restricciones.

En México el uso de plaguicidas no está totalmente regulado, Garcia-Hernandez y colaboradores en el 2018 mencionan que hay cerca de 181 plaguicidas considerados altamente peligrosos (PAPs), un ejemplo claro es que en México se sigue utilizando el Malation, un plaguicida altamente tóxico que está prohibido en otros países como en Estado Unidos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) (García - Hernández *et al*, 2018) los cuales de acuerdo a la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) se pueden clasificar como extremadamente peligrosos, mortales si es inhalado, carcinógeno, probable carcinógeno, mutagénico, tóxico en reproducción, perturbador endócrino, muy bioacumulable, muy persistente en agua, suelo o sedimento, muy tóxico en organismos acuáticos, muy tóxico en abejas (CICOPLAFEST, 2016).

Microorganismos benéficos una alternativa al uso de agroquímicos

Existe una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, que han sido usados en la agricultura, esto debido a que poseen características importantes para promover el crecimiento en plantas, tienen actividad de biocontrol de plagas, protección de la planta frente a fitopatógenos, entre otras. Estos microorganismos forman asociaciones benéficas con las plantas, en la mayoría de los casos pueden ser endófitos de raíz o simplemente rizosféricos (Schulz *et al.*, 2005).

Los mecanismos que usan estos microorganismos pueden ser directos o indirectos los cuales se van a reflejar de manera positiva en la planta huésped (ver figura 1), refiriéndonos a mecanismos directos a aquellos de los cuales interactúan directamente con la planta, por ejemplo la excreción de fitohormonas por ejemplo auxinas, giberelinas, etc., la solubilización de minerales, producción de sideróforos o agentes quelantes, fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Mientras que los mecanismos Indirectos influyen en la planta positivamente al que podríamos llamarle un efecto secundario, dentro de estos está la activación de las vías de defensa mediadas por fitohormonas, que más adelante se explicará, también involucra la capacidad como agentes de biocontrol de los microorganismos (Ahemad y Kibret, 2012).

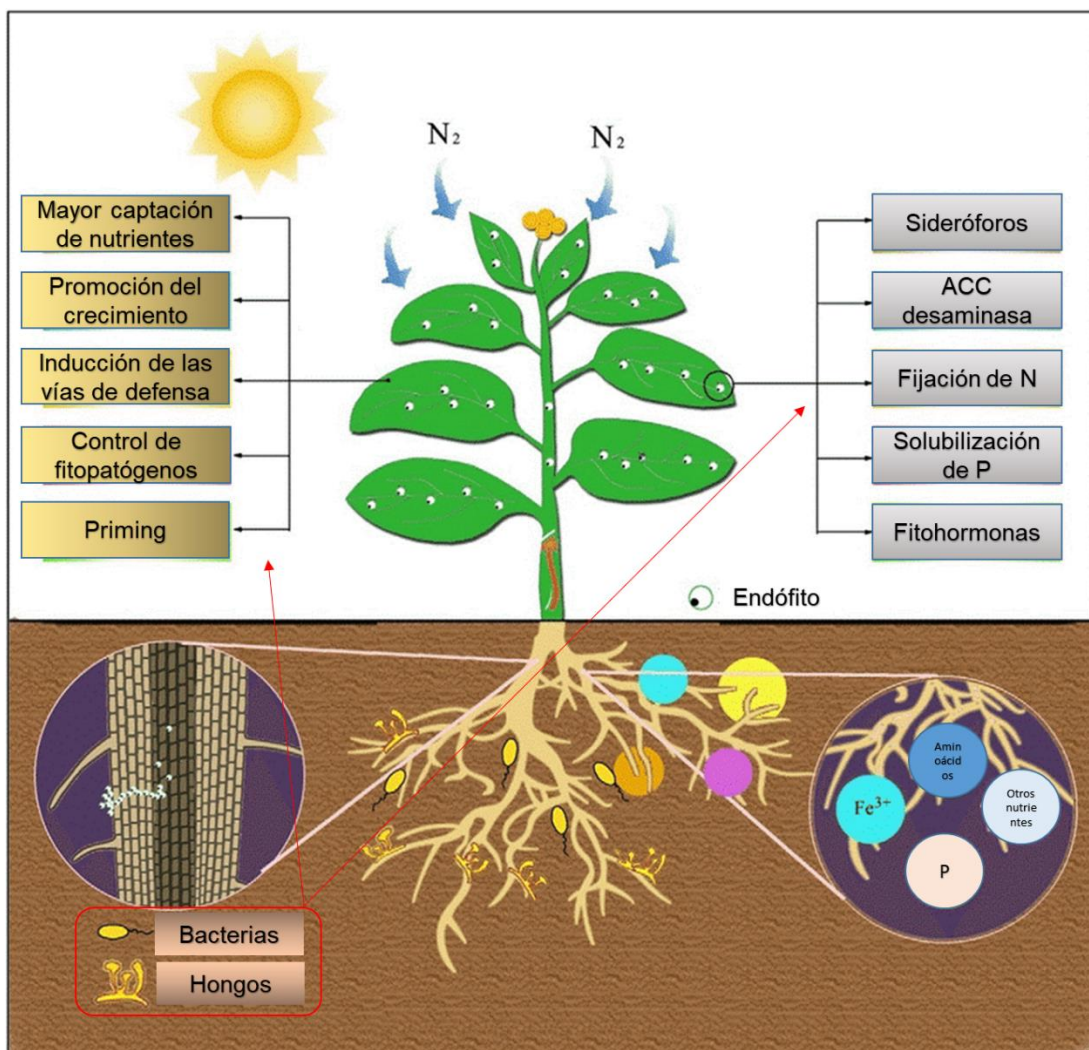


Figura 1: Esquema de la interacción de bacterias y hongos benéficos con su planta huésped. Tomado y modificado de Innoplant.es

Dentro de las principales bacterias benéficas para las plantas que se han reportado podemos encontrar a *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* (Sánchez-Cruz *et al.*, 2018). Por otro lado también algunas levaduras tiene esta característica, por mencionar algunas podemos encontrar a levaduras del género *Rhodotorula* y *Naganishia*, (Tápia-Vazquez *et al.*, 2019), mientras que cuando hablamos de hongos principalmente involucramos a los hongos micorrízicos y a *Trichoderma* sp.

***Trichoderma* sp.**

El género *Trichoderma* tiene una larga tradición de uso en la agricultura y la industria, y los hongos de este género se encuentran entre los microbios más útiles para el bienestar humano (Schmoll *et al.*, 2016).

Trichoderma representa un grupo de hongos filamentosos que pertenecen al Reino Mycetozoa (fungi), división Eumycota, subdivisión Ascomycota, clase Euascomycetes, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, género *Trichoderma* e *Hypocrea* (Druzhinina y Kubicek, 2005).

Algunas especies del género *Trichoderma* se encuentran entre los microorganismos saprotróficos más aislados. Estos hongos habitan principalmente en el suelo y sobre la madera, la corteza de árboles, sobre otros hongos e innumerable variedad de sustratos, demostrando su capacidad oportunista y su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas (Klein *et al.*, 1998, Jaklitsch, 2011). La identificación de estos hongos es complicado debido a su pleiomorfismo, es decir, algunos de ellos pueden existir en dos etapas morfológicas y ser fisiológicamente diferentes. Durante la etapa sexual (teleomórfica) se identifican como género *Hypocrea*, mientras que en la etapa asexual (anamórfica o mitospórica) se clasifican dentro del género *Trichoderma*; en este trabajo nos referimos al género colectivamente como *Hypocrea* / *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2011)

Las especies de *Trichoderma* se caracterizan por formar colonias de rápido crecimiento, inicialmente hialinas que luego se viran a verdes debido a la pigmentación de sus esporas (ver figura 2). Estas alcanzan de 2 a 9 cm de

diámetro después de 4 días de crecimiento a 20 °C en cajas de cultivo. Bajo condiciones adversas de nutrientes o desecación tienen la capacidad de producir clamidosporas que son de vital importancia para la sobrevivencia (Esposito y Da Silva, 1998).

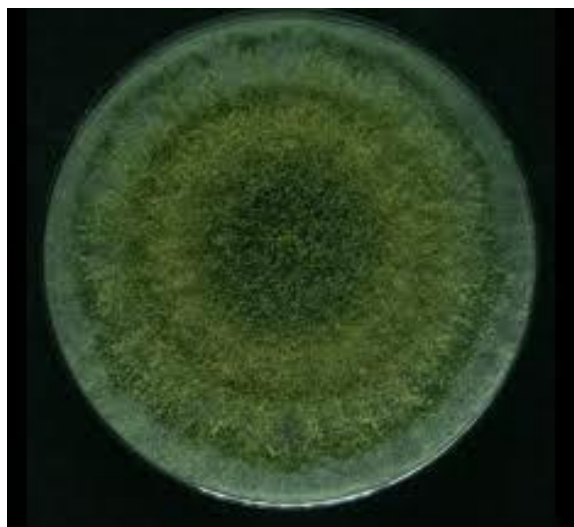


Figura 2: *Trichoderma sp.* crecida *in vitro* sobre medio Papa dextrosa agar (PDA)

La mayoría de las especies de *Trichoderma* tienen el potencial de ser utilizados como control biológico contra patógenos de plantas y al mismo tiempo promueven el crecimiento de las plantas y activan la resistencia a estrés biótico y abiótico (Druzhinina *et al.*, 2011; Lorito *et al.*, 2010).

Interacción *Trichoderma* – planta

La mayoría de las plantas son colonizadas por hongos que no causan síntomas de enfermedad. Estos hongos, llamados benéficos, ya que mejoran el crecimiento de las plantas y promueven la resistencia a las enfermedades, así como la tolerancia al estrés abiótico, y se benefician de la planta porque estas le proporcionan nutrientes (Rodríguez *et al.* 2009.)

Los hongos micorrízicos son simbioses estrechamente vinculados a las raíces de las plantas. Como tales, son capaces de colonizar extracelularmente (ectomicorrizas) o intracelularmente (endomicorrizas), porque evaden el

sistema inmunológico de la planta (Zuccaro *et al.*, 2014). *Trichoderma* mantiene gran relación analógica con las ectomicorrizas, en lo que respecta a su interacción con las raíces (Harman *et al.*, 2004).

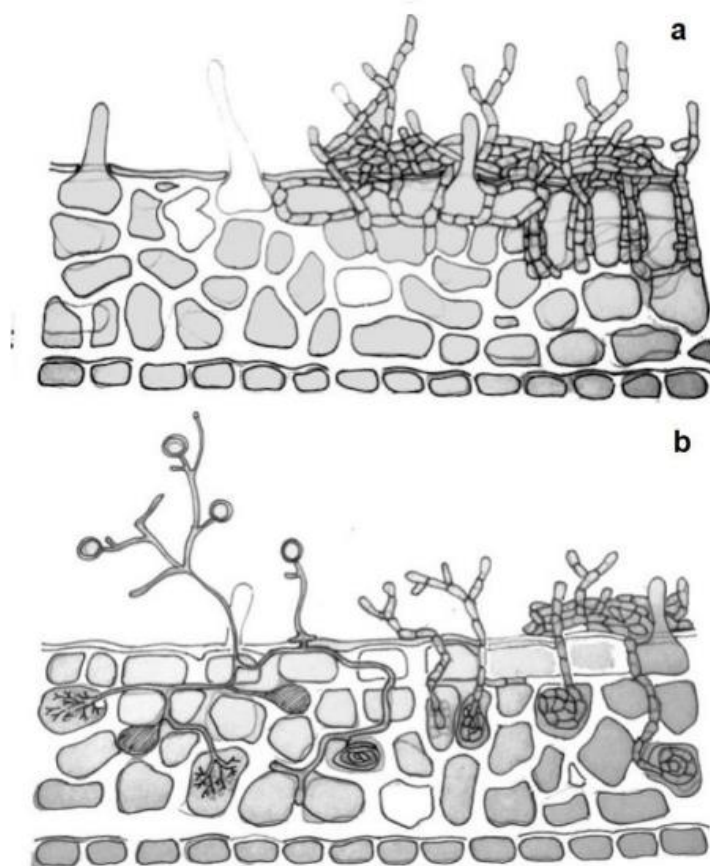


Figura 3: Representación esquemática de la interacción de **a)** ectomicorrizas y **b)** endomicorrizas con raíces de plantas. Tomado de Nazareno-Saparrat y colaboradores, 2011.

Varias cepas de *Trichoderma* establecen una relación endofítica con raíces de cultivos económicamente importantes, como el maíz, el tomate, el cacao, el chile, el pepino, entre otras, lo que resulta en una mejora del cultivo (Chacón *et al.*, 2007, Harman *et al.*, 2004, Alfano *et al.*, 2007). *Trichoderma* sp. coloniza y penetra la superficie de las raíces de las plantas, donde el crecimiento se limita principalmente al apoplasto, la epidermis y las primeras capas de células corticales. (Druzhinina *et al.*, 2011).

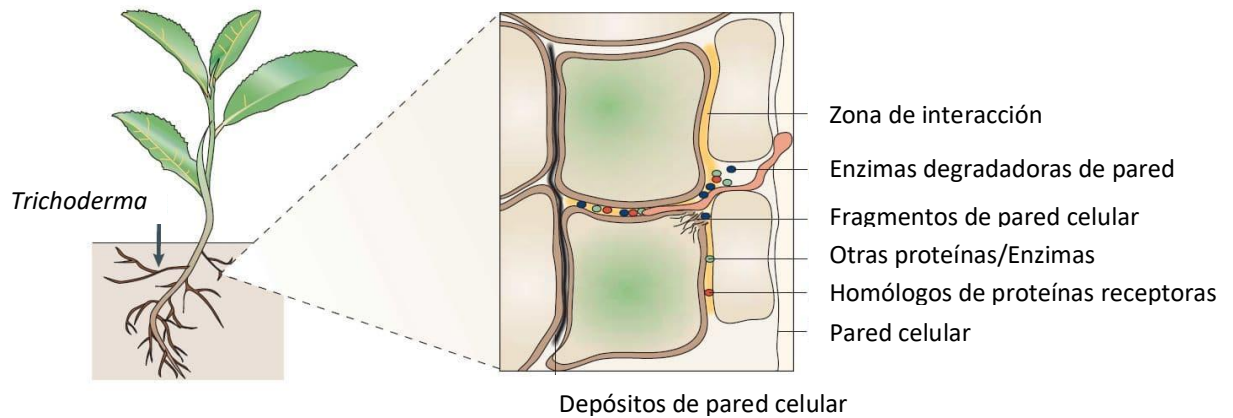


Figura 4: Descripción del modelo de infección de *Trichoderma sp.* (Modificado de Harman *et al.* 2004)

Infección de plantas por *Trichoderma*.

La rizósfera es uno de los ambientes donde se encuentran con mayor frecuencia las interacciones planta-microorganismo, su composición determina en gran parte la distribución y agregación de las plantas a un determinado hábitat (Heinze *et al.*, 2015).

El género *Hypocrea/Trichoderma* se encuentra principalmente en este ambiente, siendo el lugar adecuado para aprovechar los recursos como los exudados de las raíces de plantas. Nehls y colaboradores en el 2010 mencionan que los monosacáridos y disacáridos excretados por las raíces de las plantas en la rizósfera proporcionan un importante sustrato de carbono para las micorrizas, por otro lado se sabe que la sacarosa tiene un papel similar para el establecimiento de *T. virens* en la rizósfera de su planta huésped (Vargas *et al.*, 2009).

Druzhinina y colaboradores (2011), mencionan que la amplia distribución de *Trichoderma* en la rizósfera podría deberse: a) que la mayoría de las raíces de

plantas terrestres, cerca del 92%, está colonizada por hongos micorrízicos, siendo éstos presas potenciales de *Trichoderma*. Sin embargo, faltan estudios específicos que evalúen esta interacción *Trichoderma*-hongos micorrízicos. b) las raíces de las plantas, y especialmente las puntas de las raíces, están cubiertas por una cápsula viscosa similar a un gel (llamada mucigel) compuesta por polisacáridos altamente hidratados, como pectinas y hemicelulosas. Estos componentes son objetivos fácilmente degradables para las hemicelulasas de *Hypocrea/Trichoderma* sp. (Druzhinina *et al.*, 2011).

Como mencionamos anteriormente varias cepas de *Trichoderma* establecen una relación benéfica con raíces de cultivos económicamente importantes, y a pesar de que la planta se beneficia directamente de esta asociación, estas reaccionan a la colonización de manera indirecta (Rodríguez *et al.*, 2009), activando su sistema inmune innato (Shoresh *et al.*, 2010, Yedidia *et al.*, 1999).

Las plantas han desarrollado este sistema innato para reconocer características comunes de los microorganismos, que se conocen como patrones moleculares asociados a los microbios (MAMP) (Jones y Dangl, 2006).

Las MAMP incluyen moléculas como la quitina de los hongos y la proteína de la flagelina de las bacterias (Jones y Dangl, 2006). Se han identificado MAMP bioquímicamente diversas en *Trichoderma*, incluida la proteína ceratoplatanina SM1 / EPL1 (TV_110852, TR_82662 y TA_302952) (Djonovic *et al.*, 2007, Frischmann, 2013), la xilanasa inductora de etileno (EIX; TR_123818, TV_72838, y TA_82355) (Ron y Avni, 2004), y la proteína swollenina (ACB05430) de *T. asperellum* (TR_123992, TV_49838 y TA_80187).

La expresión de SM1 se induce por la interacción del hongo con la planta, pero también se puede expresar en ausencia de estas, se sabe que en la interacción del hongo con la planta, esta proteína promueve la expresión de genes relacionados con la patogénesis y reacciones de hipersensibilidad como glucanasas o peroxidasas (Djonovic *et al.*, 2007). Por otro lado, EIX tiene un doble papel durante la colonización de la planta: inicialmente es relevante su actividad lítica, y posteriormente induce la resistencia sistémica como se ve en cultivares específicos de tabaco y tomate (Ron y Avni en el 2004, Rotblat *et al.*, 2002). Otras proteínas relevantes en la interacción de la planta con

Trichoderma son las hidrofobinas hay reportes en que la capacidad de *Trichoderma asperellum* para reconocer y adherirse a la raíz está implicada por estas proteínas, gracias a su capacidad hidrofóbica que presenta, además que también pueden activar el sistema de defensa de las plantas (Schmoll *et al.*, 2016).

Por otra parte la proteína swollenina, una proteína tipo expansina muy similar a las ceratoplaninas, también está involucrada en la colonización de plantas. La actividad esta proteína en materiales celulósicos como en fibras de algodón actúa deformándola sin embargo no hay liberación de azúcares reductores, de igual manera, se sabe que participa en la unión con la pared celular de las raíces de la planta huésped sugiriendo pudiera estar involucrada en la colonización de las raíces y pudiera permitir la entrada de otras moléculas incluido las enzimas que participan en la degradación de la pared celular (exoglucanasas, endoglucanasas y β -glucosidasas) (Quiroz-Castañeda *et al.*, 2011; Saloheimo *et al.*, 2002).

La pared celular de las plantas es la primera barrera a la que se enfrentan los microorganismos, tanto benéficos como patógenos han encontrado una manera de superar este primer obstáculo, en el caso de *Trichoderma* se sabe que la swollenina es una de las proteínas encargadas de relajar o aflojar el área cristalina de celulosa (ver figura 5), recordemos que la pared celular de las plantas es una matriz muy organizada, está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina (ver figura 6) (Bettache *et al.*, 2018).

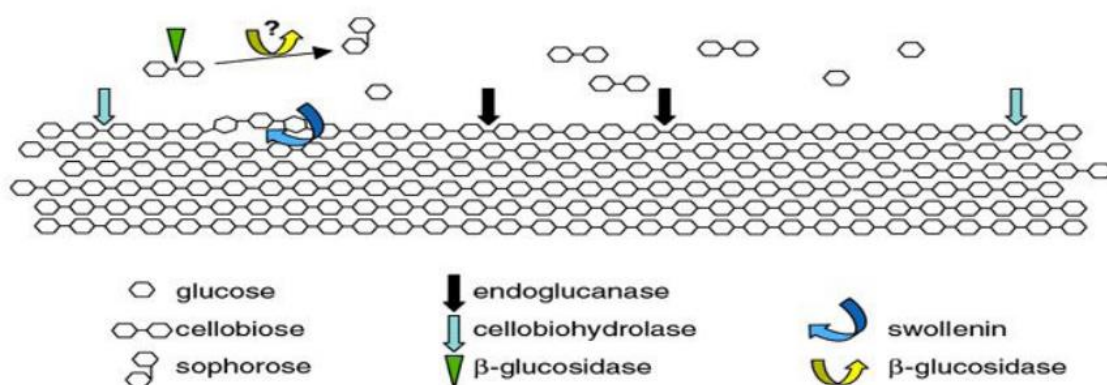


Figura 5: Proteínas involucradas en la desestructuración de la celulosa. Tomado de Bettache *et al.*, 2018)

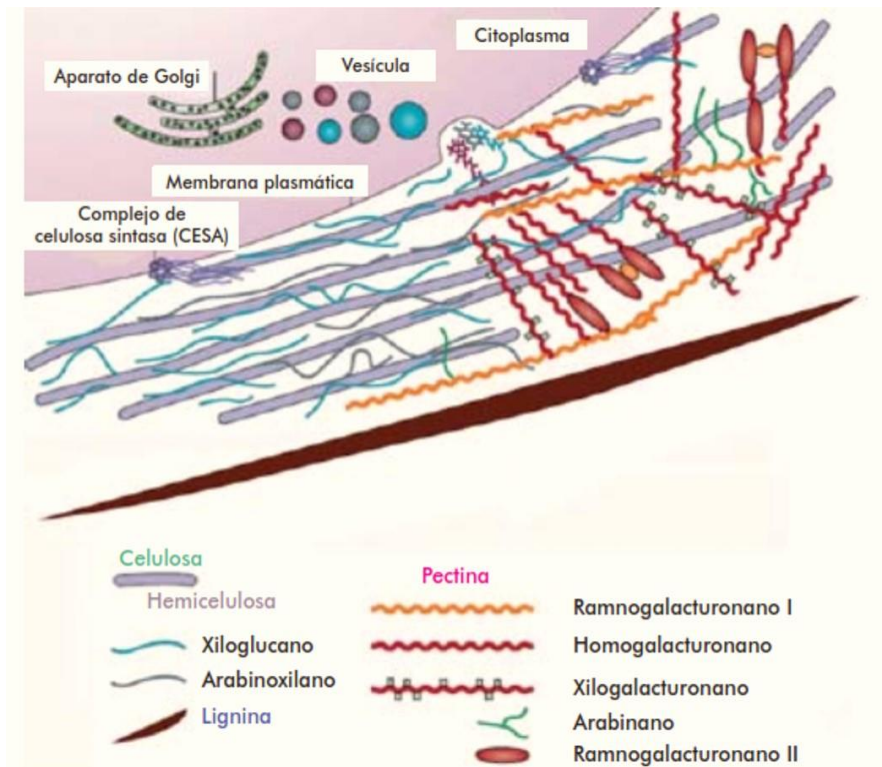


Figura 6: Composición estructural de la pared celular de las plantas. Tomado de tomado y modificado de Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

La celulosa es un polisacárido compuesto por D-glucosa unidos covalentemente por enlaces glucosídicos β -1,4, que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unidos por un enlace β -1,4). Tiene regiones cristalinas que la hacen altamente resistente y estable ante ataques de patógenos. Por otro lado la hemicelulosa contiene moléculas como glucosa, manosa, galactosa, arabinosa y xilosa, que pueden unirse con microfibrillas de celulosa y lignina a través de puentes de hidrógeno y enlaces del tipo éster respectivamente, proporcionando adicional a la celulosa una matriz más reforzada (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

Brotman y colaboradores en el 2008 evaluaron la interacción de cepas de *T. asperellum* mutada y sobreexpresoras del gen de la swollenina con plantas de pepino (*Cucumis sativus*), donde demostraron que las cepas sobreexpresante

de swollenina aumentaron su capacidad para colonizar las raíces de pepino en las primeras 6 horas post-inoculación, mientras que la cepa mutante disminuyó su capacidad para colonizar la raíz en un 40 % comparado con la cepa silvestre. En su trabajo también comprobaron que un fragmento sintético del dominio de unión a carbohidratos de esta proteína es capaz de inducir resistencia sistémica contra *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*.

En los últimos años se ha venido estudiando la manera en que las bacterias modulan la respuesta inmune de las plantas (Pel y Pieterse, 2013), para lograr establecerse en el espacio intercelular (apoplasto) o en áreas celulares restringidas. En el caso de los hongos esta modulación se logra reprogramando a las células que rodean el área que colonizaran para mantener la integridad de la célula huésped que permitan una interacción simbiótica a largo plazo (Van Wees *et al.*, 2008).

Además de las MAMPs los microorganismos producen moléculas efectoras, las que son estrictamente inducibles por interacciones patógenas, y probablemente endofíticas, con las plantas (Lo Presti *et al.*, 2015). Hasta la fecha, se han estudiado principalmente en patógenos de plantas y animales (Kamoun, 2007, Hogenhout *et al.*, 2009). Estas son proteínas secretadas diversas, que alteran los procesos de las plantas facilitando la colonización, mediante mecanismos que modulan la respuesta inmune innata. Estos mecanismos incluyen la inhibición de quitinasas y proteasas, la eliminación de ROS o la modulación directa de la maquinaria transcripcional del huésped (Oliva *et al.*, 2010).

Zuccaro *et al.*, (2014) y Plett *et al.*, (2011) detectaron la presencia de proteínas tipo efectoras, en un análisis genómico de simbiontes de raíz *Piriformospora indica* y *Laccaria bicolor* lo que sugiere que los microorganismos simbióticos regulan las defensas innatas de las plantas de manera similar a los patógenos (Van Wees *et al.*, 2008, Schafer *et al.*, 2009). Sin embargo, las funciones de estas moléculas en hongos endófitos, como *Trichoderma*, que son capaces de evadir el sistema inmunológico de la planta sin ser detectados o reconocidos como fitopatógenos aún no se han aclarado.

La función de los efectores de interferir con la inmunidad de la planta se explica más adelante en el modelo de zigzag de Jones (Jones y Dangl, 2006). Este modelo describe y propone cuatro fases de reconocimiento molecular que resulta en la activación del sistema inmune de las plantas activando PTI (PAMP-triggered immunity) y la ETI (Effector triggered immunity) aunque esta propuesta se refiere a la interacción de microorganismos fitopatógenos con las plantas refiriéndose a los MAMP como PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), se atribuye que ocurre de manera similar con microorganismos benéficos, como es el caso de *Trichoderma*.

La PTI implica una respuesta celular local contra el microorganismo que invade, tal como la deposición de callosa, con el fin de limitar el crecimiento del fitopatógeno. Esta respuesta local también puede incluir por ejemplo explosiones oxidativas, una respuesta agresiva que involucra la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno, tales como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, que actúan para ayudar a expulsar al invasor de la planta (Strich *et al.*, 1989). La PTI también incluye al proceso de resistencia sistémica inducida (ISR), que es eficaz contra un amplio espectro de patógenos y depende de las hormonas vegetales, el ácido jasmónico y el etileno (Van Wees *et al.*, 2008, Schafer *et al.*, 2009).

Schmoll y colaboradores (2016) describen y explican de manera gráfica el proceso en el que *Trichoderma* puede evadir el sistema inmune de las plantas utilizando MAMPs, efectores y proteínas de degradación de pared celular, ver figura 7.

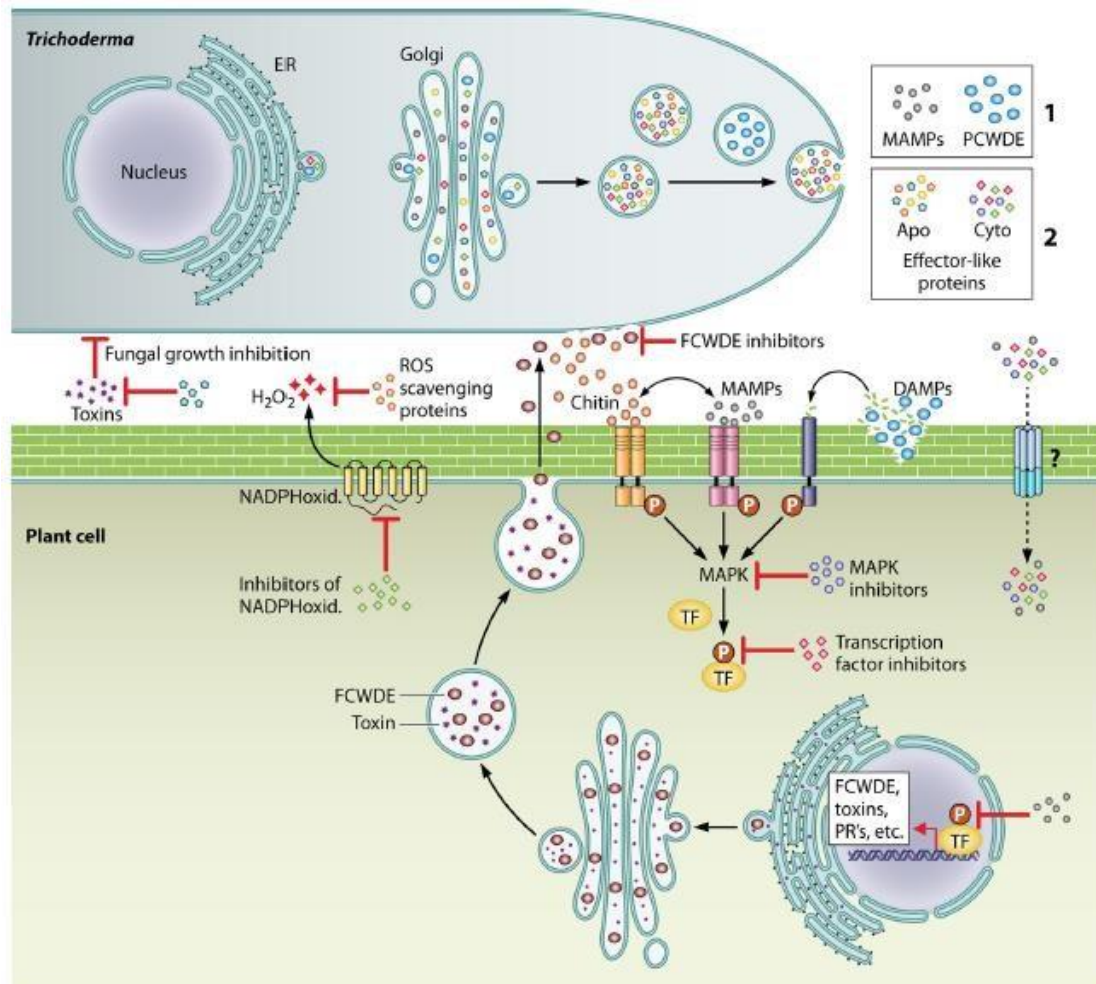


Figura 7: *Trichoderma* sp. secreta constitutivamente proteínas que son detectadas por las células vegetales (por ejemplo, Sm1). Estas proteínas se denominan patrones moleculares asociados a los microbios (MAMP). Además, la liberación de material celular vegetal (denominados patrones moleculares asociados al daño [DAMP]) por la acción de las enzimas degradadoras de la pared celular de la planta (PCWDE) secretadas por *Trichoderma*, activan el sistema inmunológico de la planta. Las células vegetales liberan compuestos antifúngicos, incluidas toxinas y enzimas que degradan las paredes celulares de los hongos (FCWDE, por sus siglas en inglés). La quitina liberada por la acción de FCWDE es reconocida por un receptor específico de la célula vegetal y activa la respuestas inmunes, activando MAPK que están involucradas en la respuesta a infección, estas a su vez fosforilan (círculos rojos) factores de transcripción (FT), que la expresión de genes relacionados con la patogénesis, (proteínas [PRs], toxinas y FCWDE). *Trichoderma* sp. También secreta proteínas cuyos genes se inducen durante la interacción con la planta. Estas proteínas, aquí denominadas proteínas de tipo efector, se secretan a través del sistema de secreción tipo 2. Se hipotetiza que las funciones de las proteínas secretadas por *Trichoderma* durante

su interacción con las raíces son permitir al hongo ser ayudado al hongo a evadir, y/o evitar el sistema inmunológico de la planta. Estas proteínas pueden actuar en el apoplasto (Apo) o en el citoplasma (Cyto). Un efector puede tener diferentes objetivos, incluyendo la eliminación de ROS, la inhibición de FCWDE y toxinas en el espacio apoplásico, o inhibir la activación de MAPK, TF u oxidasas NADPH en el citoplasma. Aún se desconoce qué transportador o qué mecanismos utilizan estos efectores del apoplasto para desplazarse hacia el interior de la célula.

Efecto de MAMP/efectores en la planta huésped

Como se mencionó anteriormente, la interacción entre microorganismos-planta es más compleja de lo imaginado, conlleva a una serie de pasos que pueden resultar en una exitosa interacción o una evasión de ésta. Diversas moléculas, incluidas proteínas, metabolitos secundarios, péptidos, factores de transcripción, etc. son fundamentales a la hora de interactuar. El diagrama anterior donde se muestra el mecanismo de interacción y colonización de *Trichoderma* sobre su planta huésped, la podemos comparar con el modelo descrito por Jones y Dangl en el 2006, observamos que *Trichoderma* excreta moléculas que tiene “etiquetas” que se conocen como patrones moleculares (MAMPS) que también pueden interactuar como efectores, estas son reconocidas por las plantas. La interacción de estas moléculas puede conllevar a la activación de diferentes vías de respuesta, activando el sistema de defensa.

El modelo de zigzag reportado por Jones y Dangl, menciona que la primera etapa de respuesta de defensa de la planta se basa en la percepción de MAMP que inducen inmunidad primaria activada por MAMP (PTI), para contrarrestar los microorganismos invasores. En la segunda etapa, los microorganismos que intentan colonizar a la planta liberan moléculas que interfieren con el PTI previamente activado por los MAMPs, lo que resulta en la supresión de esta barrera de defensa (PTI). En la tercera etapa en respuesta a estos efectores la planta activa su sistema de defensa ETI, el cual está regulada principalmente por las fitohormonas Jasmonato (JA), etileno (ET) y ácido salicílico (SA) (SA) (Ramírez-Valdespino y colaboradores, 2019). La cuarta fase se produce cuando los microorganismos ya no expresan el efector reconocible o cuando han

adquirido uno nuevo que les permite contrarrestar la ETI, lo que los convierte en colonizadores exitosos (ver figura 8).

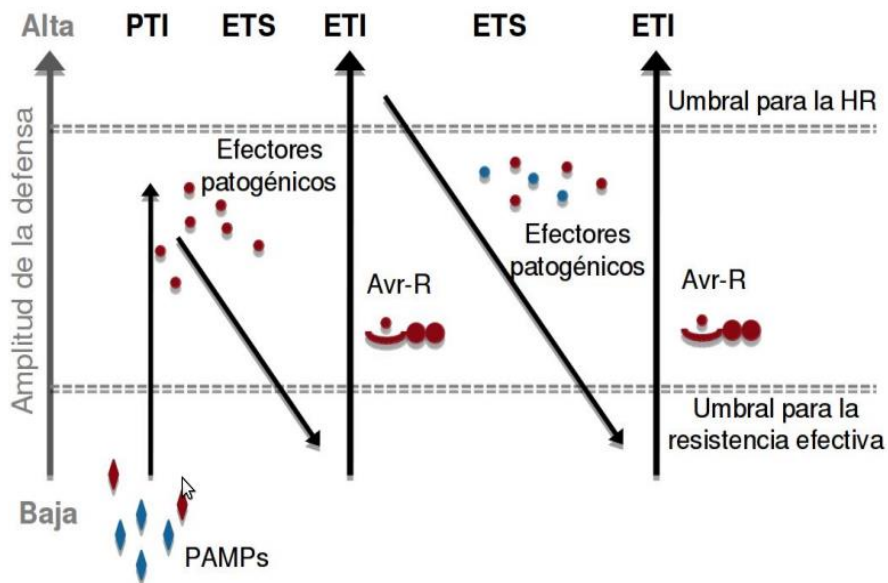


Figura 8: Esquema del modelo zigzag que explica la activación del sistema inmune de plantas (**HR:** Respuesta Hipersensible; **Avr:** Proteínas de Avirulencia; **R:** Proteínas de Resistencia, **PTI:** inmunidad activada por PAMP/MAMP, **ETS:** susceptibilidad activada por efectores y **ETI:** inmunidad activada por efectores). (Modificado de Jones y Dangl, 2006).

Se ha reportado que algunas especies de *Trichoderma* además de los beneficios en el desarrollo de la planta, también tienen la capacidad de inducir la resistencia sistémica de las plantas, protegiéndolas así de bacterias, virus y hongos fitopatógenos. Esta estimulación se lleva a cabo debido a que *Trichoderma* libera moléculas (MAMPs) que pueden tener la doble función de actuar como efectores, que la planta reconoce activando su sistema inmune, sin embargo, está claro que *Trichoderma* puede superar estas barreras y formar una asociación benéfica con la planta.

Ramírez-Valdespino y colaboradores, 2019 hicieron una recopilación de información, de los principales efectores que están presentes en diversas

especies de *Trichoderma*, aunque algunos ya han sido reportados con capacidad de actuar como MAMP. (Ver tabla 1)

Tabla 1: Efectores de proteínas de *Trichoderma* validados funcionalmente durante la interacción con plantas. (Tomado de Ramírez - Valdespino y colaboradores, 2019)

Family	Protein	<i>Trichoderma</i> strain	Function in interaction with plants
Cerato-platanins	Sm1 (small protein 1)	<i>T. virens</i>	Induction of defense-related genes, production of ROS and phenolic compounds.
	Sm2 (small protein 2)	<i>T. virens</i>	Involved in root colonization and plant protection.
	Epl1 (eliciting plant response-like)	<i>T. atroviride</i>	Induction of defense-related genes.
		<i>T. harzianum</i>	Induction of defense-related genes.
		<i>T. formosa</i>	Triggered of plant immune system.
Swollenin (expansin-like protein)	<i>T. asperellum</i>	Induction of defense-related genes. Involved in root colonization and induction of plant defense.	
Glycoside-hydrolases	Thph1 and Thph2 (cellulase-like protein)	<i>T. harzianum</i>	Induction of defense-related genes.
	Cellulases	<i>T. longibrachiatum</i>	Activation of plant defense pathways.
	ThPG1	<i>T. harzianum</i>	Involved on colonization of plant roots.
	Eix (xylanase)	<i>T. viride</i>	Triggers ET biosynthesis and hypersensitive response.
Hydrophobins	HYTLO1	<i>T. longibrachiatum</i>	Activate defense-related responses and growth promotion.
	TVHYDII1	<i>T. virens</i>	Involved in colonization of plant roots.
	HBF2-6	<i>T. asperellum</i>	Involved in root colonization and induction of JA and SA pathways.
	TasHyd1	<i>T. asperellum</i>	Involved in root colonization.

Efectos benéficos de *Trichoderma* en plantas

Mecanismos de promoción de crecimiento

Trichoderma sp. ha sido utilizado ampliamente en la agricultura, por los efectos benéficos que tiene sobre las plantas, por ejemplo como agente promotor del crecimiento y como control biológico frente a algunos hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Harman *et al.*, 2004).

En plantas de maíz (*Zea mays*), la inoculación con *Trichoderma* afecta de manera positiva la cantidad de biomasa así como la arquitectura del sistema radicular aumentando el desarrollo del pelo radicular, lo que lleva a un mayor

rendimiento de las plantas. (Bjorkman *et al.*, 1998). La literatura propone que el incremento en la producción de biomasa radicular se debe principalmente a la participación de las auxinas (fitohormonas secretadas por *Trichoderma*) Contreras y colaboradores (2009) demostraron que las auxinas producidas por *T. virens* y *T. atroviride* influyen en el desarrollo de biomasa y la producción de raíces laterales. Esto se ve reflejado en la mejora en la absorción de agua y nutrientes por la planta huésped (Harman *et al.*, 2004).

Además de las fitohormonas secretadas por *Trichoderma* las cuales están involucradas en el crecimiento de las plantas, los compuestos orgánicos volátiles microbianos (mVOCs) también participan de manera similar. Estos son compuestos lipófilos volátiles a temperatura y presión ambiente, de bajo peso molecular. Estos se clasifican como: mono y sesquiterpenos, alcoholes, cetonas, lactonas, ésteres, tioalcoholes, tioésteres y ciclohexenos. El 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) es un compuesto producido por diversas especies de *Trichoderma*, en *T. atroviride* particularmente se ha demostrado que induce el crecimiento y la formación de raíces laterales en *A. thaliana* (Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha sugerido que la capacidad de aumentar el crecimiento y a su vez la producción de las plantas mediante la colonización por *Trichoderma* implica otros mecanismos como: la solubilización de nutrientes minerales, como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} y Zn^0 que pueden no estar disponibles para las plantas en algunos suelos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

Inducción del sistema de defensa en plantas ISR y SAR

Además de los efectos directos que tienen los microorganismos benéficos sobre las plantas, existen otros indirectos como la estimulación de la resistencia sistémica de estas, este proceso ha sido caracterizado a partir de la infección de plantas por bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Ton *et al.*, 2002). Con este efecto, protegen a las plantas contra la infección de bacterias, virus y hongos fitopatógenos. Particularmente, en el caso de *Trichoderma* además de estos,

también puede activar la resistencia sistémica contra nematodos siendo eficaz en activar la resistencia sistémica contra estrés biótico y abiótico (Figura 9).

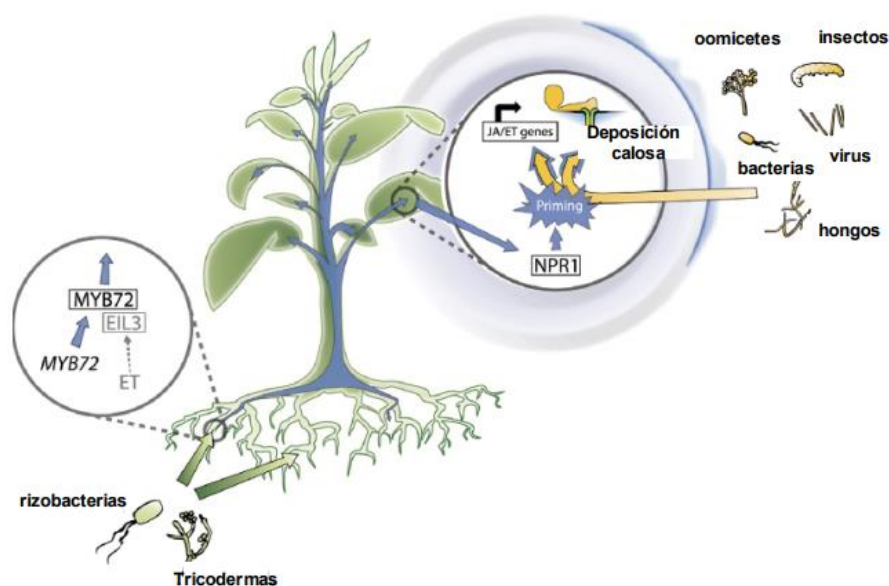


Figura 9: Representación de la inducción de vías de defensa por bacterias y *Trichoderma*. (Modificado de cura 2012).

Las plantas poseen un sistema de defensa sofisticada; *Trichoderma* spp., mediante la interacción con el sistema de raíz estimula los mecanismos de defensa que conducen a la acumulación de componentes, resultado de la activación de las vías de señalización de ácido jasmónico y etileno (ISR), por ejemplo la hidropéroxido liasa, peroxidasa y fenilalanina amonio liasa que inducen la lignificación (Benítez *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2011). Esta estimulación se debe a que *Trichoderma* libera moléculas, como hidrofobinas, ceratoplataninas, swolleninas, celulasas, entre otras; que la planta reconoce activando su sistema inmune, sin embargo, está claro que *Trichoderma* puede superar estas barreras y formar una asociación benéfica con la planta. Como se mencionó anteriormente *Trichoderma* puede influir en las vías de señalización de las hormonas vegetales involucradas en la respuesta a estrés abiótico; se sabe que puede modular las vías de respuesta del sistema de defensa de las plantas tanto en ISR regulada por JA (ácido jasmónico) y ET (etileno) y en la vía SAR (resistencia sistémica adquirida) regulada por SA (ácido salicílico), principalmente por medio de MAMP y efectores.

Por ejemplo, la aplicación de una celulasa de *T. viride* en cultivos de células de vid (*Vitis vinifera*) resultó en la inducción de la respuesta hipersensible (HR) y síntesis de fitoalexinas (Calderón *et al.*, 1994). También Brotman en el 2008, demostró que la inoculación con un péptido sintético del dominio de unión a celulosa de la swollenina indujo resistencia sistémica frente a la infección de *Botrytis cinerea*.

Otro ejemplo es el que puede desencadenar un rápido aumento en la expresión de los factores de transcripción de proteínas WRKYs, que activan las respuestas de la vía del ácido jasmónico (JA). Algunas vías que la planta puede activar para mantener estables las condiciones intracelulares en presencia de factores de estrés ambiental, es incrementar su potencial osmótico a través de la acumulación de osmolitos intracelulares como la prolina, glicina, betaína, manitol y trehalosa (Zhu, 2002; Wang *et al.*, 2007).

Trichoderma libera varios componentes en la rizósfera como: xilanasas, peptaiboles, ceratoplataninas, swolleninas, fitohormonas, enzimas, entre otras que van a interactuar con la planta y que activar sus defensas contra estrés biótico y abiótico (Druzhinina *et al.*, 2011).

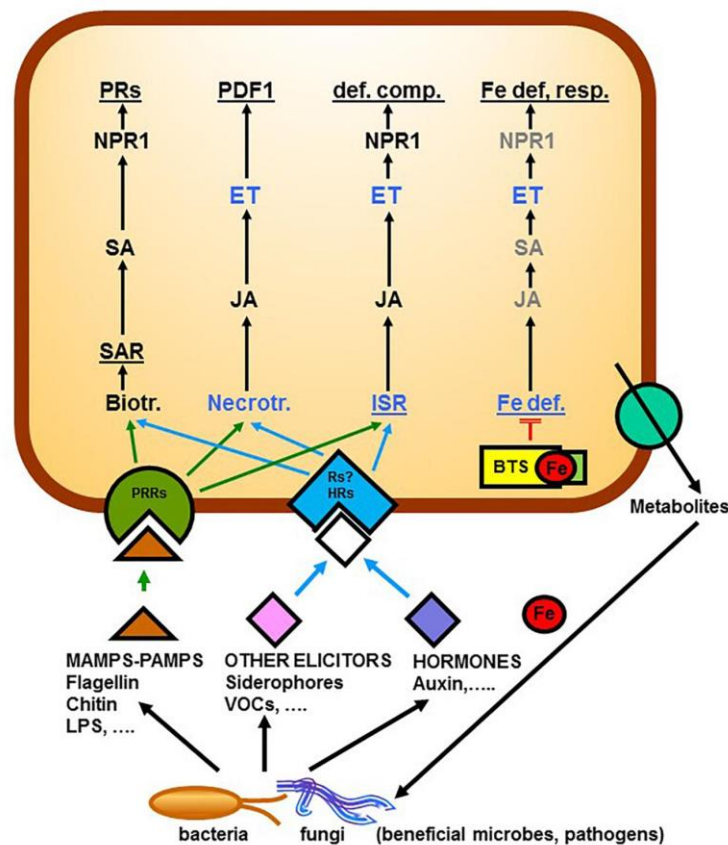


Figura 10: Representación de la interacción de microorganismo incluido *Trichoderma* con plantas, así como de las vías de respuesta a estrés biótico y abiótico (Modificado de Romera y colaboradores, 2019).

Por otro lado, las plantas también poseen un sistema de inmunoreceptores intracelulares conocidos como proteínas de resistencia (R) que pueden reconocer la presencia de moléculas tipo efectoras de patógenos. No obstante, se ha propuesto que las proteínas R no interactúan directamente con estas moléculas, sino que se unen y protegen las proteínas de defensa dirigidas a los patógenos (Como quitinasas, endoglucanasas, etc.). Sin embargo, su activación se desencadena cuando estas proteínas son perturbadas o modificadas por los efectores patógenos (Spoel y Dong, 2012).

Agente de biocontrol

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros. Las especies de *Trichoderma* actúan como microorganismos microparasitarios competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a las que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular. La interacción del patógeno con *Trichoderma* ocurre a través de un contacto directo que involucra eventos secuenciales de reconocimiento, ataque, penetración y finalmente la muerte del huésped (Druzhinina, 2011).

Las enzimas que hidrolizan la pared celular del hongo huésped son principalmente quitinasas (1,4- β -acetilglucosaminidasa, endoquitinasas y exoquitinasas), glucanasas (β -1,3-glucanasa) y proteasas, las que finalmente liberan oligómeros de la pared celular del patógeno (Druzhinina, 2011; Vinale *et al.*, 2008).

El micoparasitismo conlleva cambios morfológicos que implican enrollamiento y la formación de estructuras similares a un apresorio, que sirven para penetrar en

el huésped y contienen altas concentraciones de solutos osmóticos como el glicerol (ver figura 11).

Una vez que *Trichoderma* se une, se enrolla alrededor del patógeno y forma el apresorio. El siguiente paso consiste en la producción de enzimas que degradan la pared celular y peptabioles que facilitan la entrada de las hifas de *Trichoderma* en el hongo parasitado (Benitez *et al.*, 2004).

En la figura 8 se representa el proceso de micoparasitismo de *Trichoderma* sobre un hongo fitopatógeno, *Trichoderma* secreta enzimas principalmente proteasas o quitinasas, que causan daño a la pared celular del fitopatógeno, liberándose moléculas pequeñas y péptidos los cuales son reconocidas por el receptor Gpr1 de *Trichoderma*, activando una cascada de señalización de proteínas G y MAP quinasa, el resultado es la producción de moléculas y metabolitos secundarios para la lisis de la pared celular (Druzhinina *et al.*, 2011).

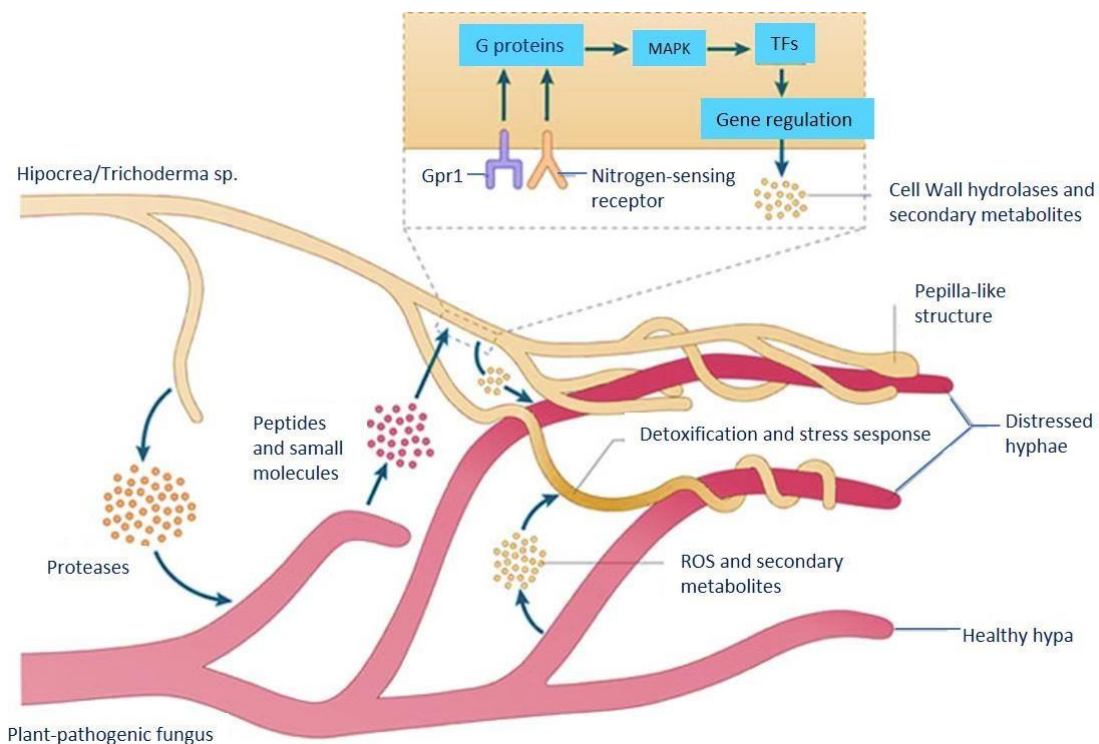


Figura 11: Proceso de micoparasitismo de *Trichoderma* frente a un fitopatógeno (Tomado de Druzhinina, 2011)

Para que *Trichoderma* pueda penetrar a su “presa” el hongo hospedero primero tiene que interactuar y romper la pared celular del hongo, estructural y funcionalmente es indispensable para que el hongo hospedador funcione correctamente, un daño a nivel estructural de la pared celular conlleva a daños graves y permite la infección de *Trichoderma*. La pared celular de hongos es altamente compleja, contiene moléculas muy estables, como los polisacáridos de quitina y glucano (ver figura 12). Por una parte los glucanos representan el polímero estructural más importante en los hongos, están compuestos de unidades de glucosa con uniones β -1,3, aunque también podemos encontrarlos en uniones β -1,6 y β -1,4. Mientras que la quitina es un polímero lineal de monómeros de N-acetilglucosamina unidas entre sí por enlaces β -1,4 (Feijóo-Vivas *et al*, 2021). Estos dos principales compuestos junto con los demás componentes como glicoproteínas, entre otras, hacen de la pared celular de los hongos una barrera casi impenetrable para hongos micoparasitarios.

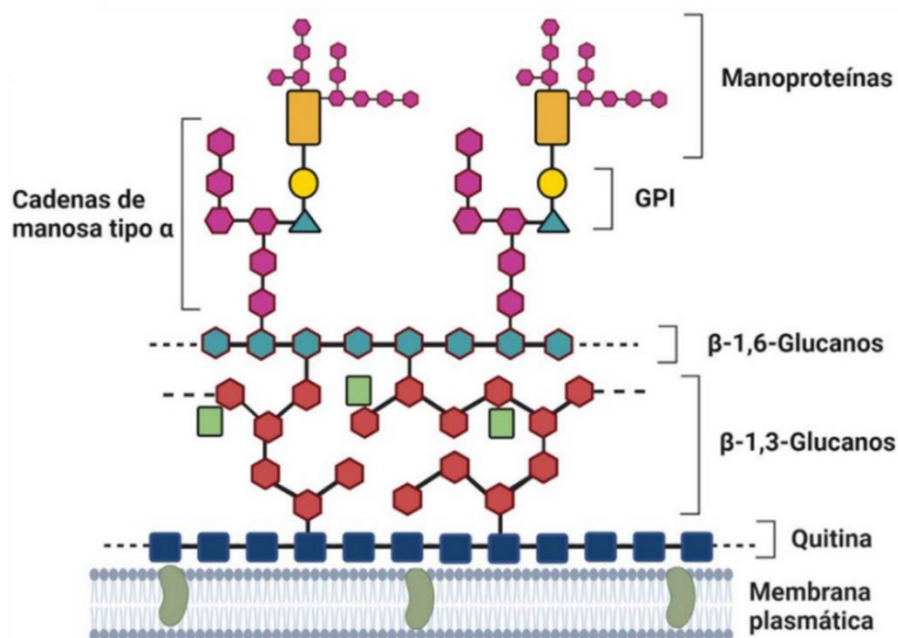


Figura 12: Representación esquemática de la composición química de la pared celular fúngica, **GPI** (glicosilfosfatidilinositol). Tomado de Feijóo-Vivas *et al*, 2021.

Como mencionamos anteriormente *Trichoderma* es un hongo que se ha estudiado y utilizado ampliamente como agente de control biológico, y es que

estos hongos, han evolucionado y utilizan diversos mecanismos para poder invadir y penetrar al hongo huésped, a pesar de la complejidad de la pared celular fúngica, *Trichoderma* utiliza diversas moléculas como las proteínas líticas que se mencionaron anteriormente y adicional a esto también se ha reportado la capacidad de utilizar a la swollenina una proteína no lítica (Atriztan-Hernandez, 2013).

Estas proteínas con actividad tipo expansina, que en el capítulo anterior nos referimos a ella como MAMP y que están involucrada en el proceso de colonización, pudieran también estar involucrada en los procesos de micoparasitismo. En el caso particular de la swollenina, adicional a lo que encontró Saloheimo en el 2002, donde reportó que la swollenina tiene afinidad y relaja las fibras de celulosa, en el 2011 Reithner y colaboradores, identificaron genes relacionados con el micoparasitismo de *Trichoderma atroviride* frente a diferentes fitopatógenos: *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Botritis cinérea*. Donde se encontró que la swollenina es una de las principales proteínas que se expresan antes del contacto con el hongo huésped. Además, Atriztan-Hernandez demostró que cepas de *T. atroviride* que sobre expresan a la swollenina, tienen una mayor capacidad micoparasitaria comparado con la cepa silvestre.

Aunque no hay muchos trabajos que evidencien su participación en el micoparasitismo, con las evidencias expuestas se cree que estas proteínas no líticas tiene afinidad por la quitina, y su función es similar a lo que hacen con la celulosa, aflojar o relajar la pared celular para que otras proteína puedan interactuar más fácilmente, y es que en el 2010 Chen y colaboradores demostraron la capacidad de la swollenina para unirse a diferentes sustratos, mostrando afinidad por la quitina. Por otro lado en el 2014 Bacelli y colaboradores de igual manera evidenciaron la capacidad de esta proteína para unirse fuertemente a la quitina.

El cultivo de chile en México

El género *Capsicum* incluye 33 especies y 10 variedades siendo la especie *Capsicum annuum* la de mayor importancia (Castellón Martínez, 2014).

Capsicum annuum, la más importante entre las especies de los chiles cultivados, con origen, domesticación y diversificación en México, se dispersó a través del mundo en la época colonial, y se ha convertido en uno de los saborizantes más importantes en la cocina mundial (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

Su uso en la cocina se debe principalmente a que sus frutos se consumen tanto frescos como secos para proporcionar color, sabor y aroma a infinidad de platillos, lo que lo sitúa entre las principales especias.

El chile es usado principalmente en la condimentación de alimentos, un ejemplo claro es el gran uso que tiene en el continente Asiático, México de igual manera incluye en gran variedades de comida el ingrediente del chile, además de su sabor característico otros usos que se le atribuyen es el uso medicinal, algunos datos que demuestran su uso en la medicina es por ejemplo, cuando la vitamina C se detectó en el páprika (chile en Hungría), así como sus efectos anti escorbúticos; estudios que hicieron merecedor del Premio Nobel en Fisiología IV o Medicina al médico húngaro Albert Szent-Györgyi en 1937 (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

En México, el chile es uno de los cultivos agrícolas más importantes. Anualmente, se producen 1.9 millones de toneladas, y de éstas alrededor de 700 mil toneladas se destinan al comercio exterior (SIAP, 2010). Las entidades de mayor producción son: Sinaloa, Chihuahua, Guanajuato, Sonora y Zacatecas, siendo este último el líder en la producción de chile seco (*C. annuum* L.) variedad guajillo, aportando el 35 % del valor total generado en el sector agrícola (Galindo y Cabañas, 2006).

El chile guajillo está entre los cuatro tipos de chile más importantes en el país en cuanto al volumen de producción. Los chiles Guajillos también reciben el nombre de Mirasol y Guajon, presentan frutos delgados de 2.0 a 3.5 cm de ancho y un tamaño de 9 a 14 cm. Su cultivo se realiza bajo condiciones de riego en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Michoacán, Aguascalientes y

Guanajuato. Generalmente los frutos se cosechan cuando están completamente secos. Sin embargo, cuando existe un buen precio en el mercado, la cosecha de chile maduro se realiza en fresco para ser secado artificialmente en deshidratadoras (SIAP, 2010).

Problemática en el cultivo de chile

Como se mencionó anteriormente, el cultivo de chile en México tiene un valor cultural y monetario. Sin embargo, los productores se enfrentan a al crecimiento en la demanda del producto y por otro lado la disminución en su producción por diferentes factores bióticos: como plagas y enfermedades causadas por insectos, virus, hongos, nematodos; y por factores abióticos, como la disminución de temperatura, hipersalinidad de los suelos, escasez de agua, entre otros. Todo esto conlleva al uso inadecuado de productos de origen químico que alteran la flora y fauna del ambiente.

Entre los hongos fitopatógenos con mayor repercusión en los cultivos en México se encuentran *Fusarium* spp, *Phytophthora capsici*, *Verticillium* spp, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp. Estos hongos en conjunto o de manera individual principalmente causan la marchitez del chile, el cual es una de las principales enfermedades que causan pérdidas en la producción cerca del 26% a 90% (Pérez-Acevedo *et al*, 2017). A continuación se describen algunos de los hongos que afectan el cultivo de chile.

Phytophthora capsici

Phytophthora capsici es un fitopatógeno de muchos cultivos de interés como la calabaza, el pepino, sandía, jitomate y chile. En México se encontró por primera vez en 1952 en la universidad Autónoma Chapingo, en el Estado de México, y es el responsable de la marchitez en cultivos de chile (INIFAP, 2008).

Este fitopatógeno pertenece a la clase Oomycetes, el cuál es confundido con hongos, no que pertenece al reino fungí sino al Chromista, su desarrollo óptimo oscila en temperaturas del suelo entre 15 y 23 °C (Martínez-Pacheco, 2015).

El oomiceto *Phytophthora* principalmente se mantiene en las raíces infectadas o en el suelo bajo distintos estadios: por ejemplo, como forma de oosporas, esporangios, clamidosporas o de micelio. Los síntomas que presenta una planta infectada por *P. capsici* son la marchitez leve que en un lapso de 3 a 4 días se marchita completamente, las plantas enfermas presentan una banda oscura que ciñe el tallo y cuello de esta, en las hojas y ramas presentan lesiones como tizones de color verde amarillento y de color café, la marchitez completa de la planta lo lleva a la muerte (INIFAP, 2008).

Rhizoctonia solani

La marchitez en las plantas de Chile también está asociada a hongos que pueden llevar a la muerte a la planta, un hongo conocido en causar grandes pérdidas a los productores es *Rhizoctonia solani*, que incluso puede atacar en asociación con *P. capsici* y *Fusarium spp.*, matando a la planta en 10 días.

La capacidad de infección de este hongo lo determinan las condiciones ambientales como la temperatura y humedad, considerándose uno de los fitopatógenos que causan mayor daño en el cultivo del Chile, además se ha reportado que puede infectar a un extenso grupo de plantas de diferentes especies de importancia económica (Gour, 2012).

Los principales síntomas que produce *R. solani* en plantas de Chile, son la pudrición de las partes superficiales y de tallos que están en contacto con el suelo, así como lesiones oscuras en raíces y semillas (González-García, 2008).

Factores abióticos

La producción de Chile también se ve afectada por factores abióticos, como temperaturas elevadas mayores a 32 °C y menores a 15 °C, suelos con pH ácidos, salinidad en los suelos de cultivo y sequía. Estos factores afectan diferentes estadios de la planta: su crecimiento general, el ciclo de floración, así como el fruto. Provocando un bajo rendimiento en la cosecha (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001).

Los factores climáticos, son fundamentales para el crecimiento y desarrollo adecuado del cultivo, cambios bruscos pueden determinar el éxito de una cosecha, las temperaturas por debajo o arriba de las óptimas retrasan el crecimiento de las plantas, interrumpen la floración, generan frutos amorfos y retrasan o disminuyen la producción, por ejemplo La temperatura óptima de crecimiento de las plantas de jitomate fluctúa de 20 a 30° C durante el día y de 12 a 17° C durante la noche, las temperaturas por debajo o arriba de las óptimas retrasan el crecimiento de las plantas, interrumpen la floración, generan frutos amorfos y retrasan o disminuyen la producción, es por esta razón que la producción se ve afectada en los meses correspondientes a otoño – invierno (López-Marín, 2016), en el cultivo de Chile también influye el cambio de temperatura, recordemos que el chile es una planta que tuvo su origen en regiones templadas, donde su temperatura óptima de crecimiento es de 25 – 30 °C, por lo que temperatura inferiores a 15 °C o mayores a 32 °C trae consecuencias en su desarrollo y producción, por ejemplo, la temperatura del aire también influye en la formación y viabilidad del polen; una temperatura arriba de 30 °C que se presente 15 días antes de la polinización ocasiona esterilidad del polen (Medina-García, 2017).

Por otro lado, también el estrés por sequía o por salinidad causa daños irreparables en la mayoría de los cultivos, afectando el rendimiento y la sostenibilidad de la agricultura, siendo el agua una fuente vital para las plantas, la ausencia o limitación de esta se ve reflejado en uno de los estreses más agresivos para la planta. El agua en las representa cerca del 90% de su peso y desempeña funciones vitales para la planta, en el cultivo de chile hay reportes que señalan que el rendimiento disminuye a medida el agua aprovechable se reduce, como respuesta de la planta disminuye la producción o puede llevar a la muerte (May-Lara *et al.*, 2011). Debido al cambio climático en donde apunta a cambios bruscos meteorológicos, los principales estados productores de chile buscan alternativas ante el pronóstico de sequía, principalmente optan por una producción bajo un sistema de riego, sin embargo los pequeños productores que no alcanzan este tipo de tecnología se ven afectados seriamente.

El estrés por déficit hídrico o por sequía se produce cuando las plantas están en un ambiente escaso en agua, este estrés no solamente está relacionado a la

falta de agua en el ambiente, sino que también está relacionado con las bajas o altas temperaturas y un exceso de sales (Hipersalinidad) en el suelo, estas condiciones provocan un déficit de agua en las células, provocando el estrés osmótico (Levitt 1980, Moreno 2009).

ANTECEDENTES

Trichoderma es uno de los principales microorganismos benéficos mayormente utilizados en la actualidad; en las últimas décadas se han investigado varias especies micoparasitarias de *Trichoderma*, por ejemplo, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. harzianum* y *T. asperellum*, con el fin de determinar las enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de hongos patógenos (Sharma *et al.*, 2020). Más recientemente, la interacción directa entre estas especies y algunas plantas también ha recibido mucha atención en la investigación. Se ha demostrado que algunas enzimas como celulasas, xilanasas, peroxidases etc. están involucradas en el diálogo cruzado entre plantas y *Trichoderma* spp. y en la inducción de respuestas de defensa vegetal (Hermosa *et al.*, 2012).

Algunas cepas de *Trichoderma* spp. secretan una proteína no catalítica llamada swollenina, a esta proteína se le atribuye la capacidad de desorganizar la región cristalina de la celulosa sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

La swollenina se caracterizó por primera vez en el hongo saprófito *T. reesei* (Saloheimo *et al.*, 2002) y se ha descrito en otras especies de *Trichoderma* y así como de *Aspergillus* y *Penicillium* (Chen *et al.*, 2010, Kang *et al.*, 2008).

Estructuralmente la swollenina contiene un dominio de unión a celulosa (CBD) N-terminal, enlazado a través de un dominio similar a expansina C-terminal (figura 13). La proteína descrita en *T. reesei* se denominó swollenina (swo1) y el gen *swo1* de “swollen” que significa hinchado” debido a su capacidad para hinchar las fibras de algodón probablemente debilitando los puentes de hidrógeno entre las fibras sin liberar azúcares reductores (Saloheimo *et al.*, 2002).

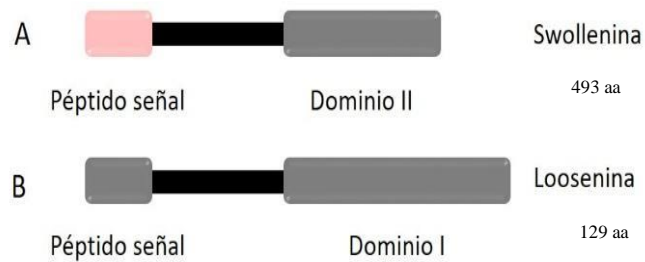


Figura 13: Estructura de las proteínas tipo expansina. A) swollenina B) Loosenina

Se ha sugerido que estas proteínas están involucradas en la remodelación de la pared celular, que es un proceso que *Trichoderma* tiene que enfrentar para colonizar el sistema de raíces de las plantas. Brotman *et al.*, en 2008, observaron que la sobreexpresión de swollenina en *T. asperellum* resultó en un aumento notable en la capacidad del hongo para colonizar las raíces del pepino y que el Módulo de Unión a Carbohidratos (CBM) de esta proteína por sí solo fue suficiente para estimular respuestas de la defensa local atribuyéndole el término de MAMP.

En 2011 Reithner *et al.*, a partir de análisis transcriptómico comparativo de *Trichoderma atroviride* IMI206040, identificaron genes relacionados con el micoparasitismo en *T. atroviride*, en el cual, se realizaron confrontaciones de *T. atroviride* con fitopatógenos y analizando los genes que se expresaban antes, durante y después del contacto de *T. atroviride* con el patógeno se encontró que un gen (*swo1*) con alta similitud a la swollenina de *T. reesei* registra altos niveles de expresión durante las etapas tempranas de confrontación (antes del contacto) con el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*.

En 2013, en el laboratorio de Biología molecular de hongos (LBMH), del Centro en investigación en biotecnología (CEIB), de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Atriztán-Hernández transformó una cepa de *T. atroviride* con el gen de la swollenina (*swo1*), para que fuera sobreexpresado y evaluar su capacidad micoparasitaria. Se demostró que la sobreexpresión de swollenina (*T.aSsw01*) incrementa la capacidad de parasitar a ciertos hongos

fitopatógenos comparado con la cepa silvestre, esto se atribuye a su capacidad de ser una proteína que interacciona y afloja la pared celular de hongos, aflojando la estructura de quitina haciéndola disponible para las enzimas de degradación (Atriztan-Hernández 2013). Además, Mehta R., durante su de tesis doctoral (2014), evaluó la colonización de plantas de chile (*Capsicum annum* L.) variedad guajillo con la cepa sobreexpresante de swollenina (*T.aSsw1-28*). Demostraron que en las plantas de chile inoculadas con la sobreexpresante (*T.aSsw1-28*) se vio que producían más biomasa, debido a una colonización más extensa de su sistema radicular. Por otra parte, también observaron una mayor resistencia al estrés por frío y calor en comparación de las plantas inoculadas con la cepa silvestre o no inoculadas, así como también una mayor resistencia contra la infección por *Rhizoctonia solani* (datos no publicados). Resultados similares obtuvo Martínez-Villamil (2017), en donde evaluó la colonización de *T. atroviride* sobreexpresante de swollenina (*T.aSsw1-28*) en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Sánchez-Cruz *et al.*, 2021).

JUSTIFICACIÓN

Como una alternativa biológica al uso de agentes químicos en la producción de cultivos de interés alimenticio y económico como el chile, se han implementado el uso de productos biológicos como pueden ser los microorganismos benéficos para las plantas. El género *Trichoderma* sp. alberga especies que se han utilizado como control biológico de algunos fitopatógenos, además de su efecto en la promoción de crecimiento en plantas y la protección que les brinda hacia ciertas enfermedades y diferentes tipos de estrés. Sin embargo, falta mucho por indagar en el proceso por el cual *Trichoderma* se asocia con la planta huésped, hay reportes de proteínas efectoras y proteínas de degradación de pared celular que están involucradas en la colonización de raíz, una de ellas es la swollenina una proteína tipo expansina remodeladora de pared celular, que actúa de igual manera en el proceso de micoparasitismo alterando la pared celular de algunos fitopatógenos. Se sabe que la sobreexpresión de *Swo1* incrementa el crecimiento y desarrollo de plantas de chile; sin embargo, se desconoce de manera específica si está involucrada en los primeros pasos de colonización de raíz de esta planta, por lo que es muy importante conocer el papel del gen *swo1* de *Trichoderma* en la colonización, desarrollo de la planta y la respuesta que brinda frente a fitopatógenos y diferentes tipos de estrés.

HIPÓTESIS

La proteína swollenina (Swo1) de *Trichoderma atroviride* está involucrada en el proceso de desestructuración de las paredes celulares de raíces de plantas de Chile y por lo tanto en su colonización, permitiendo una mejor inducción de respuesta a estrés biótico y abiótico que la cepa silvestre.

OBJETIVO GENERAL

Explorar el papel de la proteína swollenina de *Trichoderma atroviride* durante la colonización y respuesta a estrés de plantas de Chile mediante el uso de mutantes y sobreexpresantes del gen *swo1*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las diferentes cepas de *T. atroviride* sobreexpresantes y mutantes deletorias del gen *swo1* sobre los porcentajes de colonización de plantas de Chile.
- Determinar la capacidad de las diferentes cepas de *T. atroviride* sobreexpresantes y mutantes deletorias de la swollenina para aumentar la supervivencia a estrés abiótico.
- Determinar la capacidad de las cepas de *T. atroviride* sobreexpresantes y mutantes deletorias de la swollenina para inducir la producción de osmolitos en respuesta a estrés abiótico en plantas de Chile.
- Analizar la capacidad de las cepas *T. atroviride* sobreexpresantes y mutantes deletorias de la swollenina para inducir la expresión de genes relacionados con resistencia a estrés.

METODOLOGÍA

Material de trabajo

A continuación se muestra la cepas de *Trichoderma atroviride* que se utilizaron en este trabajo

Tabla 2: Cepas utilizadas en este trabajo

CEPAS DE TRABAJO		
Clave	Tipo	Organismo
WT	Tipo silvestre	<i>Trichoderma atroviride</i>
Ta.pUE10	WT con el Vector vacío insertado	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>Taswo1-10</i>	Sobreexpresante del gen <i>swo1</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>Taswo1-28</i>	Sobreexpresante del gen <i>swo1</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>Taswo1-6Δ</i>	Mutante del gen <i>swo1</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>
<i>Taswo1-8Δ</i>	Mutante del gen <i>swo1</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>

En la siguiente tabla se muestran los oligos utilizados en este proyecto

Tabla 3: Información de oligos utilizados en este trabajo.

OLIGOS UTILIZADOS		
Clave	Uso	Secuencia (5' – 3')
FE-fwd	qPCR-Factor de elongación de <i>C. annum</i>	TCCAACCCTTCTTGAGGCTC
FE-rvs	qPCR-Factor de elongación de <i>C. annum</i>	CTGTCCCTGTTGGTCGTGTA
J1-2R	qPCR-Defensina de <i>C. annum</i>	GCACACTCCATGCGTTTCTT
J1-2R	qPCR-Defensina de <i>C. annum</i>	CGCAAGTTCTTGCCTCAACA
PR2-Fw	qPCR – β Glucanasa de <i>C. annum</i>	GTTAGGTCGTTTCATTGATCCGATTA
PR2-Rv	qPCR – β Glucanasa de <i>C. annum</i>	AGTGAACCATCTTGTACCACCAC
SwoM-F	Verificar mutantes de <i>T. atroviride</i>	GTTAGGTCGTTTCATTGATCCGATTA
SwoM-R	Verificar mutantes de <i>T. atroviride</i>	AGTGAACCATCTTGTACCACCAC

Medios de cultivo utilizados

PDA (Agar papa dextrosa)

Composición gramos/litro – pH 5.6 ± 0.2

Extracto de papa 4 g

Dextrosa 20 g

Agar 15 g

PDB (Caldo papa dextrosa)

Composición gramos/litro – pH 5.6 ± 0.2

Extracto de papa 4 g

Dextrosa 20 g

Antibióticos

Higromicina B a una concentración de 100 µg/ml

Pases monospóricos

Se trabaja con 2 mutantes carentes del gen *swo1* (Mutante *Taswo1-6Δ*, Mutante *Taswo1-8Δ*), 2 cepas sobreexpresantes de *Swo1* (*Taswo1-28* y *Taswo1-10*), una cepa con el vector vacío (*Ta.pUE10*) y la cepa silvestre (WT). Todas las cepas se tomaron del laboratorio de biología molecular de hongos en colaboración con el Dr. Edgar Balcázar López. Las cepas se sembraron en medio PDA con higromicina 100 µg/ml, posteriormente se tomaron las esporas y se hicieron diluciones hasta 10^{-3} y se sembraron en PDA con higromicina 100 µg/ml y Tritón 0.5%, posteriormente se tomó una colonia transformante aislada y se repitió el proceso 3 veces. Este proceso asegura la homogeneidad de la población en cuanto a la integración del vector, sea para sobreexpresar o sea para deletar.

Desinfección y germinación de semillas de chile

Las semillas se desinfectaron, bajo condiciones de esterilidad. Inicialmente se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 3 min. Posteriormente se decantó y se lavó con agua destilada estéril, a continuación, se realizó un segundo lavado con etanol al 70 % por 4 min, después se lavaron con abundante agua destilada. Las semillas desinfectadas se colocaron en una charola con papel estroza con agua destilada estéril hasta cubrir las semillas completamente para su germinación

Inoculación de plántulas con las cepas de *Trichoderma atroviride*

Una vez que las semillas germinan, se trasplantaron a macetas con sustrato (Vermiculita – agrolita – peat moss, en una relación de 1-1-3 volúmenes), donde se inocularon con las cepas de trabajo en una concentración de 1×10^8 esporas por mililitro por planta. Se trabajaron con 3 lotes de 35 plantas, en donde cada lote contenía 5 plantas inoculadas con las mutantes (*Taswo1-6Δ* y *Taswo1-8Δ*), 5 plantas con las (*Taswo1-10* y *Taswo1-28*), 5 plantas inoculadas con la cepa

WT, 5 plantas inoculadas con la cepa con el vector vacío (*Ta.pUE10*) y 5 plantas sin inocular.

Análisis estadístico

Los datos de cada prueba fueron analizados con el paquete estadístico GraphPad Versión 6.1, bajo un diseño completamente al azar, por el método de TUKEY utilizando un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Tolerancia al estrés abiótico de las plantas de Chile

Para evaluar la tolerancia al estrés abiótico por sequía se utilizaron 3 lotes de 35 plantas y se inocularon con las cepas como se mencionó anteriormente y se utilizaron plantas no inoculadas como control. Después de una semana del trasplante, las plántulas fueron inoculadas con esporas de las diferentes cepas a una concentración de 1×10^8 esporas por ml, 15 días post inoculación se dejaron de regar por 13 días, y al día 13 se evaluó el porcentaje de supervivencia y se extrajeron los osmolitos de la parte aérea de la planta.

Cuantificación de osmolitos por HPLC

En el día 13 de estrés por sequía, se realizó la extracción de Trehalosa, manitol y eritritol, por el método Bligh y Dyer (1959). Las hojas, tallos y raíces de las plantas de los distintos tratamientos, se maceraron y suspendieron en 3680 μ l de solución Bligh y Dyer (compuesto de cloroformo-metanol-agua [10:5:3.4]) y se agitaron vigorosamente durante aproximadamente 30 min. Se añadieron 433 μ l de cloroformo y 433 μ l agua desmineralizada, y la suspensión se incubó durante 30 min con agitación. Las muestras se centrifugaron a 5500 g durante 10 minutos para la separación de fases. Los solutos se encontrarán en la fase superior metanol- agua y estos fueron transferidos a un tubo cónico de 15 ml donde se congelaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC (Kogej *et al.*, 2007),

Determinación de prolina

La extracción y determinación de prolina, se llevó a cabo por el método de Shabnam *et al* (2015). En el día 13 de sequía, se tomaron 500 mg de material vegetal de la parte superior de la planta (tallo y hojas), fueron macerados con 5 ml de ácido sulfosalicílico al 3%, posteriormente se centrifugó a 1300 rpm por 10 min, 500 µl del sobrenadante se mezcló con 1 ml de ninhidrina ácida al 1.25% y se incubó 30 min a 100 °C, después de la reacción con ninhidrina ácida se midió la absorbancia a 508 nm, los cálculos para determinar la concentración se obtuvieron con ayuda de una curva de calibración (0-30 µg/ml) utilizando L-prolina (Sigma).

Evaluación de la resistencia a infección por *Rhizoctonia solani*.

Para evaluar la resistencia a la infección por el hongo fitopatógeno se tomaron hojas del tercer nodo foliar. Posteriormente bajo condiciones de esterilidad, las hojas se colocaron por separado en cajas de Petri, sobre papel filtro húmedo y se inocularon, poniendo en el centro de cada hoja discos de agar micelial de 5 mm de diámetro de cultivos de 7 días de crecimiento en PDA del fitopatógeno *R. solani*. Después de la inoculación las cajas se colocaron en bolsas a temperatura ambiente, el desarrollo de la enfermedad se evaluará 3 días después de la inoculación.

Cuantificación de la expresión de genes marcadores de resistencia en plantas de chile inoculadas con las cepas de *T. atroviride* por q-PCR.

Para evaluar si la inoculación con las cepas de trabajo en plantas de chile interfería en la expresión de genes marcadores de la resistencia sistémica, se extrajo el ARN total de hojas de plantas se extrajo de acuerdo con Viterbo *et al.*, (2005) utilizando el método Trizol® según el fabricante (Invitrogen). El ARN se trató con la ADNasa libre de ARNasa y se limpió posteriormente utilizando columnas RNeasymini (Invitrogen). El ARN total (2 µg) se sometió a la síntesis de la hebra complementaria utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II

(Invitrogen) de acuerdo con el procedimiento del fabricante, utilizando oligo (dT) como cebador. Se utilizaron oligonucleótidos (ver tabla 3) correspondientes al Factor de elongación, defensina y proteínas PR2 (Glucanasa), respectivamente. Para el análisis de qPCR se utilizó el Fluoróforo al SYBR Green QIAGEN® y se siguió las instrucciones del fabricante, primeramente se hizo las estandarizaciones de los oligos: temperatura (± 2 °C TM) y concentración. A continuación se calculó la eficiencia de los oligos utilizando el valor de la pendiente cercano a 1, últimamente se procedió a realizar los análisis por triplicado.

RESULTADOS

Para comprobar el efecto de las diferentes cepas de *T. atroviride* (cepas sobreexpresantes, mutantes, con el vector vacío y la cepa silvestre) en la promoción del crecimiento en plantas de Chile, se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento (peso húmedo, peso seco, altura de planta y longitud de raíz) utilizando como control a plantas sin inocular (C-), las plantas fueron inoculadas con las diferentes cepas de *Trichoderma atroviride* bajo condiciones óptimas de crecimiento. Como se puede ver en la figura 14 el tamaño de las plantas tratadas con las cepas fue mayor comparado con las plantas sin inocular, además se puede apreciar un follaje más abundante y área de hoja de mayor tamaño, principalmente en las plantas tratadas con las cepas que sobreexpresan a la swollenina. Como se puede apreciar en la figura 15a el análisis estadístico arrojó una diferencia significativa entre las alturas de las plantas tratadas con *T. atroviride* que sobreexpresan la swollenina, repitiendo el efecto en las dos cepas sobreexpresoras, (figura 15), por otro lado, la longitud de raíz de igual manera mostró un mayor tamaño y peso en las plantas tratadas con las sobreexpresantes. También pudimos corroborar que al igual que en la altura, la longitud de raíz mostró una diferencia significativa en todos los tratamientos respecto a las plantas sin inocular; en cuanto al peso fresco y seco de las plantas, (Figuras 15 y 16), se observa que todas las plantas tratadas con las cepas de *T. atroviride* mostraron un mayor peso tanto fresco como seco, destacando significativamente las plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes. Es de destacar que las cepas mutantes en *swo1* se comportaron de manera muy similar a las plantas inoculadas con la cepa silvestre y la cepa con el vector vacío, por otro lado, las plantas sin inocular mostraron estos parámetros de manera significativamente inferior a todos los demás tratamientos.

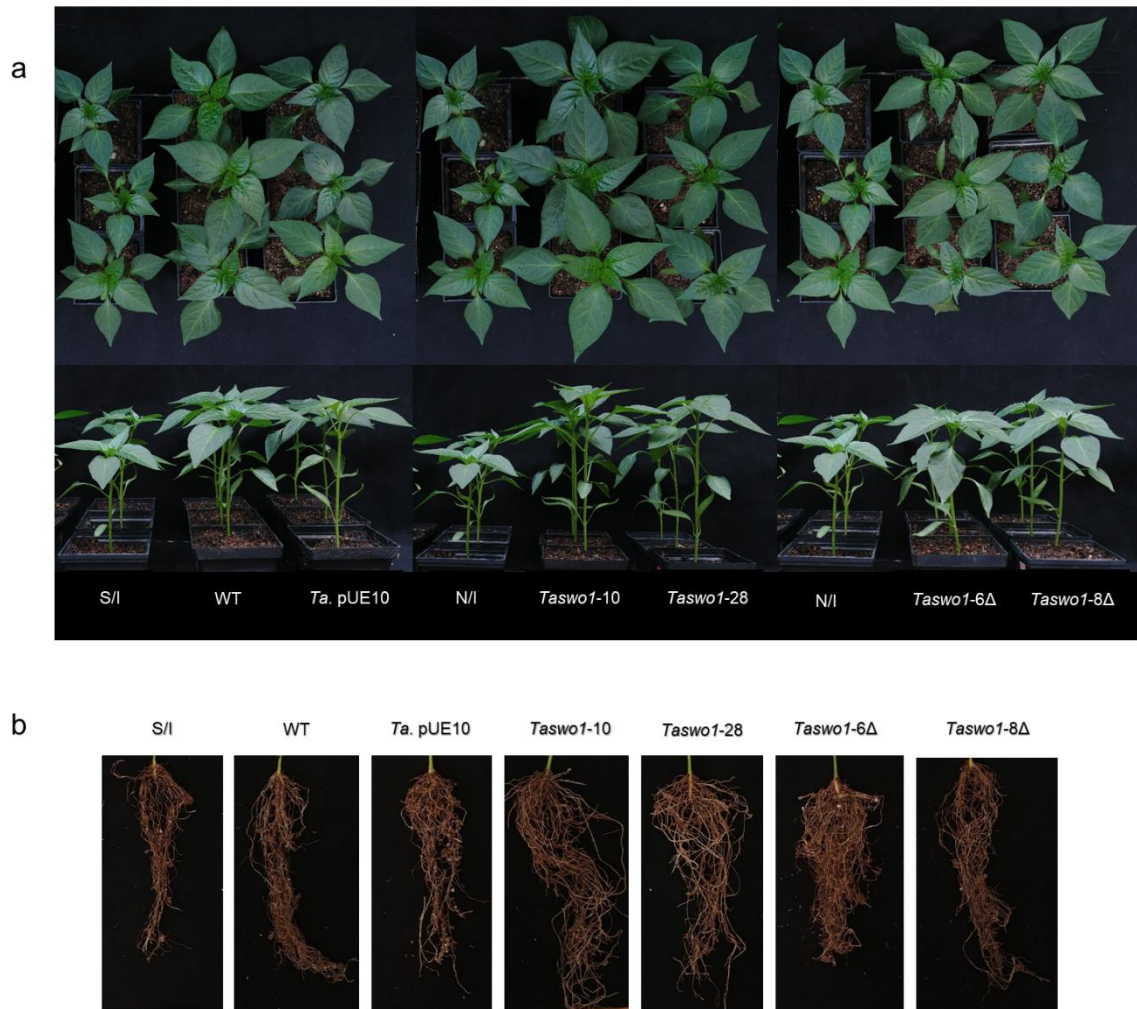
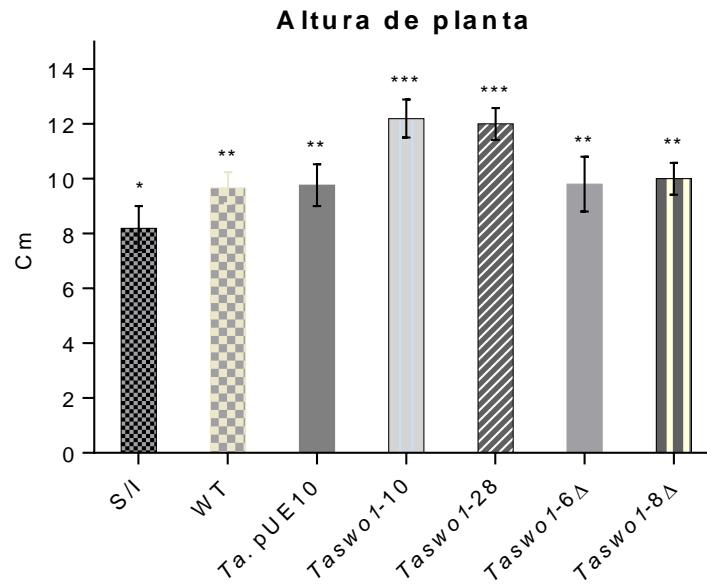


Figura 14: *Trichoderma atroviride* induce el crecimiento en plantas de chile a) Comparación de imágenes representativas de plantas no inoculadas (S/I) y plantas inoculadas con las cepas de *T. atroviride* en condiciones óptimas. Arriba, vista aérea; abajo, vista lateral. b) Comparación del sistema radicular entre los diferentes tratamientos.

a



b

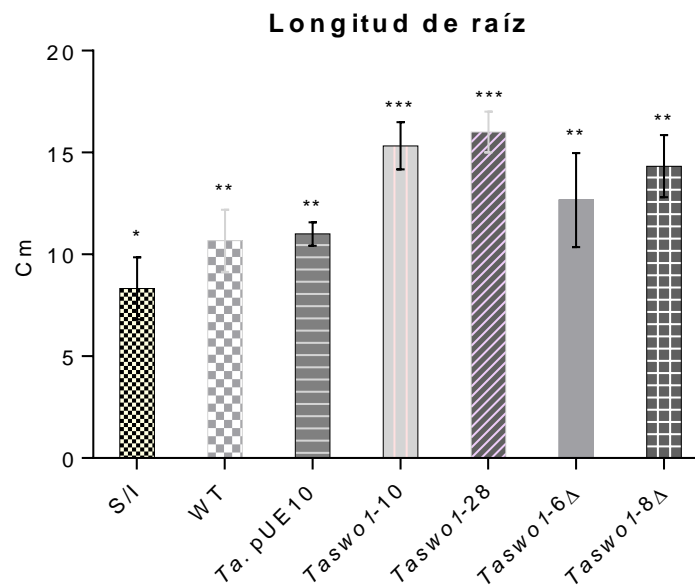


Figura 15: Las cepas sobreexpresantes incrementan la longitud de las plantas a) Medición de altura de planta y b) longitud de raíz de plantas inoculadas y no inoculadas con los diferentes tratamientos. Los “*” encima de las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

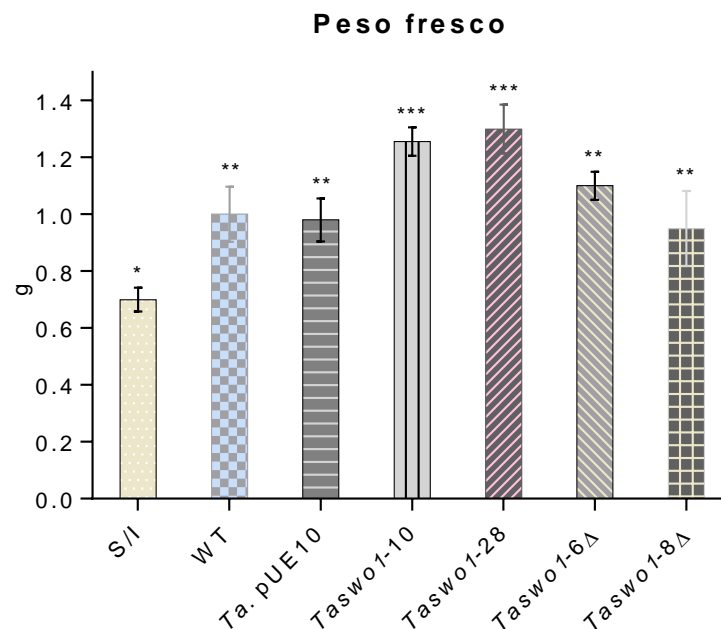
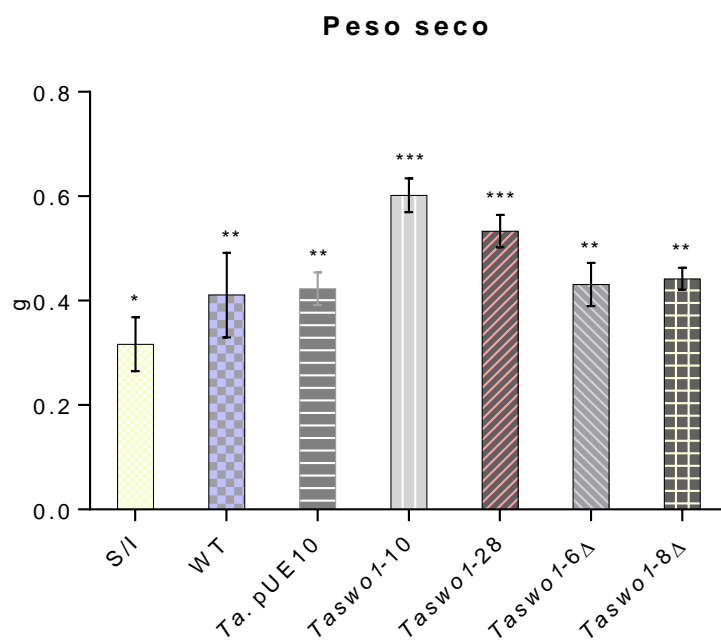
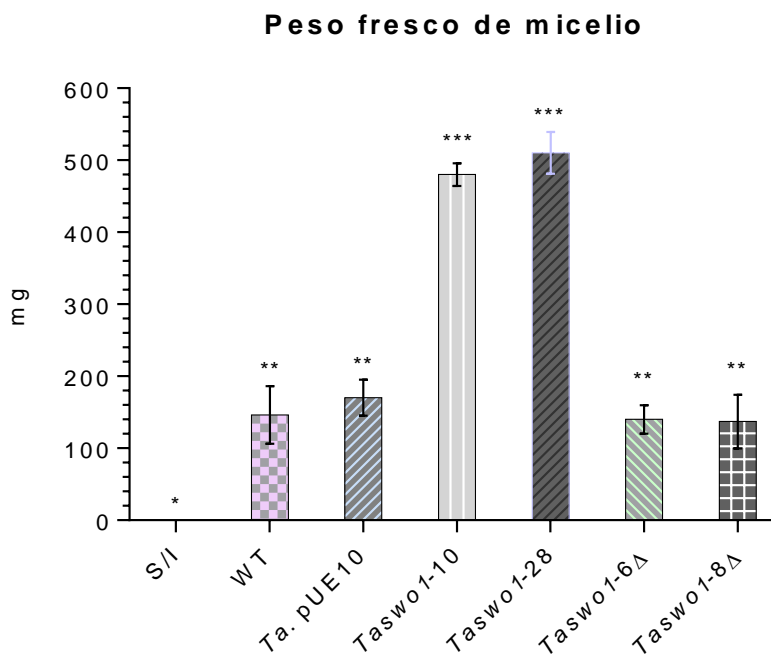
a**b**

Figura 16: Las cepas sobreexpresantes incrementan la biomasa de las plantas a) Medición del peso húmedo de la planta y b) peso seco de plantas inoculadas y no inoculadas con los diferentes tratamientos. Los “*” sobre las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Evaluación la capacidad de colonización

Por otro lado se decidió evaluar el efecto de las cepas sobreexpresantes y mutantes del gen *swo1* sobre la capacidad de colonización en las plantas, esto se corroboró indirectamente con el peso tanto fresco y seco del micelio aislado del interior de la raíz, cultivado en una caja Petri sobre celofán, como se puede ver en la figura 17, la colonización es mayor en aquellas plantas inoculadas con las cepas que sobreexpresan a la swollenina, mientras que la colonización por parte de las mutantes se comportó significativamente igual que la WT y la cepa del vector vacío, por lo que no se vio afectado su capacidad de colonización al tener ausente el gen de la swollenina.

a



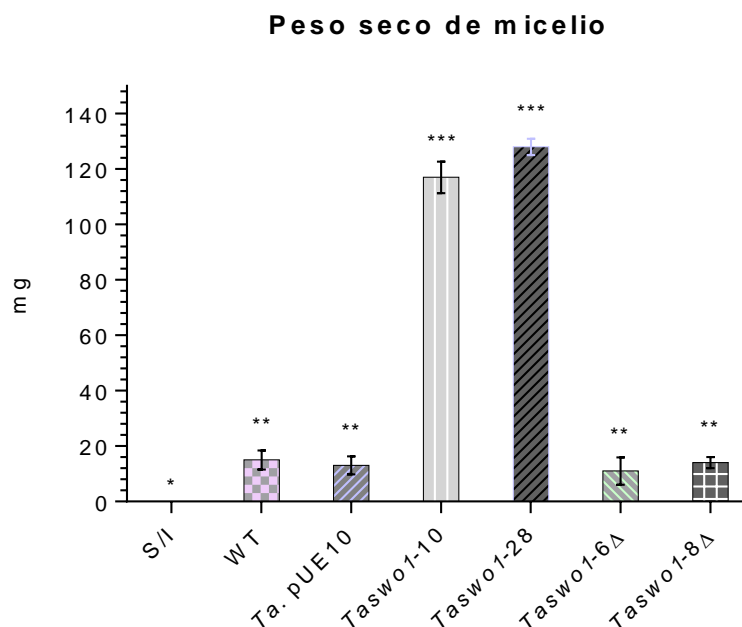
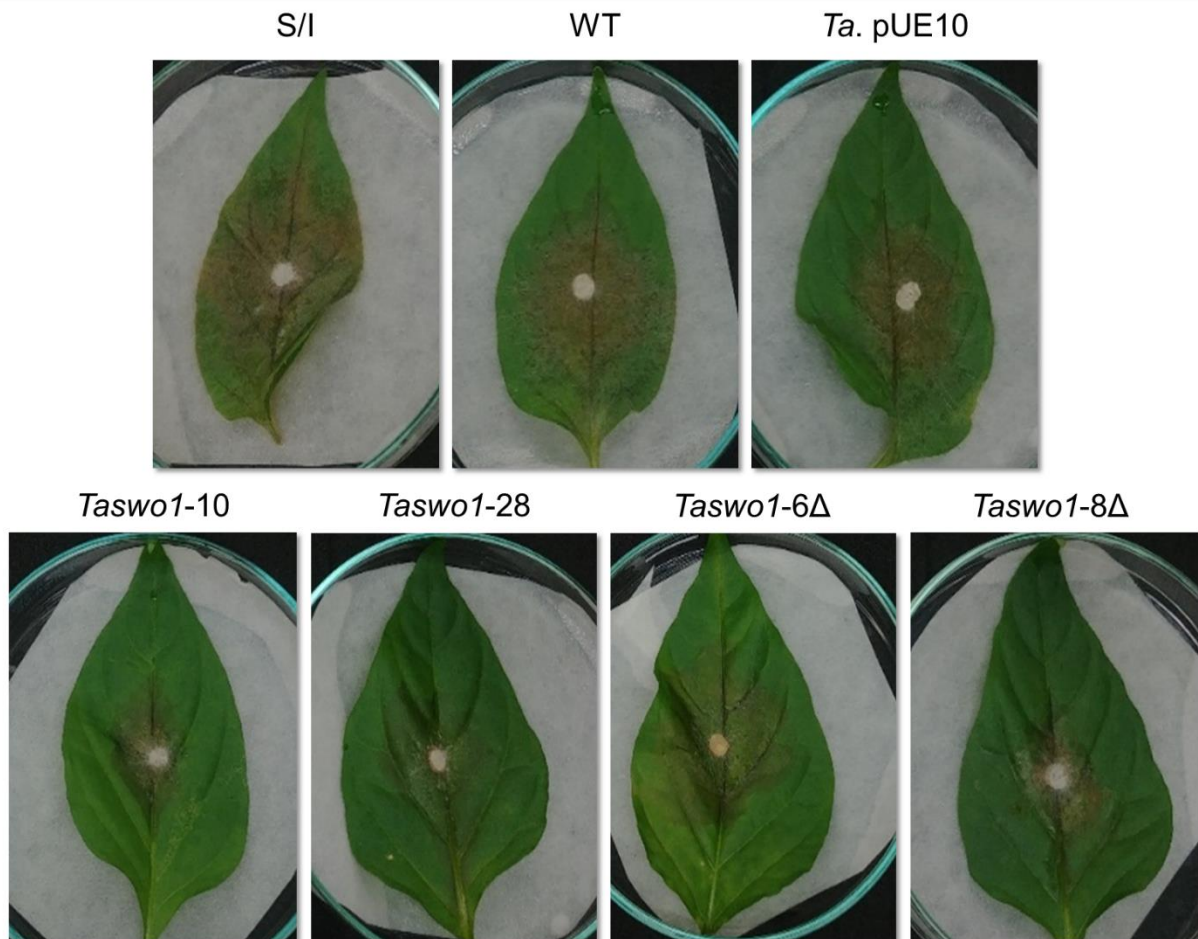
b

Figura 17: La sobreexpresión de la swollenina incrementa la colonización en plantas de Chile a) Comparación de los pesos frescos de micelio crecido en cajas petri b) comparación de pesos de micelio seco. Los “***” sobre de las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Evaluación de la respuesta a estrés biótico

De igual manera se evaluó la respuesta a estrés biótico (infección por *R. solani*) de plantas crecidas 30 días post inoculación y plantas no inoculadas, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Se tomaron hojas del tercer nodo foliar y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro húmedo, posteriormente se colocó un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo en sólido de *R. solani*, 3 días después de la infección se evaluó el área de daño (ver figura 18) con ayuda del programa ImageJ (Figura 19), los datos demostraron que la sobreexpresión de la swollenina influye en la resistencia a la infección por el fitopatógeno *R. solani* mostrando un porcentaje de daño bajo (13 %) comparado con las hojas de plantas no inoculadas donde el daño fue mayor (76.5 %); sin embargo, la inoculación con las cepas mutantes también mostraron un efecto positivo, reduciendo el porcentaje de daño hasta cerca del 20%. Esto podría deberse a

que se están expresando otras proteínas que pudieran activar el sistema de defensa de las plantas, por otro lado, la inhibición del crecimiento del patógeno en las plantas tratadas con la cepa WT y la *Ta.pUE10* (*T. atroviride* con el vector vacío) se comportan de manera similar; sufren menos daño que las plantas sin inocular, pero más que las plantas inoculadas con las sobreexpresantes o las



mutantes.

Figura 18: El uso de cepas de *T. atroviride* (cepas sobreexpresantes, mutantes, con el vector vacío y la cepa silvestre) reduce el daño causado por *R. solani* en hojas de plantas de Chile.

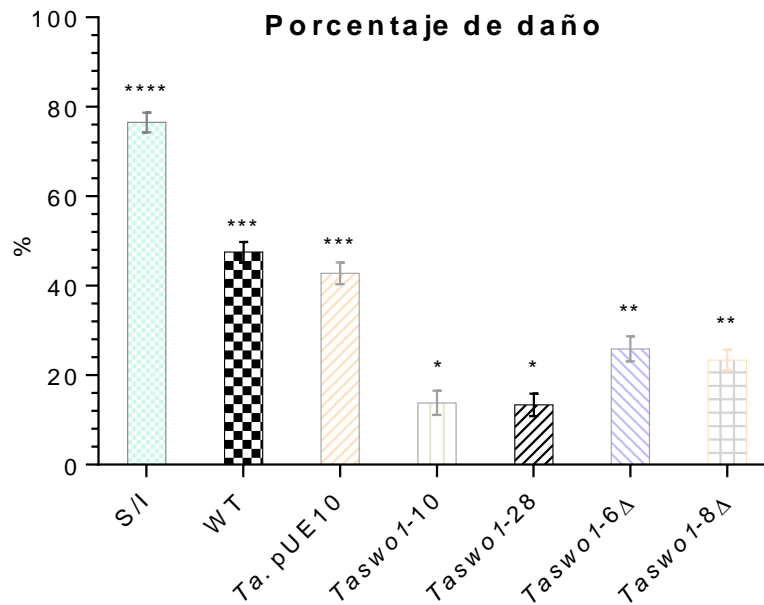


Figura 19: Las cepas sobreexpresantes reducen el daño causado por el hongo fitopatógeno *R. solani*. Los “*” sobre de las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Cuantificación de la expresión de genes de defensa

Para verificar y cuantificar si la expresión de genes relacionados con la resistencia sistémica, se induce en la planta al estar asociado a *T. atroviride*, se procedió a la cuantificación por qPCR de los genes *pr2* (glucanasa) y defensina (J1), utilizando el Factor de elongación como control, para ello se extrajo el RNA total de las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos (Ver figura 20).

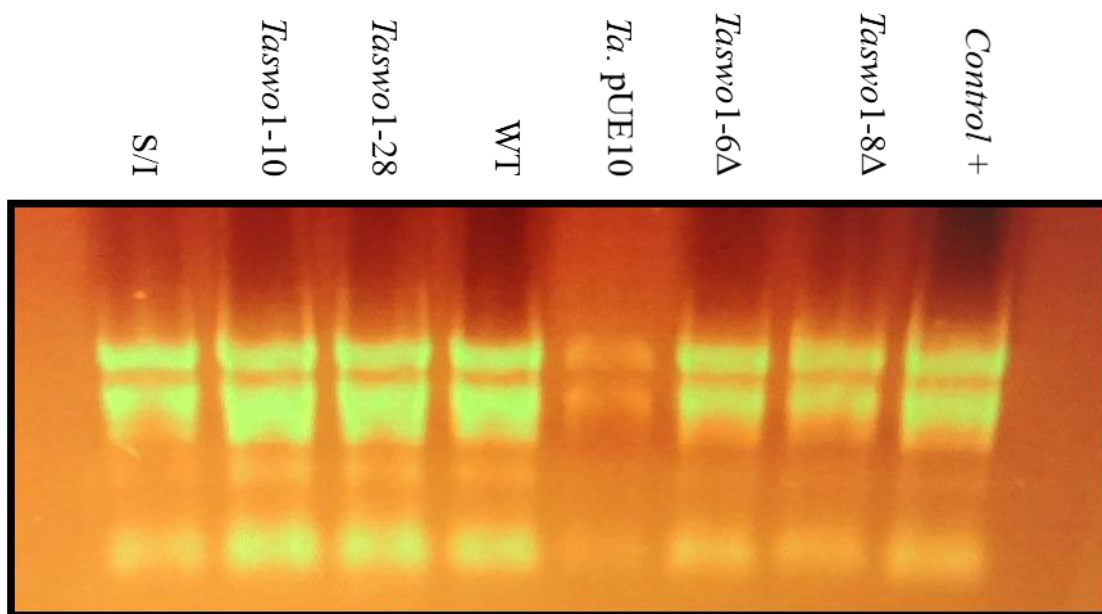
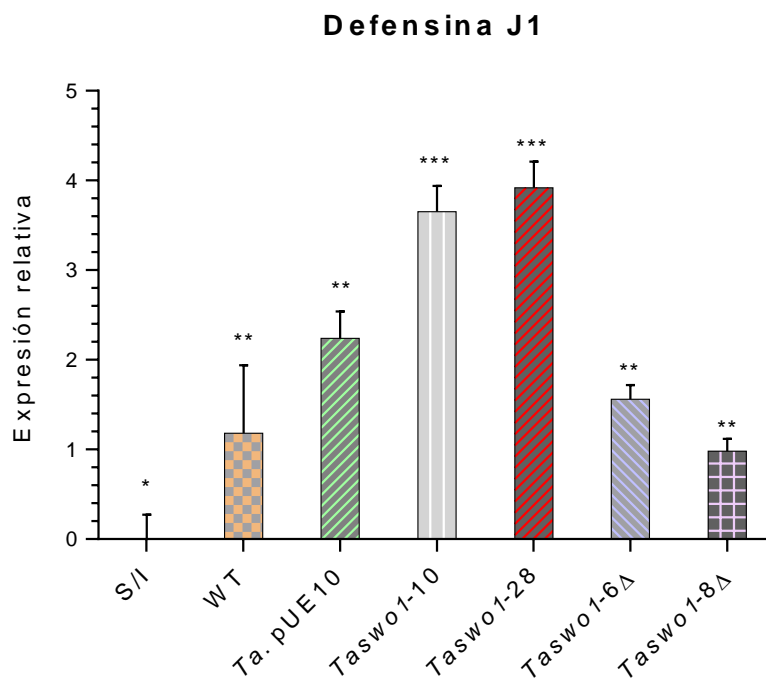


Figura 20: Integridad del ARN extraído de plantas. Imagen de un gel de agarosa al 3% del RNA total extraído de las hojas de plantas bajo diferentes tratamientos

Posteriormente para poder amplificar el gen utilizando los oligo diseñados se sometieron 2 μ g de RNA total a transcripción reversa con la transcriptasa reversa, como resultado de este experimento las plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes mostraron un incremento en la expresión de ambos genes, siendo las PR2 quienes tuvieron su mayor expresión, por el contrario, las otras plantas tratadas no mostraron diferencia significativa respecto al control sin inocular. De igual manera la defensina mostró un incremento en plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes, siendo significativamente mayor que los otros tratamientos

a



b

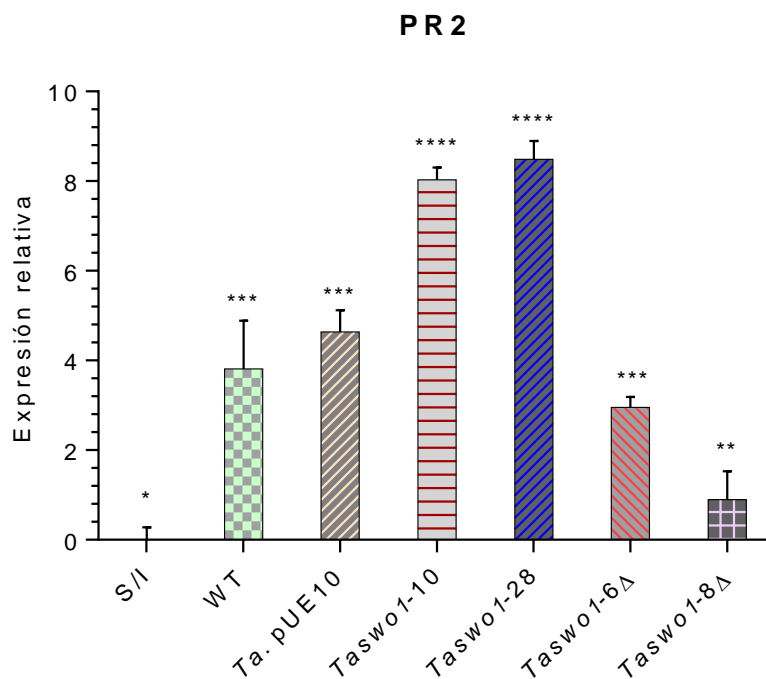


Figura 21: La inoculación con *Trichoderma* induce la expresión de genes relacionados con la defensa en plantas a) Defensina de planta de chile b) *pr2* (β -Glucanasa) de plantas de chile. Los “*” sobre de barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Estrés por sequía

Decidimos evaluar la capacidad de las plantas para resistir el estrés por sequía por 13 días, ya que en experimentos anteriores se comprobó que bajo las condiciones del invernadero, las plantas inoculadas con las cepas WT a partir del día 13 ya no presentaban una recuperación al ser regadas.

Las plantas fueron tratadas con cepas mutantes y sobreexpresoras de la swollenina, así como los controles incluyendo la cepa silvestre (WT), la cepa con el vector vacío (*Ta.pUE10*) y un control positivo donde la planta se regó normalmente. Como se puede apreciar en la figura 22, las plantas tratadas con las cepas que sobreexpresan la swollenina fueron las únicas que sobrevivieron al déficit de agua por 13 días, mientras el control positivo (planta sin inocular, regada normalmente) mostró un crecimiento normal. En la figura 23 se puede apreciar el proceso del desarrollo de las plantas sometidas a estrés por sequía, desde el día 1 las plantas tratadas con las sobreexpresantes mostraron un mayor tamaño comparado con los otros tratamientos, este efecto se mantuvo durante todo el tiempo de estrés por sequía.

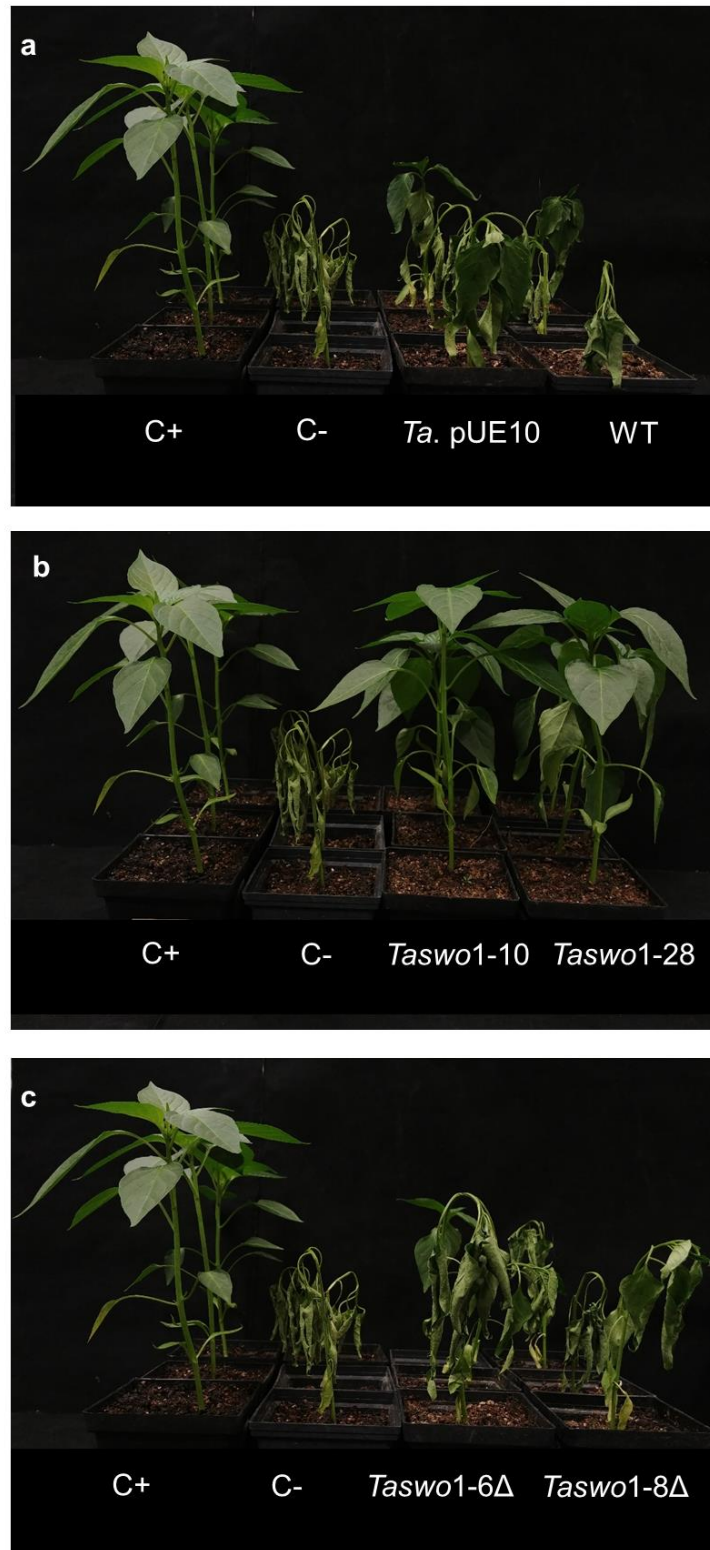


Figura 22: Plantas sometidas a estrés por sequía durante 13 días **a)** planta regada normalmente (C+), planta sin inocular (C-), y plantas inoculadas con las cepas sobreexpresantes *Taswo1-10* y *Taswo1-28*. **b)** Mismos controles C+ y C- comparados con plantas inoculadas con la cepa WT y con la cepa con el vector vacío *Ta.pUE10* **c)** Mismos controles C+ y C- comparados con plantas inoculadas con las cepas mutantes.

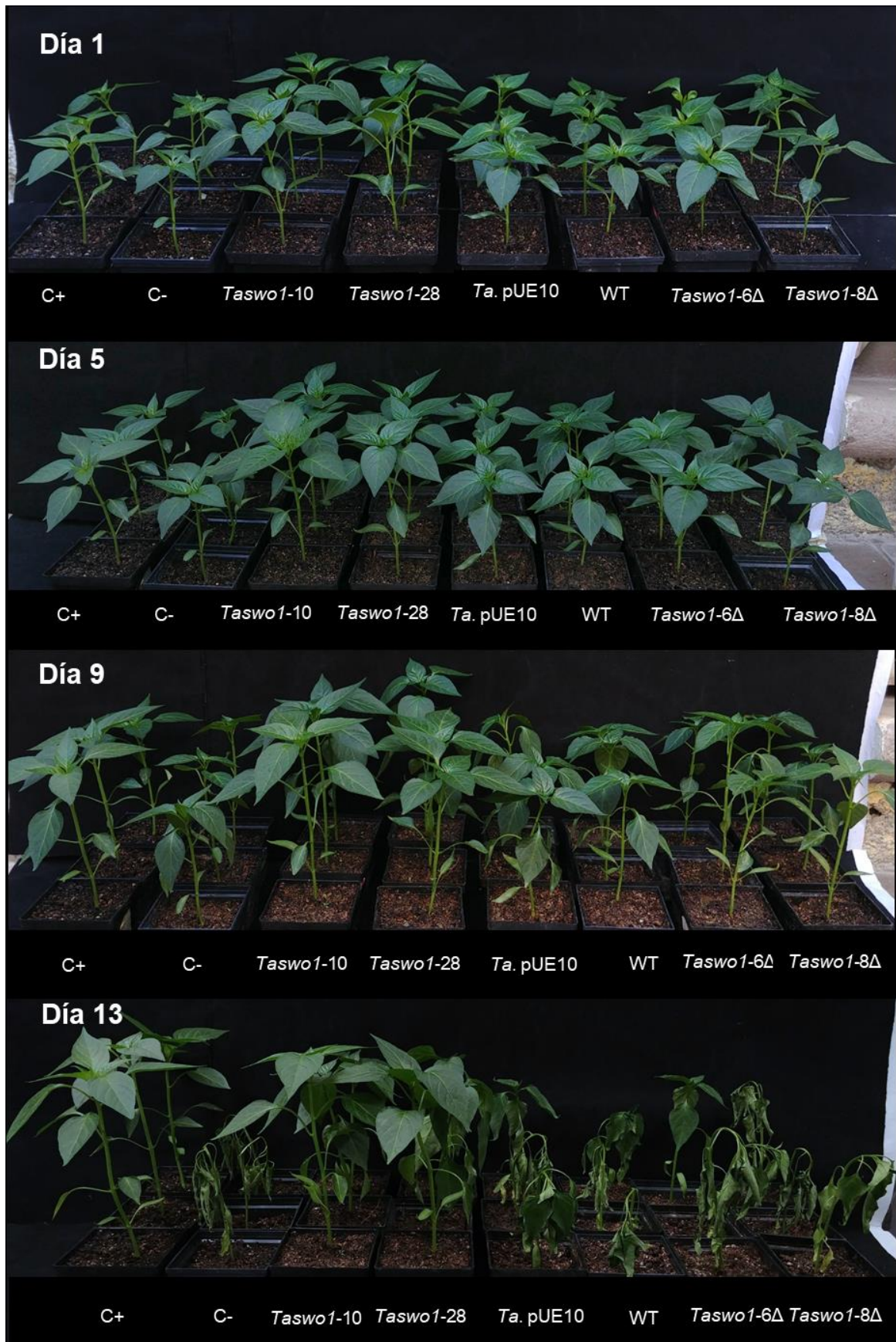


Figura 23: Las cepas sobreexpresantes inducen resistencia a sequía. Análisis temporal del estrés por sequía desde el día 1 al día 13 sin riego excepto el control positivo

Porcentaje de supervivencia

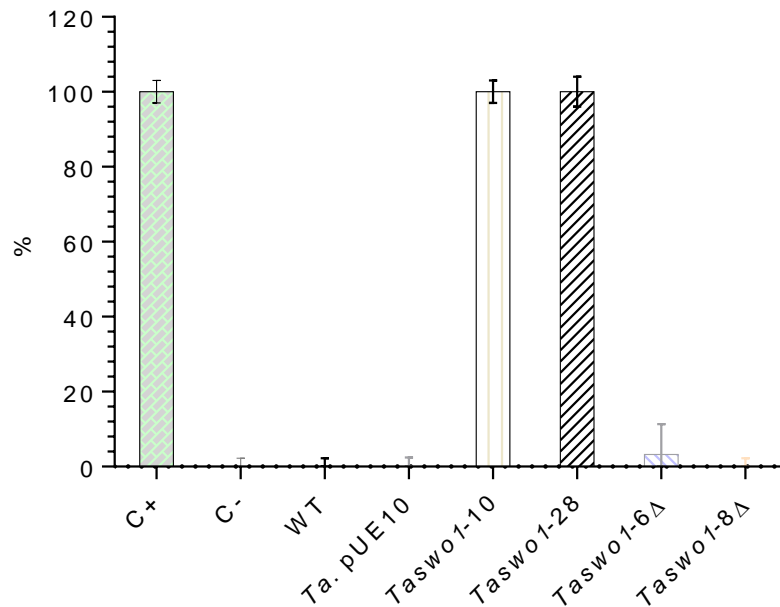
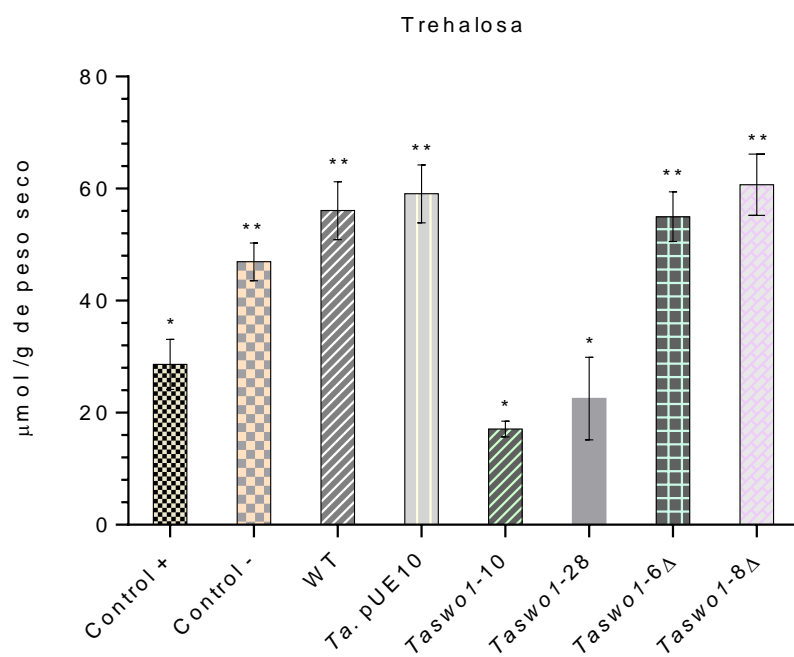


Figura 24: Las inoculación con cepas sobreexpresoras disminuyen la mortalidad durante el estrés por sequía

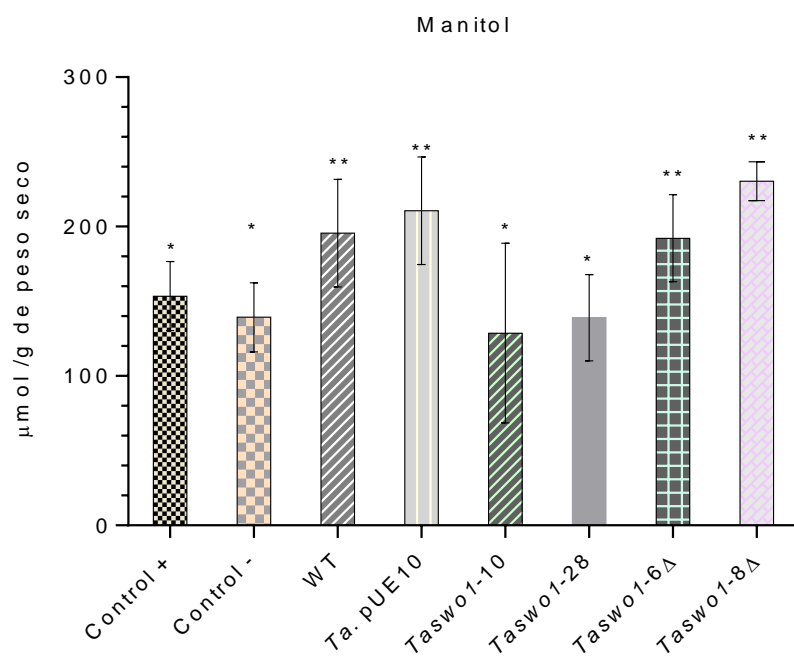
Cuantificación de osmoprotectores

Para evaluar si los osmolitos (trehalosa, manitol, eritritol y prolina) están involucrados en la protección de las plantas ante un estrés por sequía, se evaluó la capacidad de las diferentes cepas de *T. atroviride* para inducir la producción de estos, después de 13 días sin riego, se analizaron por HPLC las concentraciones de trehalosa, manitol y eritritol, osmolitos relacionados en respuesta a estrés; como se puede apreciar en la figura 25 las plantas inoculadas con las cepas sobreexpresantes (*Taswo1-10* y *Taswo1-28*) no mostraron un cambio significativo en cuanto a la concentración de los osmolitos evaluados, comparados con el control positivo; por el contrario se vio un aumento significativo en otros tratamientos respecto al control positivo (planta regada sin inóculo) y a las plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes en las concentraciones de trehalosa y manitol. En el caso del eritritol, no se observaron cambios significativos en ninguno de los tratamientos

a



b



c

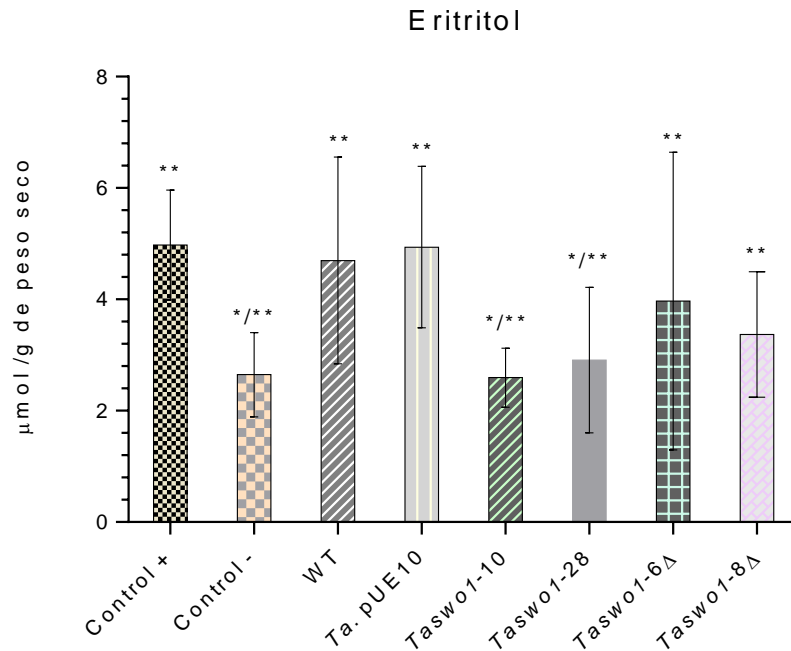


Figura 25: La inoculación de *T. atroviride* no incrementan la concentración de a) trehalosa b) Manitol c) Eritritol presentes en las plantas expuestas a estrés hídrico durante 13 días. Los “*” sobre las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Para determinar si el osmoprotector prolina está involucrado en la supervivencia de las plantas, éstas fueron procesadas de igual manera en el día 13 de estar expuestas a sequía, se extrajo la prolina presente en ellas, dando como resultado que las plantas inoculadas con las cepas sobreexpesantes indujeron una mayor concentración de prolina en las plantas, obteniendo valores significativamente diferentes comparado con los otros tratamientos (Figura 26), las cepas mutantes de la proteína swollenina también indujeron la producción de prolina; sin embargo esta fue menor y las plantas no sobrevivieron, cabe mencionar que los controles positivos y negativos mostraron una mínima concentración de prolina

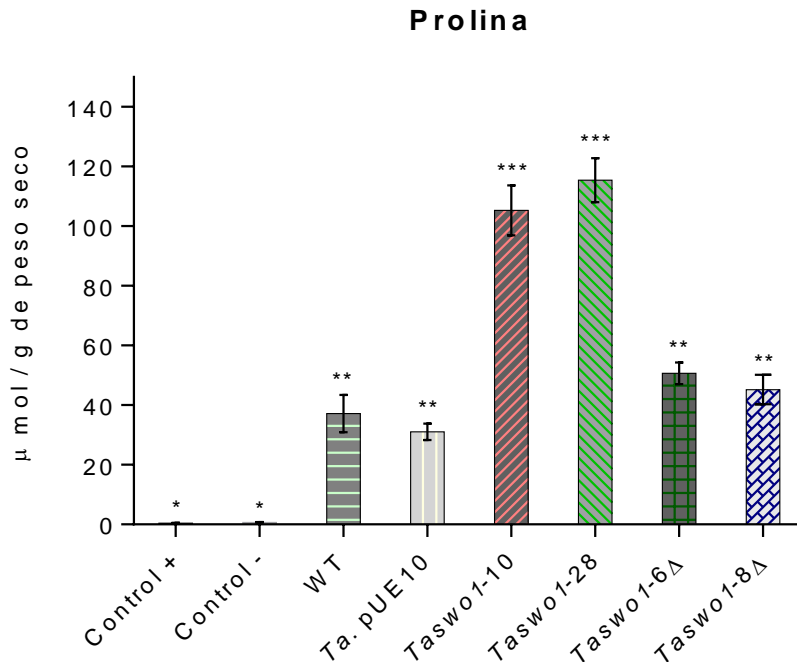


Figura 26: Las cepas sobreexpresoras incrementan significativamente la concentración de prolina presente en plantas después del estrés por sequía. Los “*” encima de las barras indican la diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos, ANOVA, $p \leq 0.05$ por prueba TUKEY.

Verificación de mutantes

Dado que los resultados obtenidos con respecto a protección de resistencia a hongos en donde las mutantes mostraron un porcentaje de protección en la planta, se procedió a verificar por PCR la eliminación completa del gen *swo1* en las estas (*Taswo1-6Δ* y *Taswo1-8Δ*) de *T. atroviride*, se diseñaron oligonucleótidos que flanqueaban la secuencia de dicho gen (figura 27), amplificando los fragmentos esperados. Como se puede ver en la figura 28, para la cepa WT se obtuvo una banda de 2005 pb, mientras que para las mutantes una banda de 1600 pb. Con esto se comprobó que efectivamente el gen de la swollenina estaba completamente deletado, descartando la posibilidad que la swollenina estuviera expresándose.

a

```

CTACTTGGCTTCTCCAACAAGAAAAATAATCGGGTGCCGTGTAACAACCTGCAAAGTTCTCATAGTAA
CGGCGAAATACTAAAGTTTTAGCTGAGGATAAATAAAGTAAAGTTAACTCGCAAATAAATAGTTTA
TGAGAGTTTTATTATCAAATGTGGAAAAAATAGCCGCTTTATCCACGGGCTCCAGATGCCCTCAA
TATCCATAGCAGCTATATCACTATAACCATTTAAACAACATTTTAGCCTTTAGACGGCCGGCAATGG
ATCCACGCTCGCACTCGAATATTAACCACCTGATATTTAATGGCTAAGCCCTCTTATCTTGCTCATT
TCACCTGTCTAAGCTCAATTTGCCACATTTGTTAGT
ATGTAATCGCTGCAATACAGAACTAGACCA
AATCTCTTGACAGGAGGCAACCGCTTACCCGACCCGTGAACCCCTGGTGAAGACTCAGCTAAATGACAA
CCCATATAGAAGTTCTTTTTCTCAGTGAAATGCAGCATCTAATGAATTTCTGAGTTTCAAGGACAT
GTAATATAGAGCAAAATGGAGCAAGCTGACAGCGGGAGGTTTTGCAATAGACATCTCTTACAAACAGCA
GGAAGTCAGATGTTGGTAAACTTAGCCTACTGGCACTAGCGGGCTTGTTCCTCAGTACAGCAG
AGCTGTGCGGCTTATAGTGAGTAAAGTCGAGGGTAGTAAAGAAAAACAAGAGTCAGTTCTTACTAACGG
AAAATCAGTGGCCAATGTGGAGGAAGTGGATGGTCCGGGGCGACGTGCTGCGTTTCTGGTCCCAAGTGA
GCGCGTTGAACAATACTATTCTCAATGCGTACCACTCAACTGTATGAGCTGTAGCTGTTTCTATGGAACT
ATTCTAACATCACGCAGGTAGCAGCGGCCCTACTGGATCATCGTCTCAACTACCTCGATCCCTCACTC
TCAATCATCTCTGCTAGCCACTCATCCGGTGGCCAGTCACTGTTGGCCAACTCAACCCGGCTGTCCAGG
TATACCACCAACCGATACCTCTACTGTGCTCTCCATTACAGTCTCTTACCCGAGTATTGCTCGCTGCA
GCTGCGGCGCATGGACCTGGTTGATAATGTGTGCTGCCATCATACTGTGCCACCGATGATACCTCGGA
GAGCTGTACTGTCAGTACTGCACTACACCACCTCTGCAATGCAAAATCCGGAAACAATGTATCCGGAA
GTCATACCCGTTAGCACAATGAGACTTGGCAATTACAGTGTGAGACCATTAAACCCAAATGCAAAATGGCT
TCGATATGCTGCTGACTTTTGGACCTGTGCTATTAGAGATCTACTCAATTCGGGTAAACCAGCGGGAG
CCTGTGGCTTCGGCTCTACGGTTTGTGCACAAAAGGCGAGTGCACGGCAAGCTGGACGGATCCAATGCT
TGGTACAACAATGTGATGCTTCTGTACAGCGTACCCTCTGCTCTGCAAAGATCCTGGGGAACTACTCTT
CGTGGAAATTTGGCGCACCAATGGAGATTATTACACGCAAGTAAAGTAAAGTCTGCGCAATCTATCTT
CTAGTGTGATCAITGTTCTAGTTCTGGCCCTCTGTCAGGGGATCTTGACAACTATCTTCTGTGGTGA
ATGATCGAACTTATCCAACGAAGCCGACCGCCAGCTACGCTGTAGGCAAGCTGGCTACACGGAT
CCAATCACCGTGGAGATTGTAGACAGCTGCCCTGACAGCGCAACTCAAGTGGTGTCTGTAAAGAACTT
ATTAGCGCATGCATGTAATAAGAACTTTCTGACCAATATATTACAGTGGCCCGCGCGCGATCACT
GTGGAGAGATCGACTTCAAATACGGCTGTCTCTCCCTGCGACAGCATGCACTTTGATCTCTGTGAT
TGCATGGGCGGATTACAGGGCAATGGTCTCTACCAATGGTGTGATTCACACAGTTATAGGAGAGTA
CAATGCCCAAGCTTGGTAAATGTTTATATATGGCTTCGAAATGGCGGGGTCCGTATTATTTCGCCCTCA
CAGCTGTCAAACCGCAATGGACCTGGTCTGTACAAAGATGTAGGTCAGAGGTGCAAGTTCAAGCACTT
GATCCCTCTGTACAGATCCCAACTACACCAAGTAGTCCGTCGCAAGAACGCTATGGTAGCTGGTGAT
CCAAGAGATCGGGGCTTCAACTTCGGGTGGGATGGTGGGCAGCCCGACAGGAGGCAAAATG
TCAACGAGCAAGCCATCAAACCTTCACTCCACCATCTACTGCAGATCCCACTCTACTACATTGACAT
TGGTGTACAGTTTAGTAAGAACTGACATATACAGCAAAGTAGGCTGTTCTGGTATTCTGTGCTCATGT
ACTACTCATCTTCAATCTGTAAGAAATAGTACTAGAAAGTCGGCGCTTTAGTTGTATCATATAAAGGAAC
GATACCGCGCTAGCAAATCGATTATGCCCTTTATGTATGCCATCTGTATACTCTTACAATTGAGATT

```

b

```

ATCCACGCTCGCACTCGAATATTAACCACCTGATATTTAATGGCTAAGCCCTCTTATCTTGCTCATT
TCACCTGTCTAAGCTCAATTTGCCACATTTGTTAGTATGTAAGTACTCGCTGCAAAATACAGAACTAGACCAAAATCTCTT
GACAGGAGGCAACCGCTTACCCGACATCGACGTTAACTGATTTGAAGGAGCATTTTTTGGGCTTGGCTGGAG
CTAGTGGAGGTCAACAAATGAATGCCATTTTTGGTTTAGTCTGTCAGGGGTTGAGCACAATAATTTGTGTCT
TTTGACAAGATGTTTATTTAGGCAACTGGTCAGATCAGCCCACTTGTAGCAGTAGCGGCGGCTCTCGA
AGTGTGACTCTTATTAGCAGACAGGAACGAGGACATTATTATCATCTGCTGCTTGGTGCACAGTAACTTG
GTGCGTTTGTCAAGCAAGGTAAGTGGACGACCCGCTCATACCTTCTTAAGTTGCGCCCTCTCTCTCTTAT
TTCAGATTCAATCTGACTTACCTAATCTACCCAAAGCATCCAAATGAAAAGCCTGAACTCAACCGGACCT
CTGTGAGAGATTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCAGAA
ATCTCGTCTTTGAGCTTGTAGTAGGAGGCGTGGATATGCTCTGCGGTAATAAGCTGCGCGATGGT
TCTACAAAGATGTTATGTTTATCGGCATTTGCATCGGCGCGCTCCGATTCGGAAGTGCTTGACA
TTGGGAGTTCACGAGAGCCTGAOCTATGCACTCCCGCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCT
GOCTGAAACCGAACTGCCGCTGTTCTCCAGCGGCTCGGAGGOCATGGATCGATCGCTGCGGCGAT
CTTAGCCAGACGAGCGGTTCCGCCOATTCGACCCGCAAGGAATCGTCAATACATACATGGCGTGAAT
TCATATGCGCGATTGCTGATCOCCATGTGTATCACTGGCAAATGTGATGGAAGCAACCGTCAAGTGGCTC
CGTCCGCGAGGCTCTGATGAGCTGATGCTTTGGGCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTOCTGCAT
GCGGATTTCCGGCTCAACAAATGTCCTGACGGACAATGGCCGATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGG
CGATGTTGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTCTCTGAGGCGGTGGTTGGCTGTATGGA
GCAGCAGACGCGCTACTTOGAGCGGAGCATCOGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGCTCOGGCGTATATG
CTCCGCAATTTGCTTACCAACTCTATCAGAGCTTGGTGAAGGCAATTTGATGATGACGCTTGGGCGC
AGGGTCGATGCGACGCAATGCTCCGATCCGGAGCCGGACTGTGCGGCTACACAATGCGCCGAGAG
CGCGGCGCTGCGACGATGGCTGTGTAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACGAGCGCCAGCACTCGT
CCGAGGGCAAAGGAATAGGCCTTTCAACTCCGGTCCACTTCTTTGACCAGCCCGACAGGAGCAAAATGTC
AACGAGCAAGCCATCAAACCTTCACTCCACCATCTACTGCAGATCCCACTCTACTACATTGACATTGGTGTACAG
TTTAGTAAGAACTGACATATACAGCAAAGTAGGCTGTTCTGGTATTCTGGTCAAGTACTACTCATCTCTCATCT
TGTAAAGATAGTACTAGAAAGTCGGCGCTTTAGTTGTATCATATAAAGGAAC

```

Figura 27: Secuencia del gen *swo1* (rojo) para ubicar el diseño de oligos. Oligos resaltados en color verde. a) Secuencia del gen de swollenina color rojo y con intrones en color negro b) Sustitución del gen de la swollenina (rojo) por el gen de la higromicina (azul).

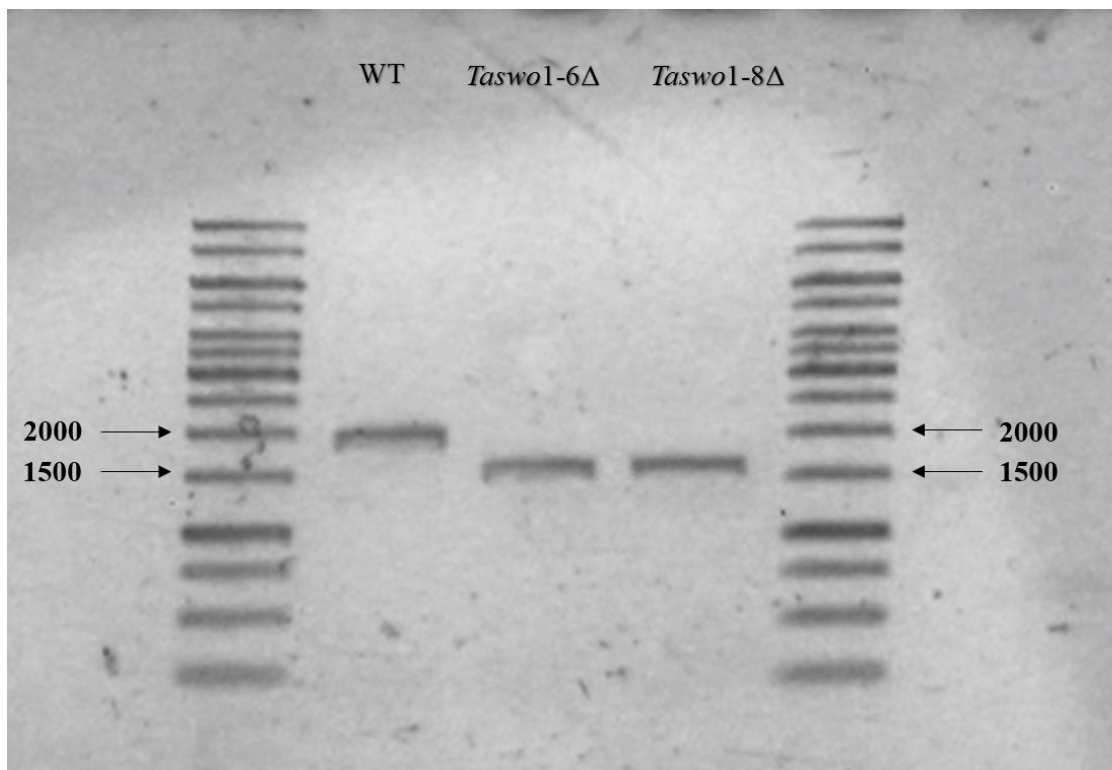


Figura 28: Amplificación de la región del gen *swo1*, en la cepa WT, *Taswo1-6Δ* y *Taswo1-8Δ*

DISCUSIÓN

***Trichoderma atroviride* sobreexpresando a Swo1, incrementa el crecimiento de las plantas de Chile vs la cepa silvestre**

El uso de *Trichoderma* como agente benéfico para las plantas ha sido comprobado ampliamente en los últimos años (Klein *et al.*, 1998; Jaklitsch, 2011; Hermosa *et al.*, 2012 y Schmoll *et al.*, 2016). En nuestro trabajo demostramos que las cepas de *Trichoderma atroviride* influyen positivamente en el desarrollo de las plantas de Chile. Se observó que las plantas tratadas con las cepas sobreexpresantes fueron significativamente mejores que los tratamientos con la cepa silvestre y las cepas mutadas de la swollenina, aumentando su biomasa y su altura. Estos datos concuerdan con lo encontrado por Metha en el 2014, quien demostró que las plantas inoculadas con una cepa de *T. atroviride* Tsw0-28 que sobreexpresa la swollenina tienen un mayor tamaño comparadas con las plantas no inoculadas (datos no publicados). También observamos que las plantas tratadas con las cepas mutadas del gen *swo1*, tuvieron un mejor crecimiento que las plantas sin tratamiento, y mostraron datos significativamente iguales a los tratados con la WT, pero como se ha dicho, su talla es menor que aquellas plantas inoculadas con las sobreexpresantes.

Estos resultados comprueban que tratar a las plantas de Chile con cepas que sobreexpresan a la swollenina, aumentan notoriamente el crecimiento de las plantas; sin embargo, esta proteína no es el único factor que influye en el aumento del crecimiento, ya que en las plantas inoculadas con las cepas mutadas del gen *swo1* no hubo una disminución del efecto promotor comparado con la inoculación de la cepa silvestre, por lo que suponemos que hay otros factores involucrados en la habilidad de *Trichoderma* como promotor del crecimiento vegetal, aun sin la swollenina.

En este contexto, la literatura menciona que las diferentes especies de *Trichoderma* utilizan diferentes vías para promover el crecimiento de las plantas, como son: la producción de fitohormonas (auxinas), compuestos orgánicos volátiles como el 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), metabolitos secundarios o

alterando la homeostasis de las fitohormonas de las plantas (Gravel *et al.*, 2007., Vinale *et al.*, 2008; Contreras-Cornejo *et al.*, 2009., Viterbo y Horwitz, 2010., Sáenz-Mata *et al.*, 2014), aunado a esto podemos proponer que una mayor cantidad de la proteína swollenina con actividad amorfogénica, permitiría una mayor colonización de la raíz, lo que se ve traducido en una mayor promoción del crecimiento vegetal al haber más biomasa fúngica dentro de la raíz, esto concuerda con lo encontrado por Brotman y colaboradores en el 2008, donde la cepa que sobreexpresa a la swollenina mostró mejores porcentajes de colonización comparados con la cepa silvestre, en nuestro queda en una perspectiva evaluar por otros métodos como el uso de la técnica de qPCR en diferentes tiempos.

Resistencia a estrés biótico inducido por *T. atroviride*

De igual manera se evaluó la capacidad de respuesta ante la infección de *R. solani*. Brotman y colaboradores en el 2008, reportan que el dominio de unión a celulosa de la swollenina de *Trichoderma harzianum* induce la resistencia sistémica en plantas de pepino frente a *Botrytis cinérea*. Metha y colaboradores también reportan, que la respuesta a infección por patógenos en plantas de chile (*Alternaria solani* y *R. solani*) es mucho mayor comparado con las plantas inoculadas con las cepas WT y plantas sin inocular. Nuestros resultados concuerdan con estos reportes, mostrando que las plantas tratadas con las cepas sobreexpresoras muestran una resistencia al daño producido por el fitopatógeno *R. solani*. Sin embargo, algo que nos sorprendió fue que las plantas inoculadas con cepas de *Trichoderma* mutadas del gen de la swollenina, presentan resistencia a la infección por *R. solani*, comportándose aún mejor que la cepa WT y la del vector vacío. Estos datos sugieren que *T. atroviride* podría estar expresando otras proteínas o moléculas que están activando el sistema de defensa en la planta que pueden “suplir” la función de la swollenina al percibir la ausencia de ésta.

Se sabe que la inducción del sistema de defensa en plantas se activa principalmente durante los primeros pasos de interacción entre los microorganismos y la planta. El diálogo molecular que existe entre *Trichoderma*

y la planta huésped es muy amplia, Ramírez-Valdespino y colaboradores en el 2019 reportan una detallada y minuciosa información de las principales moléculas efectoras que excreta *Trichoderma*, las cuales están involucradas en los primeros pasos de colonización, incluso la mayoría de ellas están reportadas como moléculas que activan el sistema de defensa de las plantas, entre ellas encontramos hidrofobinas, ceratoplataninas, enzimas hidrolasas, metabolitos secundarios, compuestos volátiles, entre otros.

Existe una gran lista de moléculas que pueden interaccionar y activar la defensa en plantas, en el caso particular de *Trichoderma atroviride*, se sabe que tiene presencia de genes que codifican para hidrofobinas y 3 genes que codifican para ceratoplataninas, ambas moléculas son reportadas como MAMPs que participan en la colonización e inducción de la resistencia sistémica (Viterbo y Chet, 2010; Salas-Marina, 2015).

Las ceratoplataninas actúan como proteínas similares a la expansina que debilitan los agregados de celulosa de la pared celular (Baccelli *et al.*, 2018), un modo de acción similar al que presenta la swollenina, por lo que sugerimos que el éxito que muestran las mutantes de *Swo1* en la inducción de la defensa contra patógenos, se debe a que la cepa mutante está compensando en los primeros pasos de la colonización la ausencia de swollenina con la expresión aumentada de las ceratoplataninas reportadas específicamente como MAMPs. Esto también se sugiere al evaluar la capacidad de las cepas mutantes para colonizar la raíz significativamente igual que la cepa silvestre, es necesario profundizar más en este apartado, realizando experimentos donde se incluyan mutantes de las proteínas que son tentativamente las responsables.

Salas-Marina y colaboradores en el 2015, evaluaron el efecto de la proteína EPL1 (ceratoplatanina) de *T. atroviride* como inductor de la resistencia sistémica de tomate frente a *B. cinérea*, y comprobaron que esta proteína activa varias vías de respuesta, induciendo así la resistencia sistémica en la planta.

Resistencia a estrés por sequía inducido por *T. atroviride*

Existen reportes que *Trichoderma* también protege a las plantas bajo condiciones de estrés abiótico (Harman en 2004, Gusain *et al.* en 2014., Estévez-Geffriaud *et al.*, 2020). Gusain y colaboradores en el 2014 reportan a *Trichoderma harzianum* como un microorganismo benéfico que influye en la respuesta a estrés salino, activando la maquinaria antioxidante y otra serie de respuestas benéficas, aumentando la supervivencia en las plantas.

Nosotros demostramos que diferentes cepas de *Trichoderma atroviride* pueden inducir la resistencia a estrés por sequía en plantas de Chile. Al evaluar la resistencia de las plantas por 13 días sin regar, utilizando un control positivo plantas sin inocular regadas normalmente (C+); las plantas sin inocular y sin riego (C-) mostraron una reducción notable en el desarrollo de la planta, mostrando daños visibles a partir del día 7 de sequía, por otro lado las plantas inoculadas con las cepas *T. atroviride* WT, *Ta.pUE10*, y las mutantes de swollenina (*Taswo1-6Δ* y *Taswo1-8Δ*) mostraron una talla mayor que el C-; sin embargo se notó una reducción del desarrollo y presentaron daño aparente a los días 10 del proceso de sequía; por el contrario las plantas inoculadas con las cepas sobreexpresoras, fueron las de mayor tamaño durante todo el proceso de sequía (13 días) indicando que no detuvieron su crecimiento durante el estrés, además no mostraron daño aparente al déficit de agua, comprobando que las cepas que sobreexpresan a la swollenina pueden aumentar el tiempo de supervivencia en las plantas de Chile, además que no detienen su desarrollo en comparación con los otros tratamientos. Esto también indica que la o las vías de resistencia a patógenos y de tolerancia a estrés por sequía son distintas, una es independiente de la swollenina (estrés por sequía, ya que las mutantes se comportan de manera muy similar a las plantas inoculadas con las cepas silvestres) y otra dependiente de la swollenina, su sobreexpresión o su ausencia altera la respuesta a resistencia a fitopatógenos.

Los reportes indican que existen diferentes vías de protección en plantas contra estrés por sequía, como el mantenimiento del potencial hídrico, rápido cierre de estomas, alta eficiencia del agua, biosíntesis de ácido abscísico, síntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, reprogramación de la expresión génica,

protección de estrés oxidativo (Aiken y smucker, 1996; Price *et al.*, 2002; Ferdous *et al.*, 2015).

En este estudio evaluamos la acumulación de diferentes osmolitos que se han descrito como osmoprotectores en plantas, que pueden incrementar el potencial osmótico celular a través de su acumulación bajo condiciones de estrés por sequía, como son: la prolina, glicina, betaína, manitol y trehalosa (Zhu, 2002; Wang *et al.*, 2007). Se midió la acumulación de trehalosa, manitol y eritritol en el día 13 de sequía. Se comprobó que las plantas inoculadas con las cepas *Taswo1-6Δ*, *Taswo1-8Δ*, WT, y *Ta.pUE10*, y el control negativo (planta sin inocular no regada) no muestran una diferencia significativa en la acumulación de trehalosa, manitol y eritritol.

Curiosamente se obtuvieron resultados inesperados, las plantas inoculadas con las cepas sobreexpresantes acumulan menos trehalosa y manitol que las cepas inoculadas con cualquiera de las otras cepas de *Trichoderma* y de hecho no se observan diferencias significativas con el control regado normalmente. Los niveles de trehalosa y manitol fueron superiores en las plantas inoculadas con la cepa silvestre, la cepa con el vector vacío o las mutantes.

Estos resultados sugieren que la supervivencia de las plantas de Chile no depende de estas 3 moléculas, además se podría proponer que las cepas sobreexpresantes de swollenina “influyen” en la modulación de la acumulación de estos 3 osmolitos, pudiendo disminuir la acumulación y “desviar” las vías de protección para que las plantas aprovechen al máximo sus recursos. Esto se comprueba cuando se evaluó la acumulación de prolina, donde se nota un cambio significativo en las plantas tratadas con las cepas sobreexpresoras, mostrando una hiper-acumulación de prolina, respecto a los demás tratamientos con las cepas de *Trichoderma*.

Se sabe que de manera natural *Trichoderma* puede influir en la tolerancia al estrés hídrico e incrementa la acumulación de prolina en plantas, como lo encontró Mona y colaboradores que en el 2017 donde reportan a *T. harzianum* como un microorganismo que incrementa los niveles de prolina bajo condiciones de sequía en plantas de tomate. En nuestros resultados comprobamos que efectivamente tanto la cepa silvestre, la del vector vacío y las mutantes pueden

inducir la acumulación de prolina; sin embargo, el tiempo de supervivencia que demostró la inoculación con cepas sobreexpresoras de swollenina (13 días) fue superior al de las otras cepas de *Trichoderma* (10 días), además que las plantas tratadas con las cepas sobreexpresoras no mostraron signos de daño aparente como se presentó en los otros tratamientos. Dado que la colonización es prácticamente igual en las cepas silvestres que en las cepas mutantes de *swo1*, no es de sorprender que acumulen una cantidad similar de prolina, aunque esta es inferior a la encontrada en plantas inoculadas con las cepas sobreexpresantes. Esto concuerda con los fenotipos de tolerancia a estrés por sequía que se observaron.

Sardar-Ali y colaboradores en el 2018, reportan las principales vías involucradas en la respuesta a estrés abiótico, que van desde cascadas de señalización hasta la vía de respuesta hormonal. Dentro de estas rutas de señalización encontramos a factores de transcripción claves para contrarrestar el estrés, unos factores de transcripción involucrados son los WRKY y los factores MYB. Estos factores de transcripción están involucrados en las vías de respuesta activadas por *Trichoderma* (Brotman *et al*, 2013), activadas principalmente por los MAMPs. Es importante recalcar que además de estas moléculas inductoras que produce *Trichoderma*, también regula la actividad hormonal en la planta, otra de las vías de respuesta a estrés biótico y abiótico.

Proponemos que la alta acumulación de prolina en las plantas tratadas con las sobreexpresantes podría deberse a dos factores importantes: una es la mayor colonización que tienen las cepas sobreexpresantes en plantas de Chile, por lo tanto; al haber mayor cantidad de micelio, habrá mayores beneficios hacia la planta. Por otro lado, es la cantidad de swollenina que está presente y que se está expresando constitutivamente dentro de la planta, recordemos que es una proteína con actividad tipo expansina que actúa como un patrón molecular.

En este contexto existen reportes, que hacen referencia a que las proteínas expansinas de plantas pueden inducir supervivencia en otras plantas, Chen y colaboradores en el 2016, comprobaron que la sobreexpresión de una proteína expansina de trigo, en plantas de tabaco las convierte en tolerantes al déficit hídrico, aumentando la retención de agua, y aumentando los contenidos de prolina en las plantas sobreexpresoras, por otro lado Dai y colaboradores en el

2012 encontraron que la expresión de un gen de expansina de rosa, *RhEXPA4*, está notablemente regulado en pétalos de rosa después de la deshidratación, posteriormente en el 2013, el mismo grupo de trabajo comprobó que este gen confiere tolerancia a la sal y la sequía a plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *RhEXPA4* (Lu *et al.*, 2013).

Nuestros resultados son muy importantes y prometedores ya que demostramos que cepas de *Trichoderma atroviride* sobreexpresoras de una proteína tipo expansina (swollenina) puede influir significativamente en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como la resistencia a infección por *R. Solani* y la supervivencia al estrés por sequía durante períodos más largos (13 días) aumentando los contenidos de prolina.

Evaluación de la expresión de genes de defensa

Con base en los resultados obtenidos en el experimento de respuesta a estrés biótico, específicamente frente a *R. solani*, donde se vio una reducción del porcentaje de daño en las plantas tratadas con las cepas de *Trichoderma*, se decidió evaluar la expresión de 2 genes relacionados a la resistencia sistémica inducida (RSI), el gen de la defensina 1 (J1) y un gen *pr2* (β -Glucanasa) relacionado al resistencia sistémica adquirida (SAR), ambos genes reportados como genes marcadores para evaluar la inducción de la defensa en plantas.

Los resultados demuestran que la inoculación con cepas que sobreexpresan la swollenina, pueden aumentar significativamente el nivel de expresión de la proteína PR2 y la defensina J1, promoviendo la reducción de cerca del 80% de daño causado por el fitopatógeno; sin embargo, algo que nos sorprendió fue el hecho que las mutantes y las cepas WT, aun cuando reducen el porcentaje de daño significativamente, estas no elevaron la expresión de estos genes.

Como se ha mencionado anteriormente, la activación del sistema inmune de las plantas se ve alterado en los primeros pasos de colonización, donde actúan una inmensa cantidad de moléculas que pueden ser enzimas, proteínas, metabolitos, factores de transcripción, he incluso fragmentos o partes de la pared celular del hongo o la planta, todo esto influye en la respuesta sistémica de la planta. Es

necesario hacer énfasis que las vías de activación de señales se lleva a cabo principalmente por las vías de JA/ET activando la ISR, donde en esta vía de defensa, se utilizan principalmente los genes PDF1.2 (Plant defensin 1.2), Thi2.1 (Thionin) o Chib (Chitinase B) como genes marcadores (Van Loon et al., 2006), por otro lado también la vía de la resistencia sistémica adquirida (SAR), regulada por el ácido salicílico (SA), donde se conduce a la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR) (Bari y Jones, 2009).

Basados en los resultados de expresión del gen *pr2* en plantas de chile en interacción con las diferentes cepas de *Trichoderma atroviride* que se usaron en este trabajo, podemos proponer que las cepas sobreexpresantes de la swollenina activan principalmente las vías de respuesta de SAR regulado por las vías de SA, y esto concuerda con los resultados obtenidos por Alonso-Ramírez y colaboradores en 2014, donde demostraron que las vías de respuesta por SA son indispensables para evitar que *Trichoderma harzianum* entre al sistema vascular y este provoque un colapso en la planta.

Con esto podemos aseverar que la colonización de *Trichoderma* está regulada por la vía de defensa del ácido salicílico, donde uno de los principales genes que se activa es *pr2*, entonces, la swollenina promueve la interacción directa con esta vía y además al incrementar el nivel de micelio colonizador, esta se ve reflejado en una mayor expresión de genes defensas.

Por otro lado, las vías de respuestas de JA/ET en plantas de chile también se ven alteradas cuando se inoculan con la cepa sobreexpresante de la swollenina, aumentando la expresión de las defensinas, proteínas que se utilizan para evaluar el sistema de defensa por esa vía, aunque esta es menor comparada con los niveles de expresión de las PR. Esto se debe a que no está directamente relacionada con la modulación de la colonización por *Trichoderma*, y esto lo demuestra Martínez-Medina y colaboradores en el 2017, en donde evaluaron la colonización en plantas de *Arabidopsis* mutadas de las vías de respuesta JA/ET, donde demostraron que no se ve afectada la colonización ni el sistema vascular de la planta, descartando que influya en la regulación de la colonización por *Trichoderma*.

Es importante recalcar que existen numerosos genes de defensa que se pueden activar por efectores, tanto en la vía de ISR y en la vía SAR. Estos numerosos genes también pudieran estar induciéndose y teniendo un efecto protector, como se observa en las cepas mutantes del gen *Swo*, quienes también muestran una activación del sistema de defensa; sin embargo, la expresión de las proteínas PR2 y las defensinas, es significativamente menor comparado con las sobreexpresantes. Dado el número de efectores que se han reportado en *Trichoderma*, nosotros sugerimos que las ceratoplataninas pueden estar supliendo la ausencia de la swollenina (discusión anterior), se puede concluir que estas no incrementan significativamente los niveles de expresión de los genes de defensa de PR2; sin embargo, pueden estar interaccionando con otros genes de respuesta de ambas vías (ISR y SAR), como lo demostró Salas-Marina y colaboradores en el 2015 donde evaluó las ceratoplataninas de dos cepas de *Trichoderma* (*T. atroviride* y *T. virens*) y demostró que la ceratoplatanina de *T. atroviride* no muestra un incremento notorio en la expresión del gen β -glucanasa, sin embargo concluyen que es prescindible para inducir casi todos los genes evaluados en ese trabajo, genes relacionados con SAR como el: β -1, 3-glucanasa isoforma clase II (SIGLUA), osmotina (SLPR-5). Algunos genes relacionados al ISR como: endoquitinasa Clase I (SICHI9), peroxidasa (SICEVI16), α -dioxigenasa (SI α -DOX1), proteína de la pared celular del tomate (SITLRP).

CONCLUSIONES

El objetivo del presente proyecto fue explorar el papel de la swollenina una proteína tipo expansina de *Trichoderma atroviride* durante la colonización y en la respuesta a estrés biótico y abiótico de plantas de Chile mediante el uso de mutantes y sobreexpresantes del gen *swo1*. Con base en los resultados obtenidos, podemos concluir que la sobreexpresión de esta proteína aumenta significativamente los niveles de colonización en plantas de Chile variedad mirasol, sin embargo, la ausencia de esta no es un factor indispensable para la colonización en plantas. Utilizamos un método novedoso para evaluar la colonización que en conjunto con otras técnicas como por ejemplo el uso de PCR en tiempo real pudieran dar resultados más exactos e informativos. Aunado a esto corroboramos la capacidad de *T. atroviride* para aumentar la biomasa en plantas, encontramos que las cepas sobreexpresantes aumentan notoria y significativamente el crecimiento en plantas, en el caso de las mutantes no mostraron una disminución en los parámetros de crecimiento comparado con la cepa silvestre, por lo que asumimos que la swollenina no es indispensable para la promoción de crecimiento, pero que debido a la alta colonización de las sobreexpresantes, hay mayores beneficios para la planta.

En cuanto a su capacidad para inducir tolerancia a estrés biótico, las cepas que sobreexpresan a la swollenina, disminuyen ampliamente el área de daño causada por el fitopatógeno *R. solani*, aseguramos que la swollenina activa vías de defensa involucradas en la respuesta a infección por patógenos, sin embargo esta no es la única molécula que interactúa con las vías de respuesta en plantas, las cepas mutantes mostraron de igual manera una reducción en los porcentajes de daño, incluso mayor a las de la cepa silvestre, creemos que esto se debe a que *Trichoderma* al percibir la ausencia de la swollenina excreta otro tipo de moléculas como las ceratoplataninas que tienen una actividad tipo expansina similar a la swollenina. De igual manera, comprobamos que las cepas sobreexpresantes aumentan la expresión de genes relacionados con la defensa en plantas (PR2 y Defensina), esperábamos encontrar resultados similares entre mutantes y sobreexpresantes, ya que el experimento de resistencia al fitopatógeno mostraron reducción al daño, sin embargo, parece ser que las moléculas que "sustituyen" a la swollenina prenden otras vías de respuesta.

Por otro lado en cuanto a la evaluación para inducir resistencia a sequía, las cepas sobreexpresantes mostraron resultados muy prometedores, fueron capaces de inducir la resistencia a sequia por más de 13 días, comparado a la cepa silvestre y las mutantes en donde las plantas se murieron al día 9 sin riego, se comprobó que la sobreexpresión de la swollenina activa la producción del osmolito prolina, asumimos que esta es una de las moléculas que está dando esta característica de supervivencia a las plantas, en caso contrario a la resistencia de estrés biótico, las moléculas que creemos suplen a la swollenina no prenden vías de respuesta a estrés abiótico.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados y conclusiones obtenidas en este proyecto, nos planteamos las siguientes perspectivas:

1. Crear mutantes de los 3 genes de ceratoplataninas presentes en *T. atroviride*.
2. Evaluar en conjunto con otro método de colonización, a diferentes tiempos y diferentes zonas de la planta, utilizando las mutantes de ceratoplataninas.
3. Purificar la proteína swollenina
4. Evaluar y comparar el efecto de las mutantes y sobreexpresantes de la swollenina, mutantes de las ceratoplataninas, y la proteína pura, en la respuesta a estrés biótico y abiótico. También evaluar la respuesta de genes de defensa y producción de osmolitos.
5. Analizar otros genes relacionados a la defensa contra patógenos y otros osmolitos o proteínas de respuesta a estrés por sequía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Rincón V. H., Torres, Tarsicio C., López López P., Latournerie L., Ramírez Meraz M., Villalón-Mendoza H. y Aguilar-Castillo A.J. (2010). Los chiles de México y su distribución.
- Aguirre-Hernández E. y Muñoz-Ocotero V. (2015). El CHILE como alimento, revista de ciencia.
- Aiken R. and Smucker A. (1996). Root system regulation of whole plant growth. Annual review of phytopathology. 34. 325-46. 10.1146/annurev.phyto.34.1.325.
- Alfano G., Ivey M. L., Cakir C., Bos J. I., Miller S. A., Madden L. V., Kamoun S. and Hoitink H. A. (2007). Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. Phytopathology 97:429–437.
- Alia A. and Pardha-saradhi P. (1991). Proline Accumulation Under Heavy Metal Stress, Journal of Plant Physiology 138(5):554–558
- Alia and Pardha-Saradhi P (1995). Effect of zinc on free-radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*. Phytochemistry 39:45-47.
- Alia., Hayashi H., Sakamoto A. and Murata N. (1998). Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. Plant Journal 16, 155–161.
- Alonso-Ramírez A., Poveda J., Martín I., Hermosa R., Monte E. and Nicolás C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots., Molecular Plant Pathology, Volume15, Issue8.
- Atriztán-Hernández K. (2013). Evaluación del micoparasitismo de cepas de *Trichoderma atroviride* sobreexpresantes de una proteína tipo expansina.

Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad del Estado de Morelos. 66 p.

Ángel-Núñez M. (2000) Manual de técnicas agroecológicas, Primera edición, ISBN 968-7913-10-X

Bacelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., and Pazzagli, L. (2014). Ceratoplatenin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(1), 175-184.

Bates L. S. (1973). Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant Soil*. 39:205-207.

Benitez T., *et al.* (2004). Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.

Benitez T.,... *et al.* (2004) Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.

Bettache, A., Azzouz, Z., Boucherba, N., Bouiche, C., Hamma, S., Maibeche, R., Gahfif O. and Benallaoua, S. (2018). Lignocellulosic biomass and cellulolytic enzymes of actinobacteria. *SAJ Biotechnol*, 5(1), 1-9.

Bjorkman T., Blanchard L.M. and Harman G.E. (1998). Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn when colonized with *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 123: 35–40

Bligh E. G., and Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.

Bowen G.D. and Rovira A.D. (1999). The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1-102.

- Brotman Y., Briff E., Viterbo A. and 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.,... *et al.* (2013). *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLOS Pathogens* 9(3): e1003221.
- Calderón A. A., Zapata J. M., and Barceló R. (1994). Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 289–299. doi: 10.1016/s0885-5765(05)80031-1
- Carrizo-García, Carolina. (2019). Breve historia evolutiva del género *Capsicum*. 10.4000/books.irdeditions.30916.
- Castellón-Martínez E., Carrillo-Rodríguez J.C., Chavez-Servia José Luis and Vera- Guzmán A.M. (2014). Variación fenotípica de morfotipos de chile (*Capsicum annum* L.) nativo de Oaxaca, México. *Phyton*. 83. 225-236.
- Chacon M.R., Rodríguez-Galan O., Benítez T., Sousa S., Rey M., Llobell A. and Delgado-Jarana J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*.
- Chen W.P., Li P.H. and Chen T.H.H. (2000). Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment* 23, 609–618.DOI
- Chen Y., Han Y., Zhang M., Zhou S., Kong X.,... *et al.* (2016) Overexpression of the Wheat Expansin Gene TaEXPA2 Improved Seed Production and Drought Tolerance in Transgenic *Tobacco* Plants. *PLOS ONE* 11(4): e0153494

- Chen Y.Y., Hughes L.P., Gladden L.F. and Mantle M.D. (2010). Quantitative ultrafast MRI of HPMC swelling and dissolution J. Pharm. Sci., 99 (2010), pp. 3462-3472
- Chen, X. A., Ishida, N., Todaka, N., Nakamura, R., Maruyama, J. I., Takahashi, H., and Kitamoto, K. (2010). Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. *Applied and environmental microbiology*, 76(8), 2556-2561.
- Cingoz G.S., Verma S.K. and Gurel E. (2014). Hydrogen peroxide-induced antioxidant activities and cardiotonicglycoside accumulation in callus cultures of endemic *Digitalis* species. *Plant Physiol. Biochem.* 82:89–94.
- CICOPLAFEST (2016). Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Ciudad de México, 664 pp.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortes-Penagos C. and López-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*; 149:1579–1592
- Crowley D.E., Wang Y.C., Reid C.P.P. and Szaniszlo, P.J. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil* 130:179-198.
- Curá, J. (2012). Etileno como mediador de los mecanismos directos e indirectos de la promoción del crecimiento vegetal ejercido por rizobacterias. *Intagri – Manejo integrado del picudo del chile*.
- Dai F.W., Zhang C.Q., Jiang X.Q., Kang M., Yin X., Lü P.T.,... *et al.* (2012). RhNAC2 and RhEXPA4 are involved in the regulation of dehydration tolerance

during the expansion of rose petals. *Plant Physiol.* 160: 2064–2082. Pmid: 23093360

Detlef W. y Glazebrook J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. CSHL Press

Djonovic S., Vargas W.A., Kolomiets M.V., Horndeski. M., Wiest A. and Kenerley C.M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* 145:875–889.

Druzhinina I., and Kubicek C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(2), 100-12.

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

Eisenbarth D.A. and Weig A.R. (2005). Dynamics of aquaporins and water relations during hypocotyl elongation in *Ricinus communis* L. seedlings, *J. Exp. Bot.* Vol. 56 (pg. 1831-1842)

Esposito E, and Da Silva M. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit Rev Microbiol.* 24:89–98.

Estévez-Geffriaud V., Vicente R., Vergara O., Reinaldo J. and Trillas M.I. (2020). Application of *Trichoderma asperellum* T34 on maize (*Zea mays*) seeds protects against drought stress. *Planta.* 252. 10.1007/s00425-020-03404-3.

Feijóo-Vivas, K., Bermúdez-Puga, S. A., Rebolledo, H., Figueroa, J. M., Zamora, P., y Naranjo-Briceño, L. (2021). Bioproductos desarrollados a partir de micelio

de hongos: Una nueva cultura material y su impacto en la transición hacia una economía sostenible. *Bionatura*, 6(1), 1637–1652.

Ferdous J., Hussain S.S. and Shi B.J. (2015). Role of microRNAs in plant drought tolerance. *Plant Biotechnol J.* 13(3): 293-305.

Frischmann A., Neudl S., Gaderer R., Bonazza K., Zach S., Gruber S., Spadiut O., Friedbacher G., Grothe H. and Seidl-Seiboth V. (2013). Selfassembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *J Biol Chem* 288:4278–4287.

Galindo G.G. y Cabañas C.B. (2006). El cultivo de chile en Zacatecas. pp. 5-18. En: Tecnología de Producción de Chile seco. Libro Técnico No. 5. INIFAP. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental Zacatecas. Zacatecas, Zacatecas, México. 224 p.

Gao Z, He X, Zhao B, Zhou C, Liang Y, *et al.*,... (2010). Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, TaNIP, enhances salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 51: 767–775.

Garderer R., Landam N., Frischmann A., Sulyok M., Krska R., Horwitz B. and Seiboth V. (2015). Sm2, a paralog of the *Trichoderma* cerato-platanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. *BMC Microbiology* 15:2.

García Hernández, J., Leyva Morales, J. B., Martínez Rodríguez, I. E., Hernández Ochoa, M. I., Aldana Madrid, M. L., Rojas García, A. E., y Perera Ríos, J. H. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *CONACYT*.

Garnica-Vergara A. *et al.*,... (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via

auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *New Phytol.* 209(4), 1496–1512

González-García V.; Portal-Onco M. A. and Rubio-Susan V. (2006). Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span. J. Agric. Res.* 4(1):55-79.

Gour R. (2012). Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. *Adv. J. Pharm. Sci.* 1(2):31-30.

Gravel V., Antoun H. and Tweddell R.J. (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39, 1968–1977

Grieve C.M. and Grattan S.R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70: 303-307.

Gusain Y.S., Singh U. and Sharma A. (2014). Enhance activity of stress related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.) induced by plant growth promoting fungi under drought stress. *Afr J Agric Res* 9:1430–1434

Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. and Lorito M. (2004). *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2:43–56.

Heinze J., Bergmann J., Rillig M. C. and Joshi J. (2015). Negative biotic soil-effects enhance biodiversity by restricting potentially dominant plant species in grasslands, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, Volume 17, Issue 3,

Hermosa R., Viterbo A., Chet I. and Monte E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158:17–25.

- Hogenhout S.A., Van der Hoorn R.A, Terauchi R. and Kamoun S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115–122.
- Holmström K. O., Somersalo S., Mandal A., Palva E.T. and Welin B. (2000). Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51, 177–185.
- INIFAP Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (2008). Principales enfermedades del Chile (*Capsicum annum* L.). Folleto técnico Núm. 15
- Jae-Hyuk Y., Zsuzsanna H., Kap-Hoon H., Jeong-Ah S., Yazmid R. D. and Scazzocchio (2004). Double joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Volume 41, Issue 11, Pages 973-981
- Jaklitsch W.M. (2011). European species of *Hypocrea* Part II: species with hyaline ascospores. *Fungal Divers.* 48, 1–247
- Jiang Y. and Deyholos M.K. (2009) Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 69: 91–105.
- Jones J.D. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- Kang Y.D., Dai X.H., Shen D. and Chen (2008). Dynamical modeling and experimental evidence on the swelling/deswelling behaviors of pH sensitive hydrogels *Mater. Lett.*, 62, pp. 3444-3446
- Karakurt H. and Aslantaş R. (2010). Effects of some plant growth promoting rhizobacteria treated twice on flower thinning, fruit set and fruit properties on apple. *African Journal of Agricultural Research*.

- Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G. H., Hu C. A. A. and Verma D. P. S. (1995). Overexpression of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmo tolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108,1387–1394
- Klein D. and Eveleigh D. E. (1998). In: *Trichoderma and Gliocladium* Vol.1 (eds Kubicek, C. P. y Harman, G. E.), 57–69.
- Kogej T., Stein M., Volkmann M., Gorbushina A. A., Galinski E. A., and Gunde-Cimerman N. (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153(12), 4261-4273.
- Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, NY.
- Lo Presti L., Lanver D., Schweizer G., Tanaka S., Liang L., Tollot M., Zuccaro A., Reissmann S. and Kahmann R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* 66:513–545.
- López-Marín L.M. (2016). Manual técnico del cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*.
- Lorito M., Woo S. L., Harman G. E., and Monte E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 395–417. Doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114314
- Lü P.T., Kang M., Jiang X.Q. and Zhang C.Q. (2013). *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. ; 237: 1547–1559. Pmid: 23503758
- Martínez-Medina A., Appels F. V. W. and van Wees S. C. M. (2017). Impact of salicylic acid- and jasmonic acid-regulated defenses on root colonization by

Trichoderma harzianum T-78. *Plant Signal. Behav.* 12, e1345404. Doi: 10.1080/15592324.2017.1345404

Martínez-Pacheco J. (2015). Efectores de oomicetes fitopatogénicos: en la primera línea de ataque Fitosanidad, vol. 19, núm. 3, pp. 251-257.

May-Lara, C., Pérez-Gutiérrez, A., Ruiz-Sánchez, E., Ic-Caamal, A. E., y García-Ramírez, A. (2011). Efecto de niveles de humedad en el crecimiento y potencial hídrico de *Capsicum chinense* Jacq. Y su relación con el desarrollo de *Bemisia tabaci* Genn. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(3), 1039-1045.

Medina-García, G., Mena-Covarrubias, J., Ruiz-Corral, J. A., Rodríguez-Moreno, V. M., y Soria-Ruiz, J. (2017). El cambio climático afecta el número de horas de los rangos térmicos del chile en el norte-centro de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(8), 1797-1812.

Mona S. A., Hashem A., Abd-Allah E. F., Alqarawi A. A., Soliman D. W. K., Wirth S. and Egamberdieva D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of integrative agriculture*, 16(8), 1751-1757.

Moreno F. P. L. (2009). Plant responses to water deficit stress. A review. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.

Nazareno-Saparrat M.C, Ruscitti M. F. y Arango M. C. (2011). MICORRIZAS ARBUSCULARES BIOLOGÍA Y APLICACIONES EN EL SECTOR AGROFORESTAL. Libros de catedras.

Nehls U., Göhringer F., Wittulsky S. and Dietz S. (2010). Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol. (Stuttg.)* 12, 292–301.

- 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. and 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, 102. doi:10.3389/fpls.2017.00102
- Ochoa-Alejo, N., and Ramirez-Malagon, R. (2001). In vitro chili pepper biotechnology. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(6), 701-729.
- Oliva R., Win J., Raffaele S., Boutemy L., Bozkurt T.O., Chaparro-Garcia A., Segretin M.E., Stam R., Schornack S., Cano L.M., van Damme M., Huitema E., Thines M., Banfield M.J. and Kamoun S. (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell Microbiol* 12:705–715.
- Pel M.J.C. and Pieterse C.M.J. (2013). Microbial recognition and evasion of host immunity. *J Exp Bot* 64:1237–1248. doi:10.1093/jxb/err313
- Plett J. M., Kemppainen M., Kale S. D., Kohler A., Legué V., Brun A., ... and Martin, F. (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology*, 21(14), 1197-1203.
- Price A.H., Cairns J.E., Horton P., Jones H.G. and Griffiths H. (2002). Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J Exp Bot.* 53(371): 989-1004.
- Quiroz-Castañeda, R.E y Folch-Mallol, J.L. 2011. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biología Aplicada*. 28(4): 1–11.
- Ramírez-Valdespino C. A., Casas-Flores S. and Olmedo-Monfil V. (2019). *Trichoderma* as a Model to Study Effector-Like Molecules. *Front. Microbiol*

- Reithner B., Ibarra-Laclette E., Mach R. L. and Herrera-Estrella A. (2011). Identification of micoparasitism-related Genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4361.
- Rodriguez R. J., White J.F., Jr, Arnold A.E. and Redman R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182:314–330.
- Romera F. J., García M. J., Lucena C., Martínez-Medina A., Aparicio M. A., Ramos J.,... and Pérez-Vicente, R. (2019). Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 287.
- Ron M. and Avni A. (2004). The receptor for the fungal elicitor ethyleneinducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16:1604–1615.
- Rotblat B., Enshell-Seijffers D., Gershoni J.M., Schuster S. and Avni A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* 32:1049–1055.
- Sáenz-Mata, J., Salazar-Badillo, F.B. and Jiménez-Bremont, J.F. (2014) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* WRKY genes under interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. *Acta Physiologiae Plantarum* 36, 1085–1093.
- Sakamoto A. and Murata N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 51, 81–88.
- Salas-Marina M. A., Isordia-Jasso M. I., Islas-Osuna M. A., Delgado-Sánchez P., Jimenez-Bremont J.F., Rodriguez-kressler M., Rosales-Saavedra M.T., Herrera-Estrella A. and Casas-Flores S. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate

systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*, 6(February), pp.1–13.

Saloheimo M., Paloheimo M., Hakola S., Pere J., Swanson B., Nyssönen E., Bhatia A., Ward M. and Penttila M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*. 269: 4202–4211.

Sánchez-Cruz, R., Mehta, R., Atriztán-Hernández, K., Martínez-Villamil, O., Sánchez-Carbente, M., Sánchez-Reyes, A., Lira-Ruan, V., González-Chávez, C. A., Tabche-Barrera, M. L., Bárcenas-Rodríguez, R.C., Batista-García, R. A., Herrera-Estrella, A., Balcázar-López, E. and Folch-Mallol, J. L. (2021) Effects on *Capsicum annuum* Plants Colonized with *Trichoderma atroviride* P. Karst Strains Genetically Modified in *Taswo1*, a Gene Coding for a Protein with Expansin-like Activity. *Plants (Basel)*.Vol. 10(9):1919.

Sanchita., Singh R, Mishra A. and Dhawan S.S. (2015). Physiological performance, secondary metabolite and expression profiling of genes associated with drought tolerance in *Withania somnifera*. *Protoplasma*.

Sardar-Ali K., Meng-Zhan L., Suo-Min W and Hong-Ju Y. (2018). Revisiting the Role of Plant Transcription Factors in the Battle against Abiotic Stres. *J. Mol. Sci.*19 (6), 1634

Schafer P., Pfiffi S., Voll L.M., Zajic D., Chandler P.M., Waller F., Scholz U., Pons-Kuhnemann J., Sonnewald S., Sonnewald U. and Kogel K.H. (2009). Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. *Plant J* 59:461–474.

Schmoll M., Dattenböck C., Carreras-Villaseñor N., Mendoza-Mendoza A., Tisch D., Alemán M. I., Baker S. E., Herrera-Estrella A.,... *et al.* (2016). The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma*

Species. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 80(1), 205-327.
doi:10.1128/MMBR.00040-15.

Schulz B. y Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research*.
Volume 109, Issue 6

Shabnam N., Pardha-Saradhi P and Sharmila P (2014). Phenolics impart Au³⁺-
stress tolerance to cowpea by generating nanoparticles. *PLoS ONE* 9, e85242

Shabnam N., Tripathi I., Sharmila P. and Pardha-Saradhi P. (2015). A rapid,
ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline. *Protoplasma*. 253.
10.1007/s00709-015-0910-6.

Sharma, I.P. and Sharma A.K. (2020) *Trichoderma–Fusarium Interactions: A
Biocontrol Strategy to Manage Wilt*. In: Sharma A., Sharma P. (eds)
Trichoderma. Rhizosphere Biology. Springer, Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_9

Shoresh M., Harman G.E. and Mastouri F. (2010). Induced systemic resistance
and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol* 48:21–
43.

SIAP, Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2010). Anuario
Estadístico de la Producción Agrícola 2010. Sistema de Información
Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería,
Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Sivakumar P., P. Sharmila P. and Pardha-Saradhi P. (2000). Proline alleviates
salt-stress-induced enhancement in ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase
activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 512-
515.

Soo-Jung B., Tapan Kumar M., Jun Young C., Minji R., Gweekyo P., Sanghee S.,
Seung-Beom H., Hyunchang S., Dong-Won B., Inhwan B., Jong-Joo K. and

- Hanhong B. (2016). *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control.*, Volume 92, Pages 128-138
- Spoel S.H. and Dong X. (2012). How do plants achieve immunity? defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology.* 12: 89–100.
- Strich R., Slater M. R. and Esposito R. E. (1989). Identification of negative regulatory genes that govern the expression of early meiotic genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10018-10022.
- Tapia-Vázquez, I., Sánchez-Cruz, R., Arroyo-Domínguez, M., Lira-Ruan, V., Sánchez-Reyes, A., Sánchez-Carbente, M., Padilla-Chacón, D., Batista-García, R. A. and Folch-Mallol, J. L. (2020) Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. *Microbiological Research.* Vol. 232:126394.
- Ton J., Van Pelt J., Van Loon L. and Pieterse C. (2002). Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*;(15):27-34.
- Tsubouchi H. and Roeder G.S. (2006). Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. *Genes Dev* 20:1766–1775.
- Utkhede R.S., Koch C.A. and Menzies J.G. (1999). Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 265-271. Vandenhove.
- Van Loon L. C., Rep M., and Pieterse C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425

- Van Wees, S. C., Van der Ent, S., and Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 443-448.
- Vargas W. A., Mandawe J. C. and Kenerley C. M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol.* 151, 792–808.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Barbetti M. J., Li H. and Lorito M. (2008). A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 72,80–86
- Viterbo A. and Chet I. (2010). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*, 7: 249-258. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00335.x>
- Viterbo A., Harel M., Horwitz B.A., Chet I. and Mukherjee P.K. (2005). *Trichoderma* MAP-kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. *Appl Environ Microbiol* 71 6241–6246
- Viterbo, A. and Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, vol. 42, pp. 676–693.
- Wang Z. Q., Yuan Y. Z., Ou J. Q., Lin Q. H. and Zhang C. F. (2007). Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164:695-701.

Yedidia I., Benhamou N. and Chet I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65:1061–1070.







Zhu J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2002:53:247-73.

Zuccaro A., Lahrmann U. and Langen G. (2014). Broad compatibility in fungal root symbioses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 135e145.

ARTÍCULO PUBLICADO DEL PROYECTO DE DOCTORADO

Article

Effects on *Capsicum annuum* Plants Colonized with *Trichoderma atroviride* P. Karst Strains Genetically Modified in *Taswo1*, a Gene Coding for a Protein with Expansin-like Activity

Ricardo Sánchez-Cruz ¹, Richa Mehta ¹, Karina Atriztán-Hernández ^{1,2}, Olivia Martínez-Villamil ³, María del Rayo Sánchez-Carbente ¹, Ayixon Sánchez-Reyes ⁴, Verónica Lira-Ruan ⁵, Carlos Alberto González-Chávez ⁶, María Luisa Tabche-Barrera ⁶, Roberto Carlos Bárcenas-Rodríguez ⁷, Ramón Alberto Batista-García ⁵, Alfredo Herrera-Estrella ², Edgar Balcázar-López ^{8,*} and Jorge Luis Folch-Mallol ^{1,*}



Citation: Sánchez-Cruz, R.; Mehta, R.; Atriztán-Hernández, K.; Martínez-Villamil, O.; del Rayo Sánchez-Carbente, M.; Sánchez-Reyes, A.; Lira-Ruan, V.; González-Chávez, C.A.; Tabche-Barrera, M.L.; Bárcenas-Rodríguez, R.C.; et al. Effects on *Capsicum annuum* Plants Colonized with *Trichoderma atroviride* P. Karst Strains Genetically Modified in *Taswo1*, a Gene Coding for a Protein with Expansin-like Activity. *Plants* **2021**, *10*, 1919. <https://doi.org/10.3390/plants10091919>

Academic Editor: Walter Chitarra

Received: 24 August 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 15 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; rsan9207@gmail.com (R.S.-C.); richa.bt@gmail.com (R.M.); inatriztan@gmail.com (K.A.-H.); maria.sanchez@uaem.mx (M.d.R.S.-C.)
- ² Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Cinvestav Campus Guanajuato, Km. 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato León, Irapuato 36824, Gto, Mexico; alfredo.herrera@cinvestav.mx
- ³ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos Cuernavaca, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; chrysomeliidae@gmail.com
- ⁴ Cátedras CONACyT-Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; ayixon.sanchez@mail.ibt.unam.mx
- ⁵ Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; katlira@uaem.mx (V.L.-R.); rabg@uaem.mx (R.A.B.-G.)
- ⁶ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62209, Morelos, Mexico; carloschavezplanta@gmail.com (C.A.G.-C.); tabche@gmail.com (M.L.T.-B.)
- ⁷ Departamento de Ingeniería Bioquímica, Cinvestav Irapuato, Libramiento Norte Carretera Irapuato León Kilómetro 9.6, Carretera Irapuato León, Irapuato 36821, Gto, Mexico; chino_3005@hotmail.com
- ⁸ Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Departamento de Farmacobiología, Universidad de Guadalajara, García Barragán # 1451, Guadalajara 44430, Jalisco, Mexico
- * Correspondence: edkaizerbal@gmail.com (E.B.-L.); jordí@uaem.mx (J.L.F.-M.)

Abstract: Here, we analyzed the effects on *Capsicum annuum* plants of *Trichoderma atroviride* P. Karst strains altered in the expression of SWOLLENIN (SWO1), a protein with amorphogenic activity on plant cell wall components. Strains of *T. atroviride* that overexpressed the *Taswo1* gene were constructed as well as deletion mutants. A novel, cheap and accurate method for assessing root colonization was developed. Colonization assays showed that the *Taswo1* overexpressing strains invaded the host root better than the WT, resulting in a stronger plant growth-promoting effect. The expression of plant defense marker genes for both the systemic acquired resistance and induced systemic resistance pathways was enhanced in plants inoculated with *Taswo1* overexpressing strains, while inoculation with deletion mutant strains resulted in a similar level of expression to that observed upon inoculation with the wild-type strain. Response to pathogen infection was also enhanced in the plants inoculated with the *Taswo1* overexpressing strains, and surprisingly, an intermediate level of protection was achieved with the mutant strains. Tolerance to abiotic stresses was also higher in plants inoculated with the *Taswo1* overexpressing strains but was similar in plants inoculated with the wild-type or the mutant strains. Compatible osmolyte production in drought conditions was studied. This study may contribute to improving *Trichoderma* biocontrol and biofertilization abilities.

Keywords: *Trichoderma*; phytopathogen resistance; stress tolerance; SWOLLENIN

1. Introduction

In recent years, biofertilizer products containing different types of living microorganisms have emerged as important components in integrated nutrient supply systems and hold a great promise to improve the yield and quality of crops [1]. Among the most widely applied biofertilizers are fungi from the genus *Trichoderma* [2].

Trichoderma spp. are ubiquitous soil fungi commonly found also in a large range of plant roots. They establish plant symbioses with monocots as well as dicots, and it has been proposed that there is little or no plant specificity [3–5]. In the work by Zaidi et al., in [6], it has also been stated that “the mechanisms determining host specificity remain poorly understood”. *Trichoderma* spp. have also been widely studied since they show mycoparasitism against other fungi [7]. The strains that are able to colonize roots in a long-term period penetrate the epidermis and reach some cells below this level [3]. Furthermore, they synthesize and secrete different compounds, which can induce resistance responses in the plant against fungal and bacterial pathogens [5,8], which is also part of their capability as agents for biocontrol. These molecules are known as MAMPs (microbe-associated molecular patterns) and include a variety of different compounds. Among the most studied are flagellin, glycoside hydrolases, expansins, cerato-platanins, chitin, lipopolysaccharides, hydrophobins, and secondary metabolites such as sorbecillinoids, alamethicin, or orsellinic acid [9]. In response to these molecules, plants have been shown to induce two kinds of immunity: systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR). The first is mediated by salicylic acid, while the latter involves jasmonic acid and ethylene. Nevertheless, recent studies have shown that these responses are complex, and there is crosstalk between both (and other) pathways (such as Fe deficiency responses) [10]. Among others, these defense pathways induce the expression of proteins named PR (pathogenesis-related proteins) in the SAR response, or defensins, in the ISR response. PR are usually hydrolytic enzymes such as chitinases, glucanases or peroxidases, etc., that attack the cell wall of the pathogens. Defensins are small proteins that show antimicrobial activity by disrupting the pathogens’ membrane but their role is still controversial, since they have been involved in abiotic stress tolerance and plant developmental processes as well [11]. Moreover, when *Trichoderma* spp. colonize plant roots, they promote plant growth through the control of pathogenic microorganisms in the root neighborhood [12], enhancing nutrient availability [4,13] and/or secreting plant hormones [14,15]. Furthermore, plant cell wall-degrading enzymes, such as cellulases produced by *Trichoderma* spp., have been shown to be important for plant root colonization [16,17]. Another valuable and interesting feature of the colonization of plants by *Trichoderma* spp. is that it also enhances tolerance to abiotic stress [18,19]. The mechanisms that *Trichoderma* induces in plants to cope with several abiotic stresses (drought, salinity, heat, cold, etc.) are mostly related to scavenging reactive oxygen species (ROS) by a series of molecules that include peroxidases, lipoxygenases, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase and polyphenols, among others [5,18,20]. *Trichoderma* also modifies the root architecture and growth through pH changes allowing a better water and nutrient uptake [21]. In addition, accumulation of compatible solutes such as proline in response to drought stress has been reported [22].

Trichoderma spp. also secrete proteins with amorphogenic activity on cellulose, among which cerato-platanins are important to colonize the root but also to trigger the defense responses in the plant [23–26]. In addition to hydrolytic enzymes, some *Trichoderma* spp. secrete a non-hydrolyzing protein named SWOLLENIN that reshuffles the crystalline cellulose fiber without producing detectable amounts of reducing sugars [27]. SWOLLENIN was first characterized in the saprophytic fungus *Trichoderma reesei* [27] and has been described in other *Trichoderma* species and other ascomycetes such as *Aspergilli* and *Penicillium* species [28,29]. It contains a homologous region related to expansins and a carbohydrate-binding module (CBM), and it has been shown to have amorphogenic activity on cellulose fibers. These proteins have been mostly studied for their capacity to enhance the saccharification of cellulose when added previously to the incubation of cellulose with cellulases. The *Aspergillus fumigatus* ortholog SWO1 binds chitin [28] while SWO1 from

Trichoderma pseudokoningi has a mild hydrolytic activity on xylan and yeast glucans but not in β -1,4 glycosidic bonds [30]. An alternative role for SWOLLENIN in *T. atroviride* P. Karst has been proposed by Reithner et al. [31], since they found a significantly up-regulated expression of *Taswo1* just before contact with different phytopathogenic fungi. This finding suggests that SWOLLENIN could be involved in causing amorphogenesis in the pathogen fungal cell wall during mycoparasitism. Another role explored for SWOLLENIN was described by Brotman et al. [3]; they observed that overexpression of SWOLLENIN in *Trichoderma asperellum* resulted in a remarkable increase in the ability of the fungus to colonize cucumber roots and that a synthetic peptide corresponding to the CBM of this protein on its own was sufficient to stimulate local defense responses “in vitro” and to induce resistance to stress.

The *T. atroviride* genome sequence revealed the presence of a homologous *SWO1* gene (MycCosm ID80187) to that of *T. reesei* [31]. In this work, we used *T. atroviride* *Taswo1* overexpressing strains or *Taswo1* deletion mutants to study its interaction with two Solanaceae, chili (*Capsicum annuum*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. Our results show that plants inoculated with the overexpressing strains produce more biomass, likely because they colonized the roots more extensively than when inoculated with the wild type. Infection of plants by pathogenic fungi was better controlled when inoculated with the overexpressing strains than infection of those inoculated with the wild-type strain or non-inoculated plants. Surprisingly, the mutant strains enhanced pathogen resistance in leaves to levels in between to those inoculated with the overexpressing strains and the wild type. The expression of defense-related genes was also enhanced in plants inoculated with the overexpressing strains as compared with those non-inoculated or inoculated with the wild-type strain. Our contribution in this work involves mostly in vivo assays of adult plant growth, poses a paradox in the classical model of pathogen resistance, hints at some specificity issues about *Trichoderma*-plant interaction, and includes osmolyte analysis upon imposed drought stress.

2. Results

2.1. Overexpression of *Taswo1* of *T. atroviride* Promotes Growth and Development of *C. annuum* and *S. lycopersicum* Plants

To study the impact of overexpression of *SWO1* on the plant growth-promoting activity of *T. atroviride* P. Karst, we transformed the *T. atroviride* wild-type (WT) strain IMI206040 with pUE10::*Taswo1*. The pUE10 vector drives expression from the *T. reesei* PKI constitutive promoter and was designed to integrate approximately 1200 bp downstream the *BLU17* terminator locus at the *T. atroviride* genome where no evident open reading frames (ORFs) were identified [32]. Transformant strains with the empty vector integrated pUE10 in the desired locus and did not show differences in phenotype from the WT strain regarding growth rate, sporulation, and mycoparasitism [32] (Table 1).

Table 1. Growth rate of the different *T. atroviride* used in this work. ANOVA tests showed no significant differences among the strains' growth rates.

Strain	Growth Rate (cm/day)	Std Dev.
WT	1.61	±0.15
<i>Ta.</i> pUE10 (BMH-0063)	1.7	±0.01
<i>Taswo1</i> -28 (BMH-0064)	1.6	±0.05
<i>Taswo1</i> -10 (BMH-0065)	1.7	±0.1
<i>Taswo1</i> -6 (BMH-0066)	1.5	±0.1
<i>Taswo1</i> -8 (BMH-0067)	1.6	±0.09

Several pUE10::*Taswo1* independent transformant lines and mutant strains were analyzed and characterized regarding their growth rate (Table 1). When analyzed by Southern

blot, most of them showed the expected integration event (for example, see Figure S1). Since the transformed *Taswo1* lines showed similar phenotypes, we chose *Taswo1-28* and *Taswo1-10* and mutant strains *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ* to study its interaction mainly with *C. annuum* (although another Solanaceae, *Solanum lycopersicum*, was also partially tested, see Supplementary Material). Overexpression of *Taswo1* was verified through RT-PCR for *Taswo1-28*, *Taswo1-10*, *Taswo1-6Δ*, and *Taswo1-8Δ* (Figure S2).

To evaluate the effect of overexpression of SWOLLENIN by *Trichoderma* in chili, plants were inoculated with the following strains: WT, empty vector, *Taswo1-28* or *Taswo1-10*, *Taswo1-6Δ*, and *Taswo1-8Δ*, as described in material and methods. After 30 d of growth, root and shoot growth were determined (Figure 1). Interestingly, inoculation with overexpressing strains *Taswo1-28* or *Taswo1-10* strongly stimulated root system growth (Figure 1), increased shoot biomass production (Figure 1), and increased plant height (Figure 1) when compared with the WT or the empty pUE10 inoculated plants, indicating a beneficial effect of the overexpressing on plant growth and development. Non-inoculated plants had shorter shoots and less root system growth, while *Trichoderma* WT-treated plants had longer shoots than the non-inoculated control plants but less than those treated with the overexpressing strains. *Trichoderma*-treated plants had a denser root system. After 30 days, we observed that plant height and leaf area of plants inoculated with *Taswo1-10* and *Taswo1-28* had increased almost three-fold that of non-inoculated plants. ANOVA test results (Figure 1c) indicated significant differences in height, fresh weight, and dry weight of the total biomass between plants inoculated with the overexpressing strains or the WT strain, the empty vector transformant, and the control treatments. The means for root length were higher for the overexpressing strains, but statistical analysis showed no significant differences for this feature when compared to the roots of plants inoculated with the other strains (Figure 1d).

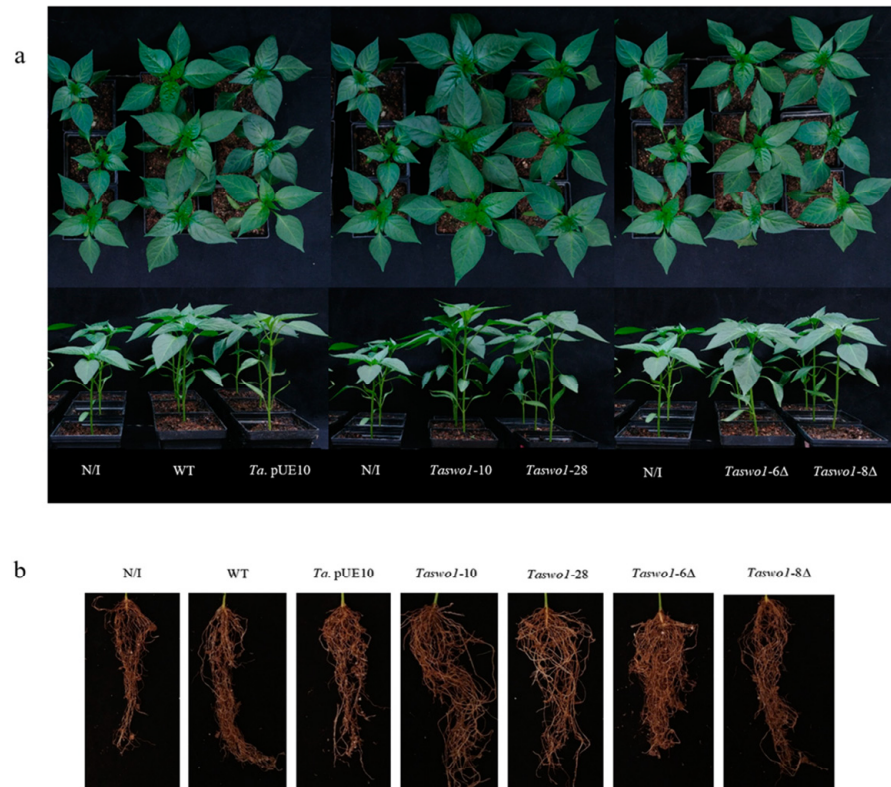


Figure 1. Cont.

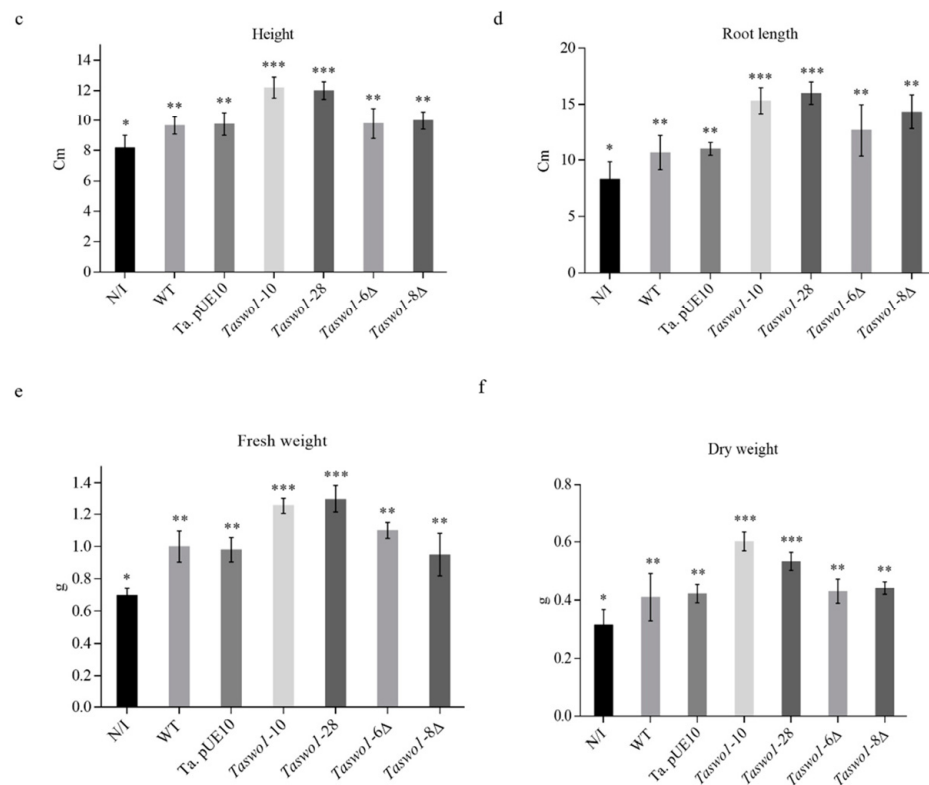


Figure 1. *Trichoderma* overexpressing strains promote plant growth. (a) Representative images of *C. annuum* plants treated with the different strains. N/I non-inoculated; (b) representative pictures of the root systems of plants inoculated with different strains; (c) average height of plants treated with the different strains; (d) average length of the root systems of plants with the different *Trichoderma* strains. Panels (c,d) depict the units in cm; (e) fresh and (f) dry weights expressed in grams (g) of the whole plants treated with the different *Trichoderma* strains. Experiments were conducted in triplicate. Bars represent standard deviation. Different numbers of asterisks (*) within the panels indicate that the average of each treatment is significantly different ($p < 0.05$, $n = 3$).

Taswo1 mutants were also tested on *C. annuum* plants. Two independent lines, *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ*, produced the same phenotype in chili plants as the WT *Trichoderma* strain indicating that SWOLLENIN is not essential for plant interaction (Figure 1).

Phaseolus vulgaris was also inoculated with the overexpressing strains, the WT, or a non-inoculated control, but no significant growth-promoting phenotype was observed with any of the strains (insignificant changes in root and shoot mass were observed, data not shown). These results indicate that the interaction of this plant with *T. atroviride* has specific components that remain to be further explored.

Since the experiments performed with *P. vulgaris* did not show any significant phenotype differences among the plants inoculated with the different strains (data not shown), we decided to measure plant growth-promoting activity in another plant from the Solanaceae family. *S. lycopersicum* plants showed similar behavior to those experiments performed with chili. Biomass was also enhanced in those plants inoculated with overexpressing *Taswo1-28*. The height of the plants was larger than the controls (Supplementary Figure S3); fresh and dry weight confirmed the larger biomass achieved by plants inoculated with *Taswo1-28* compared to the controls and showed similar differences in biomass regarding shoot and leaf area and root fresh and dry weights (Supplementary Figure S4).

2.2. Root Colonization Assays by the *T. atroviride* Genetically Modified Strains

To analyze root colonization, chili plants were inoculated with *T. atroviride* WT, *Taswo1-10*, *Taswo1-28* overexpressing strains, and two deletion mutants (*Taswo1-6 Δ* and *Taswo1-8 Δ*); as a control, non-inoculated plants were used. Statistical analysis of fresh

weight and dry weight of mycelia coming from these experiments indicates that growth of the mycelial mat coming from plants inoculated with the WT, *Taswo1-10*, and *Taswo1-28* strains was significantly different (Figure 2). This method to measure root colonization proved to be reliable and quantitative since it was very reproducible according to the statistical analysis performed. The control plate (non-inoculated plants) showed no fungal growth indicating that surface sterilization was effective. These results indicate that chili plant roots were colonized more effectively by the *T. atroviride* overexpressing strains than by WT strain.

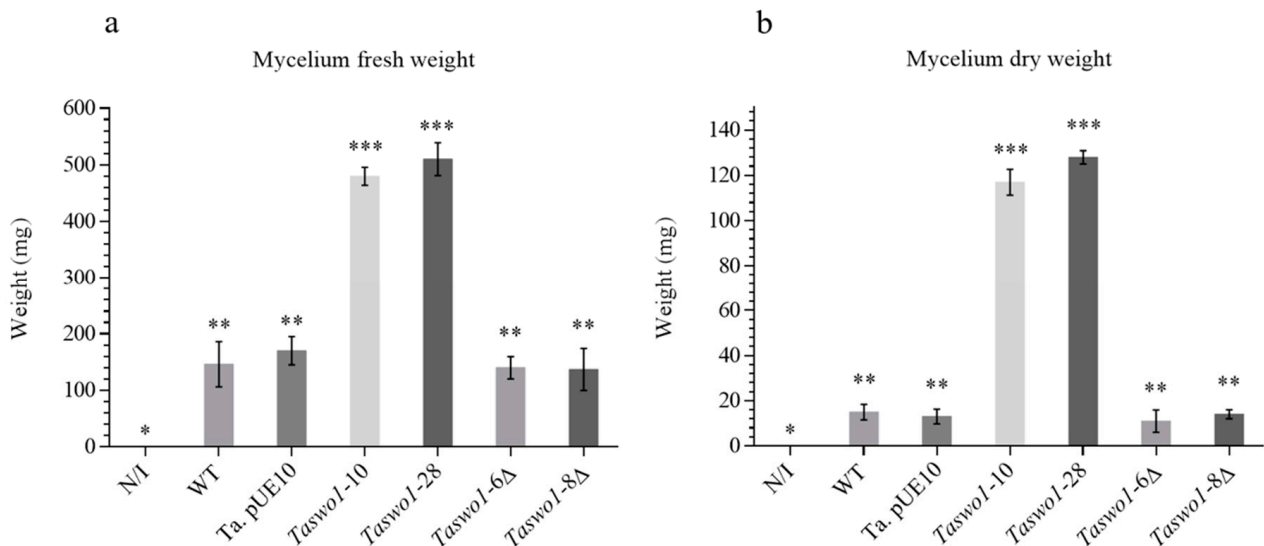


Figure 2. Colonization assay of chili roots by different strains of *Trichoderma atroviride* or in non-inoculated plants. Mycelium growth extracted from roots of non-inoculated plants or inoculated with the WT or with the strain with the empty plasmid *TapUE10*, with the overexpressing lines *Taswo1-10*, and *Taswo1-28* or mutant lines *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ* ANOVA variance test of fresh (a) and dry (b) weight of the mycelia. Different numbers of asterisks (*) within the panels indicate that the average of each treatment is significantly different ($p < 0.05$), $n = 3$ (15).

When these strains were inoculated in *S. lycopersicum*, similar results were observed. The overexpressing strain *Taswo1-28* was more effective in colonizing tomato plants than its counterparts. Again, the control without inoculation showed no mycelial growth (data not shown).

Curiously, the mutant strains *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ* colonized the plants in a similar manner to the WT, in accordance with the plants' phenotypes (Figure 1), suggesting again that SWOLLENIN is not essential for root colonization and that a compensatory mechanism for root colonization must exist.

Plant root colonization by *T. atroviride* was also monitored by light microscopy (Figure S5). This experiment showed that root hairs in chili plants colonized by the *Taswo1-28* strain were longer than those in roots colonized with the WT or in non-inoculated plants (Figure S5).

2.3. Overexpressing and Mutant Strains Provide Protection against Fungal Infection to a Higher Extent Than the WT

Since we observed a clear effect of the overexpressing strains in growth promotion and root colonization, we decided to explore if the overexpression of SWOLLENIN could also confer enhanced resistance to the infection by fungal pathogens. Leaves of *C. annuum* plants treated with the different sets of *T. atroviride* strains were inoculated with *Rhizoctonia solani* or *Alternaria solani*. Infected leaves showed different kinds of lesions according to the phytopathogen used: *A. solani* grew as mycelium on the surface of the leaves, while *R. solani* caused chlorotic spots on the leaves. A representative example is shown in Figure 3. Non-pathogen-treated leaves (control for asepsis) showed no microbial growth

or lesions of any kind. Leaves of plants without *T. atroviride* inoculation were almost completely invaded by the phytopathogenic fungi (around 80% of the leaf area was affected (Figures 3 and 4)). The area of the lesions caused by the fungi on leaves of plants inoculated with the overexpressing or mutant strains were much smaller (around 10% and 30%, respectively) than when inoculated with the WT strain (around 50%, Figures 3 and 4).

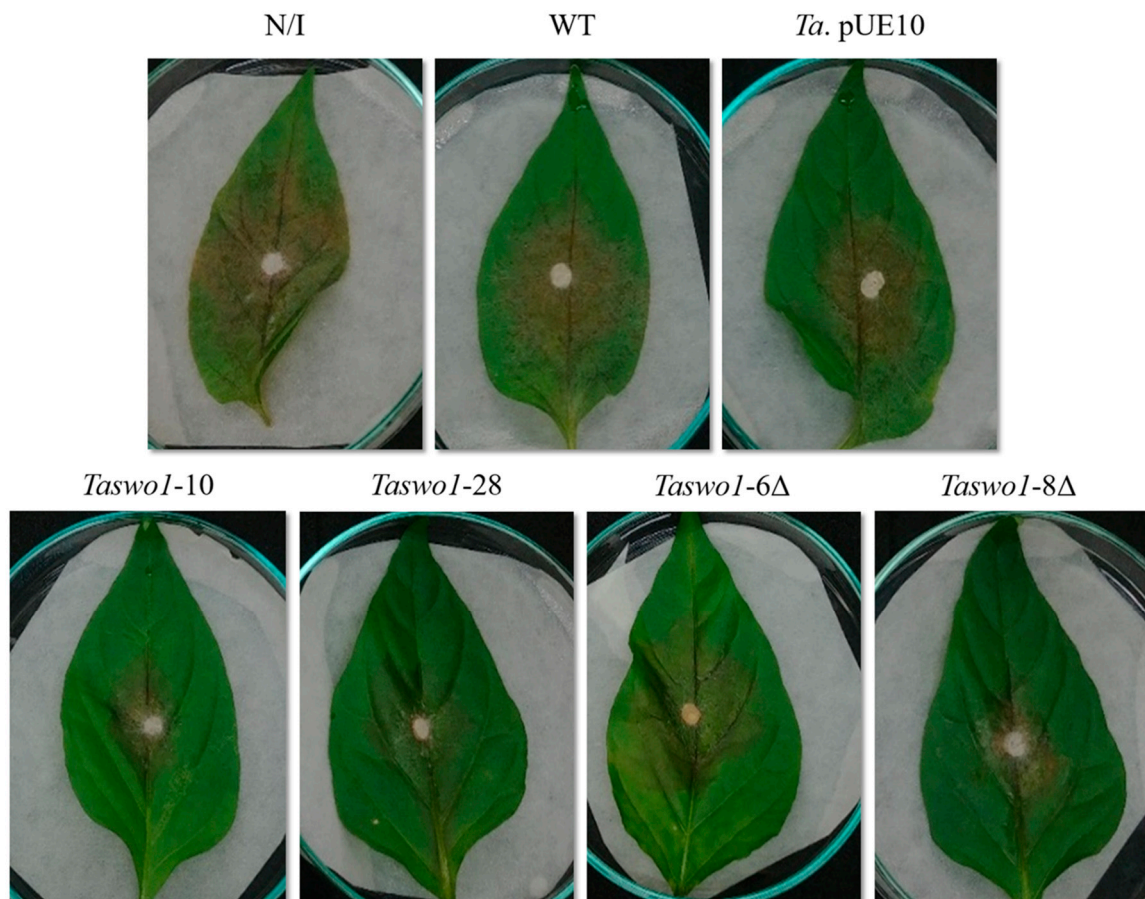


Figure 3. Representative image of infection resistance to *R. solani* on leaves of *C. annuum*. The upper panel shows the controls: non-inoculated plants; inoculated with the WT or the pUE10 transformant. Lower panel: leaves from plants inoculated with *T. atroviride* *Taswo1-28*, *Taswo1-10*; *Taswo1-6Δ*, and *Taswo1-8Δ*. The area of damage was measured using the Image J program.

Interestingly, both mutant strains protected the leaves to some extension performing better than the WT strain (although significantly lesser than the overexpressing strains), indicating that other defense mechanism(s) independent of SWOLLENIN must be triggered by the plants when the fungus lacks SWO1 (Figure 4a; see Discussion).

To determine the impact of the different strains on the plant defense response, we determined the expression of two marker genes, a defensin gene to monitor induced systemic response (ISR) and a pathogenesis-related protein (PR) for systemic acquired resistance (SAR). RT-qPCR experiments showed that the expression of both marker genes was strongly stimulated by the *Taswo1-28* and *Taswo1-10* *Trichoderma* strains, while their expression in plants inoculated with the WT strain was also higher than those observed in non-inoculated plants (Figure 4b,c). Interestingly, the mutant strains expressed both the PR gene and the defensin gene in a similar way as the WT, confirming the notion that other mechanisms, independent of the SAR and ISR responses, must play a role in the plant defense response when SWOLLENIN is absent (see Discussion). It is worth noting that although strain *Taswo1-8Δ* shows a bit lower PR expression when compared to *Taswo1-6Δ*, it still expresses this protein at higher levels than the non-inoculated plants.

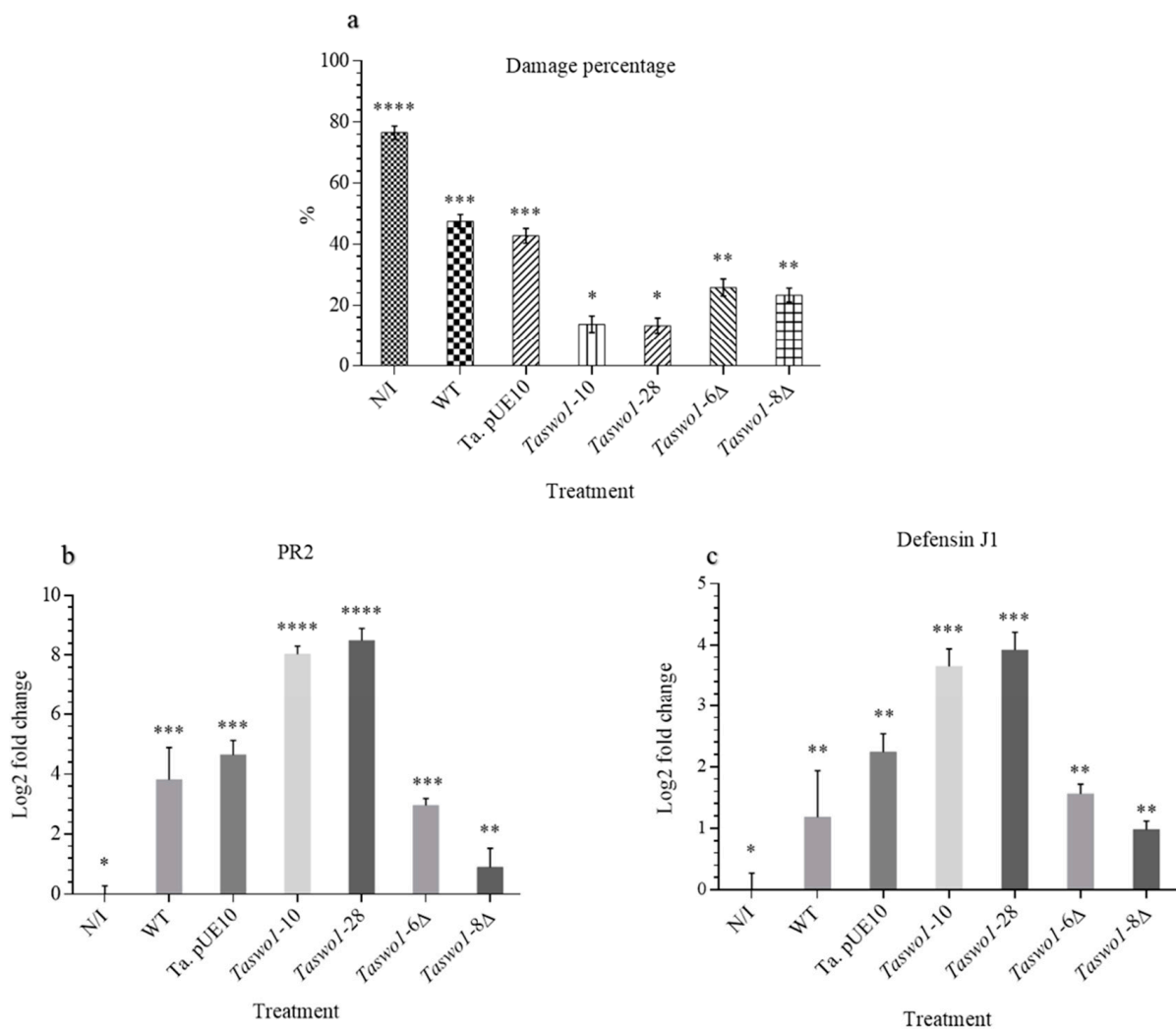


Figure 4. Relation between damage in leaves by *R. solani* and expression of defense genes in response to inoculation of different *Trichoderma* strains. NI, non-inoculated; WT, WT *T. atroviride*; *Taswo1-28* and *Taswo1-10*, overexpressing strains; *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ*, mutant strains. (a) analyzes of the damaged area in leaves of *C. annuum* plants treated with different *T. atroviride* variants. N/I without inoculation. (b) qRT-PCR relative expression of PR2 expression. (c) qRT-PCR relative expression of defensin J1. Ribosomal protein L13e and DNA polymerase family B were used as constitutive controls. Anova variance tests were performed in all cases. Different numbers of asterisks (*) within the panels indicate that the average of each treatment is significantly different ($p < 0.05$), $n = 3$ (15).

2.4. Overexpression of *Taswo1* Provides Abiotic Stress Protection in *C. annuum* Plants

Trichoderma abilities to alleviate abiotic stresses are known. To explore if better root colonization by *Trichoderma* would enhance abiotic stress responses, three-week *C. annuum* plants were inoculated with the WT *Trichoderma* strain or with *Taswo1-28* and 24 h later subjected to cold stress (4 °C for 6 h) and its survival evaluated after 30 days in standard conditions (28 °C). The result shows that 100% of the plants inoculated with the *Taswo1-28* strain survived this cold stress treatment, while only 50% of the plants inoculated with the WT strain survived. None of the control plants (non-inoculated) survived the cold stress treatment (data not shown).

In a similar way, plants inoculated with the WT strain, the overexpressing and mutant strains, and non-inoculated plants were subjected to heat stress treatment (40 °C for 6 h). A total of 100% of the plants inoculated with *Taswo1-28* survived when returned to standard conditions for 30 days. Comparatively, only 30% of the plants survived when inoculated

with the WT strain, while all of the non-inoculated plants were dead after 30 days (data not shown).

A similar result was obtained when plants inoculated with the different *T. atroviride* strains were subjected to drought stress. The plants were deprived of water for up to 13 days, when damage was evident, and then re-watered again to assess survival. Figure 5 shows representative images of this experiment taken three days after resuming irrigation.

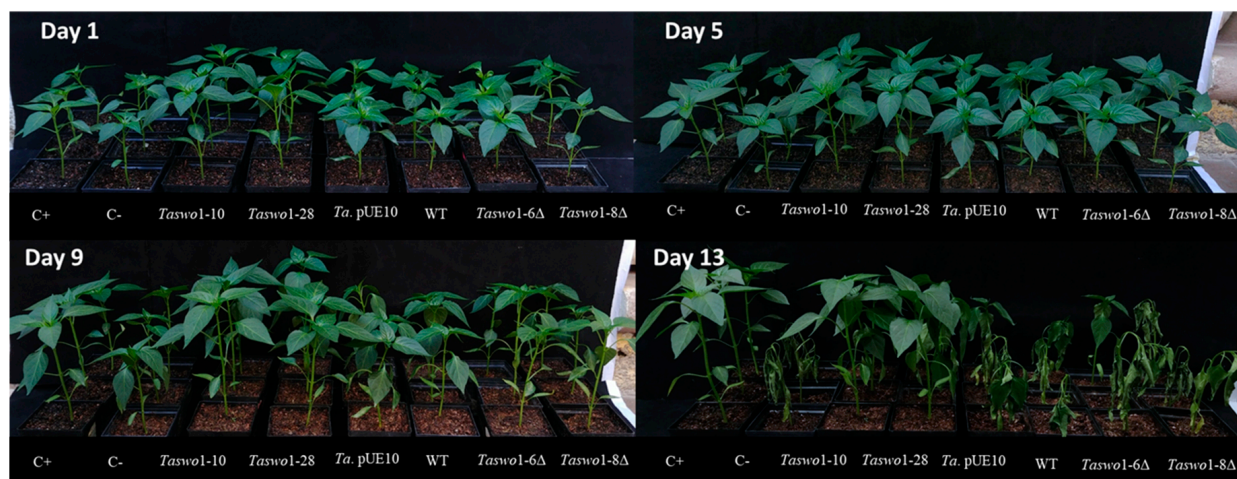


Figure 5. Water stress effects on *C. annuum* plants inoculated with different *T. atroviride* strains. Plants were grown for 30 days under a normal water regime, and at this time, irrigation was suspended for thirteen days. Then, irrigation was resumed, and 3 days later, the survival rate was assessed. C+ regularly watered plants without inoculum. C- non-inoculated, non-irrigated plants. WT: wild type *T. atroviride*; pUE10 *T. atroviride* with the empty vector, *Taswo1-28*, and *Taswo1-10*: overexpressing strains; *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ*: mutant strains for *Taswo1*. Experiments were performed in triplicate.

The survival rate for the different treatments was assessed after three days of re-watering. A positive control of normally irrigated plants was added to compare against the treatments. A total of 100% of the plants survived this treatment when inoculated with the SWOLLENIN overexpressing strains. Interestingly, neither the WT nor the mutant strains helped the plant withstand this treatment.

2.5. Osmolyte Accumulation under Drought Conditions in Plants Inoculated with Overexpressing and Mutant Strains

Osmolyte accumulation is one of the mechanisms plants use to deal with low water activity. To assess if this mechanism was induced by the overexpression of SWO1 by *Trichoderma*, plants were inoculated with different strains and subjected to water stress. Curiously, trehalose was found in lower concentrations in plants inoculated with the overexpressing strains compared to the rest of the strains, which showed higher levels than the uninoculated control (Figure 6). Erythritol and mannitol were also produced more or less in the same amounts, but no significant difference between the treatments was observed (data not shown), with the exception of those plants that were normally irrigated.

However, proline was accumulated strongly in the plants inoculated with the overexpressing strains when compared to plants inoculated with either the WT or the mutant strains (Figure 7).

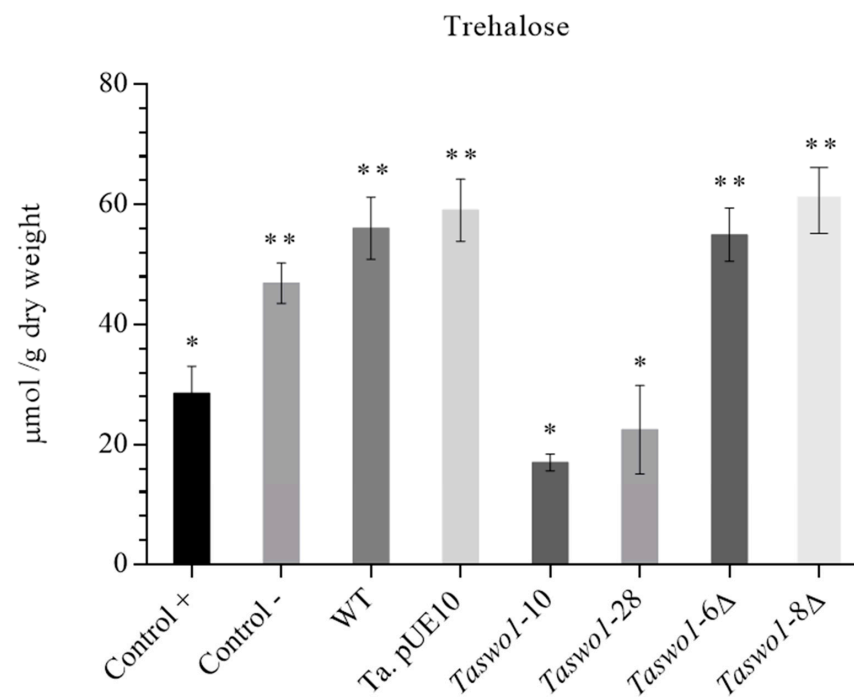


Figure 6. Trehalose contents in leaves of plants treated with different *Trichoderma* strains. Control+: irrigated but non-inoculated plants; control-: non-inoculated and non-irrigated plants. WT: wild type *T. atroviride*; pUE10 *T. atroviride* with the empty vector, *Taswo1-28*, and *Taswo1-10*: overexpressing strains; *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ*: mutant strains for *Taswo1*. Different numbers of asterisks (*) within the panels indicate that the average of each treatment is significantly different ($p < 0.05$).

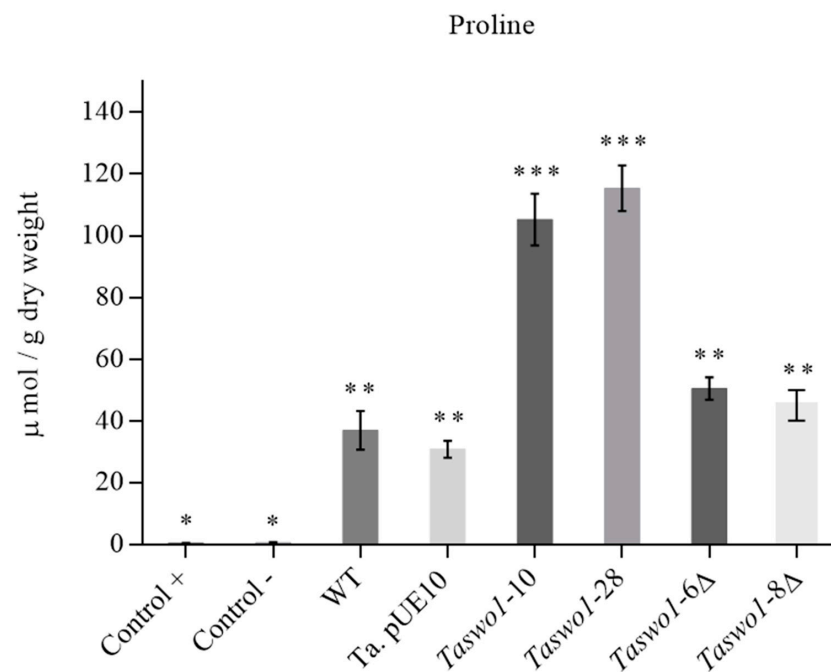


Figure 7. Proline contents in leaves of *C.* inoculated with different strains of *T. atroviride*. C+: irrigated non-inoculated plants; C-: non-inoculated and non-irrigated plants; WT: wild type *T. atroviride*; pUE10 *T. atroviride* with the empty vector; *Taswo1-28* and *Taswo1-10*: overexpressing strains; *Taswo1-6Δ* and *Taswo1-8Δ*: mutant strains for *Taswo1*, none of the inoculated plants were irrigated for 13 days. Different numbers of asterisks (*) within the panels indicate that the average of each treatment is significantly different ($p < 0.05$).

3. Discussion

Trichoderma species are avirulent opportunistic plant symbionts able to colonize plant roots and produce compounds that stimulate growth and plant defense mechanisms⁴. SWOLLENIN is a protein with expansin-like activity that was identified in *T. reesei* and has been related to the fungal cellulolytic activity during its saprophytic growth. On a first instance, it was proven that it could disrupt the structure of cotton fibers without detectable formation of reducing sugars [27], but afterward, its hydrolytic activity was demonstrated [33]. An important barrier encountered by *Trichoderma* during root colonization is the plant cell wall, which is comprised of a complex matrix of polysaccharides, being cellulose one of the most abundant. Due to the activity of SWOLLENIN and a previous report by Brotman et al. [3], we proposed that overexpression of SWOLLENIN in *T. atroviride* would enhance its root colonization abilities, as shown for *T. asperellum*. However, the work by Brotman et al. [3] was performed mostly in vitro, and their results regarding biotic resistance were performed with just a synthetic CBM of SWOLLENIN, while our work measures the effect on the whole adult plant, and the complete *TasWO1* gene was expressed. Here, we show that overexpression of SWOLLENIN in strains *Taswo1-10* and *Taswo1-28* indeed enhanced root colonization of chili plants when compared with the WT strain of *T. atroviride*. While the work by Brotman et al. [3] also proved an increase in root colonization when overexpressing the *TasWO1* gene, we observed in addition that this phenomenon led to higher biomass production of the shoot and root of the plants inoculated with the SWOLLENIN overexpressing strains. This fact also allowed us to describe the behavior of plants inoculated with *Taswo1* deletion mutants, which behave very similar to the WT strain, indicating that SWOLLENIN is not essential for root colonization and that there must be compensatory mechanisms for this and other traits (see below).

Moreover, the strains tested in this study were not able to cause significant effects on plant biomass augmentation in *P. vulgaris* plants, indicating a certain level of specificity. The latter belongs to sub-class: Rosidae, while cucumber, chili, and tomato share the same class: Magnoliopsida, but belong to different subclasses: Dilleniidae (cucumber) and Asteridae (chili and tomato, that are in the same family: Solanaceae.). It is generally accepted that there is no or little plant specificity regarding *Trichoderma* spp. ability to colonize plants. However, in a study conducted by Cripps-Guazzone (2014) [34], it was shown that competition in the rhizosphere between different *Trichoderma* strains “showed that the relationship between *Trichoderma* and the plant is dependent on the *Trichoderma* isolate and the plant species”. As an example, from several isolated *Trichoderma* spp., one of the least competent species was the only one able to colonize onion roots. In another work, soil fungal communities were isolated from oilseed rape and strawberry rhizosphere. It was found that although *Trichoderma* spp. showed great diversity in both cases, BOX-PCR fingerprint experiments indicated a large degree in plant specificity [35]. The specificity mechanisms of *Trichoderma*-plant interactions have been scarcely studied because, as stated before, it is considered that no specific barriers impede plant colonization. However, the role of certain proteins could provide a specificity barrier in the interaction of *Trichoderma* with the plant cell wall. Among them are the CBM of proteins such as SWOLLENIN, cerato-platanins, and lytic enzymes as glucanases and cellulases, which are classified in 55 families and differ in their substrate specificity [36]. Other proteins involved in plant colonization by *Trichoderma* are hydrophobins, which have been found to be species-specific [37] and usually have several members in filamentous fungi [38]. Furthermore, impairment of a *T. asperellum* hydrophobin gene prevented the attachment of the fungus to cucumber roots [39], and hydrophobins have also been linked to plant attachment and root colonization in *Trichoderma* spp. in a study that identified effector proteins [25]. Finally, plant lectins have been shown to play a crucial role in the specificity in other symbiotic systems such as that of *Rhizobium* with legumes [40]. Lectins in *Trichoderma* spp. have been widely studied and shown to play an important role in mycoparasitism [41], but to the best of our knowledge, no studies of *Trichoderma* lectin interactions with plants have been performed, which could be another barrier of specificity.

Because it is well documented that colonization by *Trichoderma* increases plant defense responses [4,42,43], we also analyzed the enhanced resistance to phytopathogenic fungi induced by overexpressing strains. In this work, we present data showing that SWOLLENIN is a suitable elicitor of the plant defense responses since we found significantly increased resistance toward the phytopathogenic fungi *R. solani* or *A. solani* in chili plants colonized by the overexpressing strains compared with the WT strain. Many *Trichoderma* spp. are able to induce systemic changes in plants, which are frequently related to increased levels of PR proteins and the accumulation of phytoalexins [44]. The application of a synthetic version of the CBM of SWOLLENIN of *T. asperellum* reduced the disease provoked by *Pseudomonas* and *Botrytis* in cucumber plants [3]. In this regard, the production of antifungal compounds in leaves of plants colonized by *Trichoderma* has been shown [45]. It has been reported that inoculation of a strain of *T. harzianum* on bean roots reduced considerably the lesion area provoked by *B. cinerea* [46]. It has also been shown that *T. atroviride* can enhance systemic disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways [15].

Here we show that disease severity caused by *R. solani* or *A. solani* on *Capsicum* leaves was significantly reduced in plants treated with an overexpressing strain compared with the WT or untreated plants. Together with the defense gene expression experiments, these results suggest that overexpression of SWO1 in *T. atroviride* results in enhanced activation of the JA/ET and SA pathways, which consequently suppresses pathogen infection in *C. annuum*. Interestingly, the mutant strains in *swo1* also conferred a suitable level of protection, performing even better than the WT (see below).

The defense response in plants is complex and involves many steps, signal transduction pathways, transcription factors, and protein and metabolite production. Several studies have indicated that root colonization by *Trichoderma* strains results in increased levels of defense-related enzymes in plants, including peroxidases, chitinases, and β -1-3-glucanases [4,43,47]. In our study, we found that both PR2 and defensin J1 encoding genes were up-regulated in leaves of plants inoculated by strains *Taswo1-10* and *Taswo1-28* when compared to plants inoculated with the WT strain or to untreated plants. Mutant strains showed a level of expression similar to the WT for both genes. These results suggest that enhanced expression of PR proteins in plants inoculated with *T. atroviride* SWO1 overexpressing strains could be involved in the systemic response to suppress diseases in *Capsicum* since the WT and the mutant strains showed lower levels of expression. Defensin was also overexpressed in plants inoculated with the SWO1 overexpressing strains, and it has been shown to effectively inhibit the growth of pathogenic microorganisms and also generate tolerance to abiotic stress conditions in plants [48].

The phenotype observed in plants inoculated with the mutant strains (i.e., better protection than the WT, but similar expression of the PR and defensin genes) is still to be explored carefully. It has been reported that cerato-platanins of *Trichoderma* are major elicitors of plant defense responses [23,24]. Cerato-platanins are related to expansins, SWOLLENINs, and loosenins, regarding its amorphogenic activity [49], although their role is still in debate [50,51]. The observed phenotype in plants inoculated with the mutant strains could be due to the overexpression of cerato-platanins, for which a role in root colonization and elicitation of defense mechanisms [24] has been demonstrated in several *Trichoderma*-plant interactions [50–52]. In support of this idea, the work by Crutcher et al. [53] showed that in *sm2* mutants (a cerato-platanin paralog), SM1 (another cerato-platanin) was spontaneously overexpressed. So, it could be possible that in the *swo1* mutants, cerato-platanins are overexpressed, conferring to these strains a similar phenotype to that of the WT regarding root colonization, biomass enhancement, and drought tolerance. It is worth noticing also that the mutants' performance to avoid fungal infection better than the WT could be related to other defense mechanisms different from ISR and SAR or to an earlier response in mutant-inoculated plants. Among these, calcium signaling could be involved, since it has been shown that plants are capable of distinguishing signals originated by different fungal partners [54]. Furthermore, it has

been shown that a hydrophobin from *T. longibrachiatum* provokes a rapid increase in Ca^{+2} in *Lotus japonicus* cells [55]. In addition, production of reactive oxygen species is also one of the first steps in response to pathogen infection, before the ISR or SAR systems are fully functional. Finally, a SAR and ISR independent induced defense system that relies in a F-BOX protein (SON1), has been shown in *A. thaliana* [56]. It has also been shown that another F-BOX protein confers resistance to powdery mildew in *Vitis pseudoreticulata* [57]. Further analyzes will be performed to explore the plant defense mechanisms in the deletion mutant-inoculated plants.

We also showed that at least part of the mechanism of drought tolerance is due to proline accumulation. Curiously, other compatible solutes were found in lesser amounts in plants inoculated with overexpressing strains (specially trehalose). This could be because carbon metabolism in the overexpressing inoculated plants is funneled to produce a more efficient osmolyte such as proline. In addition, the strategy to withstand drought seemed to be different when plants were inoculated with the overexpressing strains since plants inoculated with the non-overexpressing strains accumulated trehalose, while a different osmolyte (proline) was found in the plants inoculated with the overexpressing strains. This novel observation deserves and will require more experimentation to unravel this phenomenon.

We suggest that SWOLLENIN could be causing increased amorphogenesis in the cell wall of plants treated with the overexpressing strains, and this facilitates the fungus to colonize the root, activating the plant signaling pathways in a more extensive manner than that in the control plants. It is also a possibility that enhanced amorphogenesis of the cell wall could liberate oligosaccharides (either by lytic enzymes produced by the fungus or by SWOLLENIN itself, according to the report of Andeberg et al. [33]), which could be responsible for a stronger activation of the defense and stress resistance pathways. This study contributes important insights for understanding the nature of beneficial *Trichoderma*-plant interactions and may be used to improve *Trichoderma* biocontrol and biofertilization abilities.

4. Materials and Methods

Strains and Growth Conditions. For propagation and maintenance, *T. atroviride* strains IMI206040 WT, *Taswo1-10*, *Taswo1-28*, *Taswo1-6Δ*, *Taswo1-8Δ*, and a transformant with the empty vector (pUE10 [32]), were grown on solid PDA medium (2% potato, 2% dextrose, and 1.5% agar) for 5 days at 28 °C. The spores were then harvested and resuspended in sterile distilled water up to a concentration of 10^8 /mL and stored at 4 °C until further use. For the transformant strains, 100 µg/mL of hygromycin were supplemented.

Plant Material. Chili (*Capsicum annuum*) seedlings were surface disinfected as described by Glazebrook and Weigel [58]. Seeds were sown in Murashige and Skoog medium (1X MS) supplemented with 3% sucrose (Bioxon) and gelled with 0.7% agar phytigel (Sigma-Aldrich). After germination of seeds, three-week-old plantlets were transferred to plastic pots filled with Metro mix in a controlled environment: 24–28 °C, 75% relative humidity, and a circadian cycle of 18 h light/6 h darkness, the intensity of light $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for three weeks when they reached an approximate height of 3 cm on average. *Solanum lycopersicum* (CID F1 saladett variety) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L. bv. Negro Jamapa) were subjected to the same procedure as for chili to perform the interaction tests.

Construction of *T. atroviride* Strains Overexpressing the *TaSWO1* Gene or Deletion Mutant Strains. The native SWOLLENIN (MycCosm ID80187) cDNA from *T. atroviride* was amplified by PCR using as a template cDNA obtained from *T. atroviride* in confrontation with *Rhizoctonia solani* AG5 before the fungi made contact, as reported by Reithner et al. [31]. Primers *swoF* (5' *GCGGCCGCatcATGTTGCGTAAACTTAGCCTAC* 3') containing a *NotI* restriction site (italics) and *swoR* (5' *GAATTCCAGTTCTTACTAAACTGTAGAGC* 3') containing an *EcoRI* restriction site (italics) were used to amplify the PCR product for further subcloning into the site-directed integrative vector pUE10 under the *PKI* promoter of

T. reesei [32] giving rise to pUE10::*Taswo1*. The PCR conditions were: 94 °C 5', 35 cycles of 94 °C 40'', 58 °C 30'' and 72 °C 90'' and one cycle of 10' at 72 °C. Several clones were sequenced by the method of Sanger to verify they were correct. Plasmid pUE10::*Taswo1* was transformed into the WT *T. atroviride* strains, and hygromycin-resistant colonies were selected. At least three monosporic passes were performed to ensure genetic homogeneity.

SWO1 Mutant Design. The *SWO1* gene was replaced by a hygromycin B resistance-conferring cassette using the double-joint PCR method. Eight pairs of primers were designed for the replacement construct: R1SwoFwd (CCCTTGAGAGAGAGCAGGTGTTGTCC) and R1SwoRev (CCTTCAATATATCAGTTAACGTCGATCGGTGCCTCTGTCAAGAGAGATTTTGG) were used to amplify the 5' flanking region of *SWO1*, R2SwoFwd (CACTCGTCCGAGGGAGGGCAAAGGAATAGGCTGCTGGGTGTGATTCCACACAAGGATCG), and R2SwoRev (GTTTATCACCAGTCTCGAACACACAGAGAGAGC) were used to amplify the 3' flanking region of *SWO1*, hph-F (GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG) and hph-R (CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG) were used to amplify the *HPH* gene, Nestsw01 (GGGTCAGATGGATGGCTTCCAAAGTGTGTG) and Nestsw02 (ATTGAATAGAGAGAGAGTTTATCACCAGTCTCG) were used to amplify the full replacement construct. The PCR conditions to amplify the 5' flanking region, 3' flanking region of *SWO1*, and the *HPH* gene were as follows: 94 °C 3', 35 cycles of 94 °C 30'', 58 °C 30'' and 72 °C 90'' and one cycle of 10' at 72 °C. The conditions to fusion 5' flanking region, 3' flanking region and the *HPH* gene were: 94 °C 3', 10 cycles of 94 °C 30'', 58 °C 60'' and 72 °C 10' and one cycle of 20' at 72 °C. The PCR conditions to amplify the full replacement construct were: 94 °C 3', 35 cycles of 94 °C 30'', 58 °C 60'' and 72 °C 5' and one cycle of 10' at 72 °C. The resulting product was transformed into the *T. atroviride* WT strain, and hygromycin-resistant colonies were selected. At least three monosporic passes were performed to ensure genetic homogeneity.

Transformation and Monosporic Selection. Transformation was carried out according to Herrera-Estrella et al. [59]. The transformed cells were plated on PDA plates containing hygromycin B (100 µg/mL) in the presence of light until spores were obtained. These spores were diluted and re-plated at least three times until stable lines were obtained. Several stable transformant strains were characterized. All of them showed similar behavior, so we chose *Taswo1*-10 and *Taswo1*-28 for further experiments. The insertion of pUE10::*Taswo1* in the *T. atroviride* strains was verified by PCR using genomic DNA as a template and oligonucleotides swo1Fwd (5' CGCAAGAACGCTATGGTAGCT GG 3') and blu17R (5' AGTGTGGAGTTGGTCAAATGATGGG 3'), since only this combination would amplify a 1500 bp product if the *Taswo1* gene is integrated at the BLU17 locus (not shown). In addition, this result was confirmed with a Southern blot analysis for strain *Taswo1*-28 (Figure S1). The expression of *Taswo1* was verified by RT-PCR using cDNA obtained from cultures of the WT strain as a negative control, and all the genetically modified strains tested in this work were grown in PDA liquid medium (Figure S2) and performing the PCR with oligos swoF and swoR. Three monosporic cultures were performed to obtain the spores used for inoculation.

Growth rate of the *T. atroviride* strains Fresh PDA plates with the different strains were grown to confluence, and using a boring stopper, 7 mm agar disks were extracted and used as inocula into fresh PDA plates to monitor growth rate. They were examined daily, and radial growth was measured to determine their growth speed in cm per day.

Inoculation of Chili Plants with the Mutant or WT Strains of *T. atroviride*. For the pot experiments, three cm high, chili plants were inoculated with 1×10^8 spores of the WT strain the *Taswo1*-10, *Taswo1*-28, *Taswo1*-6Δ, and *Taswo1*-8Δ strains or the empty vector pUE10, non-inoculated plants were used as control.

Plant Growth and Root Colonization Comparison. For each fungal strain, seven plants in every one of three lots were inoculated, as explained above. Every fifteen days, plants were observed and compared on the basis of the following parameters: shoot length of the plant, leaf area (leaves were taken from the same positions in the shoots to make the comparisons), at day 30, dry weight of plant root and shoot were measured.

Root Colonization Assay. A novel, cheap method to measure root colonization was implemented for root colonization assays. This method avoids the use of expensive equipment and reagents and also the participation of highly trained personnel (such as RT-qPCR). Roots were detached from different plants after 20 days post-inoculation with *Taswo1-10* or *Taswo1-28* or WT or non-inoculated plants and then extensively washed with water. After surface sterilization in 2% NaOCl for 2 min, the roots were washed abundantly with sterile distilled water. In all samples, portions of one cm in length were cut below the root base in equivalent positions for all samples (as measured in cm); the samples were weighed to ensure the same biomass amount for all samples and were homogenized using a pestle and mortar and diluted 10^3 times in sterile water. Serial dilutions were inoculated on Petri dishes of PDA, which contained a cellophane membrane. After 48 h, the cellophane membrane was lifted from each Petri plate so that the complete mycelial mat was considered to determine fresh and dry weight. Three biological replicas with 5 plants each were examined using quantitative analysis. The rationale for this method is that if the root has been better colonized and has more hyphae, the inoculum on the Petri dishes should be more abundant, and a greater growth should be expected, which proved to be the case.

Microscopy. Plants inoculated with WT or *Taswo1-28*, and non-inoculated (control) plants were harvested from the medium, and excess agar was removed. Roots collected were chopped into 1 cm-long pieces and transferred into vials. Roots were treated by adding 10% KOH after rinsing with ethanol. The samples with KOH were transferred into a water bath at a temperature of 80 °C for 40 min. The KOH solution was rinsed from the root, and 3% hydrogen peroxide was added for 3 min. After this treatment, a staining solution containing 0.5 g of methylene blue, 400 mL of lactic acid, 400 mL of glycerol, and 200 mL of distilled water was added to root samples and kept in a water bath for 2 min. The stained roots were destained using a 50% glycerol solution. For each strain, at least twenty 1 cm stained roots were mounted on a slide and observed under a compound microscope at 100X magnification. Fifteen root hairs were measured in each sample.

RNA Extraction and Gene Expression Analysis by RT-qPCR. Total RNA from fungal mycelium was extracted according to Viterbo et al. [60]. Expression levels of defensin J1-2F (gb | EU560903.1) and PR (gb | AF227953.1 | AF227953) were measured by quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) using primers: J1-Fwd: GCACACTCCATGCGTTTCTT; J1-Rv: CGCAAGTTCTTGCCCTCAACA for DEFENSIN J1 and PR2-F (5' GTT AGG TCG TTC ATT GAT CCG ATT A-3'); PR2-R (5' AGT GAA CCA TCT TGT ACC ACC AC-3') for PR2. A fragment of the elongation factor E1 was used as a standardization control (primers: FE-Fwd TCCAACCCTTCTTGAGGCTC; FE-Rv CTGTCCCTGTTGGTCGTGTA). To eliminate genomic DNA, RNA was treated with DNaseI (Thermo Fisher Inc.) according to the manufacturer's instructions, and its concentration and purity were measured by the ratio of absorbance at 260 and 280 nm. The cDNA was synthesized using 500 ng of each DNase-treated RNA and 10 pmol of the specific reverse primer with a cDNA synthesis kit (Revert Aid H First Strand kit; Thermo Fisher Inc.). The cDNA obtained was used as the template for real-time PCR (RT-qPCR) assays. DNA polymerase family B (Triat2 ID: 53190) and ribosomal protein L13e (Triat2 ID:257690) [61] were used as an internal control in the same samples to normalize the results obtained. All RT-qPCRs were performed in triplicate for each gene of each strain. The quantification *total of 40 cycle* technique used to analyze the data was the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method reported by Livak and Schmittgen [62]. The reproducibility of the whole procedure was determined by performing cDNA synthesis and RT-qPCR experiments with three separate RNAs extracted from each strain. Similar results were obtained for the transcription of measured genes in the repetitions and with the internal control (housekeeping) used for normalization. The cDNA obtained was used as a template for real-time PCR was performed with the I Cyclor 480. Amplification conditions were 10 min at 95 °C, and two step cycles 95 °C for 15 s and 60 °C for 40 s.

Infection with Pathogenic Fungi. Chili plants were grown in soil in a controlled environment (24–28 °C, 75% relative humidity, and a cycle of 18 h light/6 h darkness).

Plants were inoculated with the WT or each of the genetically modified strains, and control plants without inoculation were taken for the experiment. Leaves from several plants were detached from the same position (node) in each plant and were placed in Petri plates on wet filter paper to maintain high humidity, and the plates were wrapped in plastic bags. Two detached leaves from each of three different plants per treatment were inoculated with 5-mm-diameter mycelial agar disks (as described above for the growth rate experiments) of *Rhizoctonia solani* AG5, or *Alternaria solani* (IMI381020, both from the LANGEBIO-CINVESTAV collection) strains taken from 7-day-old cultures grown on PDA. The disks were placed in the middle of each leaf [63]. After 24 h, the disks were removed, and disease development was assessed 3 d after inoculation. This analysis was performed at room temperature during the entire experiment. To calculate the amount of inhibition, we used the ImageJ program to measure the total leaf area and the area invaded by the fungus (for *A. solani*) or the chlorotic regions in the leaf (for *R. solani*). Then we divided the affected area by the total area to obtain the percent of damage caused by the phytopathogens.

Cold Stress Treatment. Plants were grown in a controlled growth chamber. The plants were inoculated as mentioned above with the WT or *Taswo1-28* strains and non-inoculated plants as a control. After 24 h in controlled conditions, we conducted cold treatment at 4 °C, for 6 h and then returned the plants to controlled conditions, and the results were evaluated after 30 days.

Heat Stress Treatment. We followed the procedure in a similar way as for the cold stress experiments but then conducted a heat treatment of 40 °C for 6 h and then returned the plants in controlled conditions for 30 days.

Drought Stress Treatment. Plants were grown with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness at 27 ± 2 °C under a normal water regime for 30 days. Then, irrigation was suspended for thirteen days. After this period, irrigation was resumed, and 3 days later, the survival rate was assessed. Experiments were performed in triplicate.

Statistical Analysis. All experiments were conducted in 15–35 replicates. Data were subjected to an analysis of variance (ANOVA), which was applied to determine significant statistical differences between the different cases. Shapiro–Wilk’s *W*, Kolmogorov–Smirnov, and Lilliefors tests were performed to analyze the normality of the data set. For analysis of homogeneity of variance, Levene or Cochran’s *C* Hartley’s or Bartlett’s test was used. A post hoc analysis that defines the order of the differences found in the ANOVAs was developed. Fisher LSD tests were considered for the post hoc analyses. All statistical calculations were performed in STATISTICA-7.0.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/plants10091919/s1>, Figure S1: Southern blot analysis of the integration of pUE10::*Taswo1* of strain *Taswo1-28*, Figure S2: Construction of *swo1* deletion mutants and overexpression patterns of the genetically modified strains. Figure S3: Height of *Solanum lycopersicum* plants inoculated with the WT *T. atroviride* (WT) strain or the *Taswo1-28* overexpressing strain. Figure S4: Fresh and dry weights of *S. lycopersicum* inoculated with *Taswo1-28* overexpressing strain. Figure S5. Root hair length in chili plants inoculated with the WT strain or *Taswo1-28*; as a control non-inoculated plant.

Author Contributions: Conceptualization: J.L.F.-M., E.B.-L. and A.H.-E. Methodology: R.S.-C., R.M., O.M.-V., K.A.-H., M.L.T.-B. and C.A.G.-C. Software: A.S.-R. Validation: E.B.-L., R.A.B.-G., M.d.R.S.-C., V.L.-R. and R.C.B.-R. Formal analysis: E.B.-L., R.S.-C., A.S.-R., R.C.B.-R. and J.L.F.-M. Investigation, R.S.-C., J.L.F.-M. and V.L.-R. Resources, J.L.F.-M. and R.A.B.-G. Data curation: R.S.-C. and M.d.R.S.-C. Writing—original draft preparation: J.L.F.-M. Writing—review and editing, A.S.-R., E.B.-L., A.H.-E., V.L.-R., K.A.-H. and O.M.-V. Visualization, R.M., R.S.-C., V.L.-R. and J.L.F.-M. Supervision, E.B.-L. and J.L.F.-M. Project administration, J.L.F.-M. and R.A.B.-G. Funding acquisition: J.L.F.-M. and R.A.B.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Council for Science and Technology (CONACyT) grant CB 250831 from the Mexican government and “Fondo Mixto Uruguay-Mexico (AMEXID-AUCI)”.

Institutional Review Board Statement: Not Applicable.

Informed Consent Statement: Not Applicable.

Data Availability Statement: Not Applicable.

Acknowledgments: We are grateful to Rocío Rodríguez-Hernández for technical support. In addition, to the Sequencing Unit of the Instituto de Biotecnología-UNAM for sequencing and DNA synthesis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mahanty, T.; Bhattacharjee, S.; Goswami, M.; Bhattacharyya, P.; Das, B.; Ghosh, A.; Tribedi, P. Biofertilizers: A potential approach for sustainable agriculture development. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *24*, 3315–3335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, S.; Kumar, R.; Yadav, S.; Kumari, P.; Singh, R.K.; Kumar, C.R. Effect of bio-control agents on soil borne pathogens: A review. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2018**, *7*, 406–411.
- Brotman, Y.; Briff, E.; Viterbo, A.; Chet, I. Role of Swollenin, an Expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 779–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* Species—Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 43–56. [[CrossRef](#)]
- Brotman, Y.; Landau, U.; Cuadros-Inostroza, A.; Takayuki, T.; Fernie, A.R.; Chet, I.; Viterbo, A.; Willmitzer, L. *Trichoderma*-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003221. [[CrossRef](#)]
- Mukherjee, P.K. (Ed.) *Trichoderma: Biology and Applications*; CABI: Boston, MA, USA, 2013.
- Druzhinina, I.S.; Seidl-Seiboth, V.; Herrera-Estrella, A.; Horwitz, B.A.; Kenerley, C.M.; Monte, E.; Mukherjee, P.K.; Zeilinger, S.; Grigoriev, I.; Kubicek, C.P. *Trichoderma*: The genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *9*, 749–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- López-Bucio, J.; Pelagio-Flores, R.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Sci. Hortic.* **2015**, *196*, 109–123. [[CrossRef](#)]
- Valdespino, C.A.R.; Casas-Flores, S.; Olmedo-Monfil, V. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Romera, F.J.; García, M.J.; Lucena, C.; Martínez-Medina, A.; Aparicio, M.A.; Ramos, J.; Alcántara, E.; Angulo, M.; Pérez-Vicente, R. Induced Systemic Resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 287. [[CrossRef](#)]
- Parisi, K.; Shafee, T.; Quimbar, P.; van der Weerden, N.L.; Bleackley, M.; Anderson, M.A. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *88*, 107–118. [[CrossRef](#)]
- Benítez, T.; Rincón, A.M.; Limón, M.C.; Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* **2004**, *7*, 249–260.
- Altomare, C.; Norvell, W.A.; Björkman, T.; Harman, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2926–2933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Björkman, T.; Blanchard, L.M.; Harman, G.E. Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: Effect of Environmental Stress. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1998**, *123*, 35–40. [[CrossRef](#)]
- Marina, M.A.S.; Silva-Flores, M.A.; Uresti-Rivera, E.E.; Castro-Longoria, E.; Herrera-Estrella, A.; Casas-Flores, S. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *131*, 15–26. [[CrossRef](#)]
- Ahmad, J.S.; Baker, R. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* **1988**, *34*, 229–234. [[CrossRef](#)]
- Strakowska, J.; Blaszczyk, L.; Chelkowski, J. The significance of cellulolytic enzymes produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54*, S2–S13. [[CrossRef](#)]
- Zaidi, N.W.; Dar, M.H.; Singh, S.; Singh, U.S. *Trichoderma* species as abiotic stress relievers in plants. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*; Vijai, G.G., Monika, S., Alfredo, H.-E., Upadhyay, R.S., Irina, D., Maria, T., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 515–525. [[CrossRef](#)]
- Hidangmayum, A.; Dwivedi, P. Plant responses to *Trichoderma* Spp. and their tolerance to abiotic stresses: A review. *J. Pharm. Phytochem.* **2018**, *7*, 758–766.
- Zhang, F.; Wang, Y.; Liu, C.; Chen, F.; Ge, H.; Tian, F.; Yang, T.; Ma, K.; Zhang, Y. *Trichoderma harzianum* mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *170*, 436–445. [[CrossRef](#)]
- Pelagio-Flores, R.; Esparza-Reynoso, S.; Garnica-Vergara, A.; López-Bucio, J.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mona, S.A.; Hashem, A.; Abd_Allah, E.; Alqarawi, A.; Soliman, D.W.K.; Wirth, S.; Egamberdieva, D. Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *J. Integr. Agric.* **2017**, *16*, 1751–1757. [[CrossRef](#)]

23. Seidl, V.; Marchetti, M.; Schandl, R.; Allmaier, G.; Kubicek, C.P.; Marchetti-Deschmann, M. Ep11, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J.* **2006**, *273*, 4346–4359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gaderer, R.; Lamdan, N.L.; Frischmann, A.; Sulyok, M.; Krska, R.; Horwitz, B.A.; Seidl-Seiboth, V. Sm2, a paralog of the *Trichoderma* cerato-platanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 2. [[CrossRef](#)]
25. Guzmán-Guzmán, P.; Alemán-Duarte, M.I.; Delaye, L.; Herrera-Estrella, A.; Olmedo-Monfil, V. Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genet.* **2017**, *18*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mendoza, A.M.; Zaid, R.; Lawry, R.; Hermosa, R.; Monte, E.; Horwitz, B.A.; Mukherjee, P.K. Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: Role of the fungal secretome. *Fungal Biol. Rev.* **2018**, *32*, 62–85. [[CrossRef](#)]
27. Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyyssönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttilä, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant Expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4202–4211. [[CrossRef](#)]
28. Chen, X.-A.; Ishida, N.; Todaka, N.; Nakamura, R.; Maruyama, J.-I.; Takahashi, H.; Kitamoto, K. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* swo1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2556–2561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kang, K.; Wang, S.; Lai, G.; Liu, G.; Xing, M. Characterization of a novel swollenin from *Penicillium oxalicum* in facilitating enzymatic saccharification of cellulose. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*, 42. [[CrossRef](#)]
30. Yao, Q.; Sun, T.-T.; Liu, W.-F.; Chen, G.-J. Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 2799–2805. [[CrossRef](#)]
31. Reithner, B.; Ibarra-Laclette, E.; Mach, R.L.; Herrera-Estrella, A. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4361–4370. [[CrossRef](#)]
32. Balcázar-López, E.; Méndez-Lorenzo, L.H.; Batista-García, R.A.; Esquivel-Naranjo, U.; Ayala, M.; Kumar, V.V.; Savary, O.; Cabana, H.; Herrera-Estrella, A.; Folch-Mallol, J.L. Xenobiotic compounds degradation by heterologous expression of a *Trametes sanguineus* laccase in *Trichoderma atroviride*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Andberg, M.; Penttilä, M.; Saloheimo, M. Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresour. Technol.* **2015**, *181*, 105–113. [[CrossRef](#)]
34. Cripps-Guazzone, N. Rhizosphere Competence of Selected *Trichoderma* Species. Ph.D. Thesis, Lincoln University, Lincoln, New Zealand, 2014.
35. Berg, G.; Zachow, C.; Lottmann, J.; Götz, M.; Costa, R.; Smalla, K. Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* kleb. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4203–4213. [[CrossRef](#)]
36. Guillén, D.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *85*, 1241–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Degenkolb, T.; Nielsen, K.F.; Dieckmann, R.; Branco-Rocha, F.; Chaverri, P.; Samuels, G.J.; Thrane, U.; Von Döhren, H.; Vilcinskis, A.; Brückner, H. Peptaibol, secondary-metabolite, and hydrophobin pattern of commercial biocontrol agents formulated with species of the *Trichoderma harzianum* complex. *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 662–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Pérez-Llano, Y.; Rodríguez-Pupo, E.C.; Druzhinina, I.S.; Chenthamara, K.; Cai, F.; Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P.; Gostinčar, C.; Kostanjšek, R.; Folch-Mallol, J.L.; et al. Stress reshapes the physiological response of halophile fungi to salinity. *Cells* **2020**, *9*, 525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Viterbo, A.; Chet, I. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathol.* **2006**, *7*, 249–258. [[CrossRef](#)]
40. Solheim, B. *Possible Role of Lectins in Binding Rhizobia to Host Roots*; Bog-Hansen, T.C., Spengler, G.A., Eds.; University of Bern: Bern, Switzerland, 1983; pp. 539–548. [[CrossRef](#)]
41. Inbar, J.; Chet, I. 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*; Advances in Experimental Medicine and Biology; Kahane, I., Ofek, I., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1996; Volume 408, pp. 229–231. [[CrossRef](#)]
42. Chacón, M.R.; Rodríguez-Galán, O. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int. Microbiol.* **2007**, *10*, 19–27. [[CrossRef](#)]
43. Yedidia, I.; Benhamou, N.; Chet, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1061–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Shores, M.; Harman, G.E. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yedidia, I.; Shores, M.; Kerem, Z.; Benhamou, N.; Kapulnik, Y.; Chet, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* Pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 7343–7353. [[CrossRef](#)]
46. De Meyer, G.; Bigirimana, J.; Elad, Y.; Höfte, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* **1998**, *104*, 279–286. [[CrossRef](#)]

47. Howell, C.R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* **2003**, *87*, 4–10. [[CrossRef](#)]
48. Arias, A.C.R.; Espitia, H.M.Z. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. *Acta Biol. Colomb.* **2010**, *15*, 33–46.
49. Georgelis, N.; Nikolaidis, N.; Cosgrove, D.J. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 3807–3823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Luti, S.; Sella, L.; Quarantin, A.; Pazzagli, L.; Baccelli, I. Twenty years of research on cerato-platanin family proteins: Clues, conclusions, and unsolved issues. *Fungal Biol. Rev.* **2019**, *34*, 13–24. [[CrossRef](#)]
51. Ebaccelli, I. Cerato-platanin family proteins: One function for multiple biological roles? *Front. Plant Sci.* **2015**, *5*, 769. [[CrossRef](#)]
52. Baccelli, I.; Luti, S.; Bernardi, R.; Scala, A.; Pazzagli, L. Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *98*, 175–184. [[CrossRef](#)]
53. Crutcher, F.K.; Diez, M.E.M.; Ding, S.; Liu, J.; Horwitz, B.A.; Mukherjee, P.K.; Kenerley, C.M. A paralog of the proteinaceous elicitor SM1 is involved in colonization of maize roots by *Trichoderma virens*. *Fungal Biol.* **2015**, *119*, 476–486. [[CrossRef](#)]
54. Navazio, L.; Baldan, B.; Moscatiello, R.; Zuppini, A.; Woo, S.L.; Mariani, P.; Lorito, M. Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* **2007**, *7*, 41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Moscatiello, R.; Sello, S.; Ruocco, M.; Barbulova, A.; Cortese, E.; Nigris, S.; Baldan, B.; Chiurazzi, M.; Mariani, P.; Lorito, M.; et al. The Hydrophobin HYTL01 secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma longibrachiatum* triggers a NAADP-mediated calcium signalling pathway in *Lotus japonicus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2596. [[CrossRef](#)]
56. Kim, H.S.; Delaney, T.P. *Arabidopsis* SON1 Is an F-Box protein that regulates a novel induced defense response independent of both salicylic acid and systemic acquired resistance. *Plant Cell* **2002**, *14*, 1469–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Wang, J.; Yao, W.; Wang, L.; Ma, F.; Tong, W.; Wang, C.; Bao, R.; Jiang, C.; Yang, Y.; Zhang, J.; et al. Overexpression of VpEIFP1, a novel F-box/Kelch-repeat protein from wild Chinese *Vitis pseudoreticulata*, confers higher tolerance to powdery mildew by inducing thioredoxin z proteolysis. *Plant Sci.* **2017**, *263*, 142–155. [[CrossRef](#)]
58. Glazebrook, J.; Weigel, D. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2002.
59. Herrera-Estrella, A.; Goldman, G.; Van Montagu, M. Notes high-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* **1990**, *4*, 839–843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Viterbo, A.; Harel, M.; Horwitz, B.A.; Chet, I.; Mukherjee, P.K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6241–6246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Atriztán-Hernández, K.; Moreno-Pedraza, A.; Winkler, R.; Markow, T.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma atroviride* from predator to prey: Role of the mitogen-activated protein kinase Tmk3 in fungal chemical defense against fungivory by *Drosophila melanogaster* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e01825–e01918. [[CrossRef](#)]
62. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Elad, Y. Production of ethylene by tissues of tomato, pepper, French-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1990**, *36*, 277–287. [[CrossRef](#)]