



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

Empleo de hongos filamentosos para mejorar la fitorremediación en ambientes contaminados por mercurio: un estudio preliminar bajo una perspectiva fisicoquímica y molecular.

T e s i s

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias-Recursos Bióticos**

Presenta

Biól. José Gerardo Bernal Melo

Dirigido por

Dr. J. Sergio Casas Flores

Dr. Juan Campos Guillén

Santiago de Querétaro, México, Octubre de 2011



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

Empleo de hongos filamentosos para mejorar la fitorremediación en ambientes contaminados por mercurio: un estudio preliminar bajo una perspectiva fisicoquímica y molecular.

T e s i s

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias-Recursos Bióticos

Presenta

Biól. José Gerardo Bernal Melo

Codirectores

Dr. J. Sergio Casas Flores

Dr. Juan Campos Guillén

OCTUBRE, 2011



**Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales**

**Empleo de hongos filamentosos para mejorar la fitorremediación
en ambientes contaminados por mercurio: un estudio preliminar
bajo una perspectiva fisicoquímica y molecular**

T e s i s

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

**Presenta
Biól. JOSÉ GERARDO BERNAL MELO**

**Codirigido por
Dr. J. Sergio Casas Flores y Dr. Juan Campos Guillen**

SINODALES

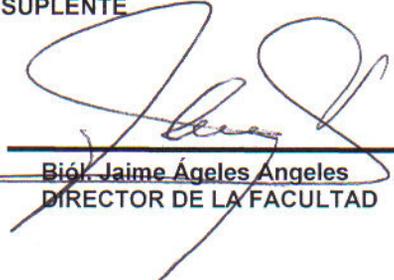
Dr. Juan Campos Guillén
PRESIDENTE

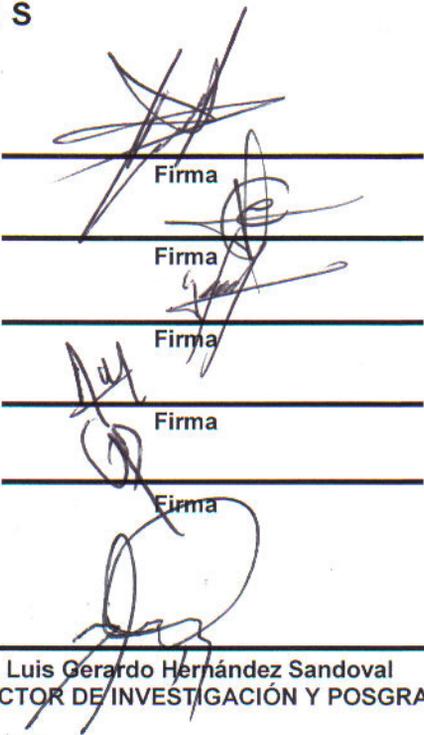
Dr. J. Sergio Casas Flores
SECRETARIO

Dra. Rocío García Martínez
VOCAL

Dr. Andrés Cruz Hernández
SUPLENTE

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
SUPLENTE


Biól. Jaime Ágeles Angeles
DIRECTOR DE LA FACULTAD


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

RESUMEN

El mercurio (Hg^0) se encuentra en la naturaleza en bajas concentraciones, sin embargo en la actualidad sus niveles han aumentado causando biomagnificación en las cadenas tróficas. Los metales pesados generan estrés oxidativo en los seres vivos, este es aliviado por el glutatión (GSH), un tripéptido con función antioxidante y precursor de fitoquelatinas. Para la síntesis de GSH se requiere la expresión de los genes (*GSH1* y *GSH2*), los cuales son inducidos por metales pesados, y su expresión incrementa al añadir jasmonatos y salicilatos, los inductores de la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) y Adquirida (SAR); respectivamente. Las dos vías de resistencia son inducidas por *Trichoderma* spp., así que éstos podrían generar la resistencia a metales pesados en *Arabidopsis thaliana* y potenciar la fitorremediación. Lo anterior es importante debido que las medidas clásicas para remediar sitios contaminados son poco accesibles y la fitorremediación es una alternativa viable. Se encontró que el HgCl_2 inhibió un 91.25% el crecimiento radial de las cepas de *T. virens* aisladas de suelos contaminados con Hg, mientras que en la cepa referencia (*T. atroviride* IMI 206040) fue inhibido un 88.5%. Además, es el primer estudio que reporta la volatilización del Hg^0 *in vitro* por *T. virens* ($213.0 \mu\text{g}/\text{m}^{-3}$) y *T. atroviride* ($513.52 \mu\text{g}/\text{m}^{-3}$). Bajo condiciones de invernadero, los ensayos de interacción planta-microorganismo determinaron que *T. virens* y *T. atroviride* colonizan preferentemente las partes aéreas que las raíces, a pesar de haber inoculado las conidias en el sustrato. Además *Trichoderma* spp. generó que los niveles de Hg en los tejidos vegetales disminuyeran. En los tejidos de *A. thaliana* se midió por RT-PCR semicuantitativa la expresión de *GSH1* y *GSH2*, encontrando que éstos se expresaron normalmente, sin embargo, el HgCl_2 afectó severamente a las plantas y disminuyó la expresión de estos genes. No obstante, *Trichoderma* spp. indujeron un incremento en la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana*, aún bajo el tratamiento con HgCl_2 . Además, disminuyeron los efectos tóxicos del HgCl_2 e incrementaron significativamente el diámetro de las rosetas y la producción de inflorescencias en *A. thaliana* ($P < 0.05$). También se midió la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a*, como genes marcadores de la producción de jasmonatos y salicilatos, encontrando que el HgCl_2 y *Trichoderma* spp., inducen estos genes. Sin embargo, los resultados sugieren un efecto sinérgico *Trichoderma*- HgCl_2 que potencie la producción de jasmonatos e incremente la expresión de *GSH1* y *GSH2*.

(Palabras clave: biomagnificación, estrés oxidativo, glutatión, fitoquelatinas, jasmonatos, *Trichoderma*).

ABSTRACT

Mercury (Hg^0) is found in nature in low levels, but in recent years their levels have been increasing and biomagnifying in trophic chains. Heavy metals produce oxidative stress in living things, however is alleviated by glutathione (GSH), a tripeptide with antioxidant function and precursor of phytochelatins. The *GSH1* and *GSH2* expression are necessary for GSH synthesis. The heavy metals induces *GSH1* and *GSH2* expression, but its expression is increased applying jasmonates and salicylates, inducers of the induced systemic resistance (ISR) and acquired (SAR); respectively. *Trichoderma* spp., activates both mechanisms of systemic resistance, and it could be that enable the resistance to heavy metals in *Arabidopsis thaliana* for enhancing the phytoremediation. This is important why are very expensive the remediation classic methods of the polluted sites, a viable alternative is the fitorremediación. We find that treatment with HgCl_2 inhibits 91.25% the radial growth of strains of *T. virens* isolated from soils contaminated with mercury, unlike it what was observed in the reference strain *T. atroviride* IMI 206040 (88.5%). Furthermore, it's the first *in vitro* report over volatilization of mercury by *T. virens* ($213.0 \mu\text{g}/\text{m}^{-3}$) and *T. atroviride* ($513.52 \mu\text{g}/\text{m}^{-3}$). The plant-microorganism interactions were under greenhouse conditions, we determine the frequency of colonization of *T. virens* and *T. atroviride* in the aerial parts of *A. thaliana* was higher than in their roots, despite having inoculated the conidia on the substrate. Also, mercury levels were decreased by *Trichoderma* effect in vegetal tissues. The *GSH1* and *GSH2* expression was measured by RT-PCR, which was usually we found expressed. However, treatment with HgCl_2 seriously affects plants was decreased expression of these genes. However, we found an increase of *GSH1* and *GSH2* expression in *A. thaliana* induced by *Trichoderma* spp., despite of the treatment with HgCl_2 . In addition, decreased the toxic effects of the HgCl_2 and significantly increased the diameter of the rosettes and production of inflorescences in *A. thaliana* ($P < 0.05$). Also, we measured the expression of *PDF1.2* and *PR-1a* like markers genes of the production of jasmonates and salicylates, we found which HgCl_2 and *Trichoderma* spp. they are inductors of their expression. However, the results suggest a synergistic effect *Trichoderma*- HgCl_2 that it enhances the production of jasmonates and increases *GSH1* and *GSH2* expression.

(Keywords: biomagnification, glutathione, jasmonates, oxidative stress, phytochelatins, *Trichoderma*)

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se efectuó en los Laboratorios de Genómica Funcional y Comparativa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT) y de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El presente trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto No. 102052 FOMIX otorgado al Dr. Juan Campos Guillen y parcialmente por el proyecto No. 103733 CONACyT-Fondos Sectoriales-SEP otorgado al Dr. J. Sergio Casas Flores

Al equipo técnico del IPICyT, Ing. María Isabel Isordia Jasso de La División de Biología Molecular, a Dra. Elizabeth Cortes de La División de Ciencias Ambientales y a I.Q. Ma del Carmen Rocha Medina coordinadora del Laboratorio de Biotecnología Agrícola Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICyT, por el apoyo brindado para el desarrollo del proyecto pero especialmente al Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios por financiar los análisis de cuantificación de mercurio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca No. 230765, otorgada durante el desarrollo del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad y ser mi casa académica desde la preparatoria y al CONACyT por el financiamiento de mis estudios.

Antes que nada dedico este trabajo a mi mamá, hermanos y tíos, por su apoyo incondicional y porque sé que siempre podré contar con ellos. Pero especialmente se lo dedico a Chabelita, por ser un gran apoyo, ya que sin ella este trabajo no hubiera sido posible.

Pero especialmente agradezco a Juan por creer en mí y en este proyecto, pero sobre todo por la oportunidad de formar parte de su equipo trabajo y en todo momento me brindo su apoyo para salir adelante. A Xóchitl, por toda la lata que le daba aun estando lejos. A Sergio por confiar y permitirme trabajar en su laboratorio, pero sobretodo por todas las aportaciones tan valiosas para mi formación profesional y dirigir el rumbo del proyecto. A la Dra. Rocío y al Dr. Vladimir Alonso Escobar Barrios por todos sus comentarios tan atinados. A toño y Andrés por dedicar su tiempo para revisar este trabajo y aportar comentarios enriquecedores para el mismo.

También agradezco a todos mis compañeros del laboratorio 8 del IPICyT por todos los buenos momentos y hacer un ambiente ameno. A Mayte, la “Jefa” Edith, Gema por compartir sus protocolos y ayudarme con las técnicas, a Miguelón y Miguelín por dedicarme su tiempo para orientarme y enriquecer el diseño de los experimentos con sus valiosos comentarios. Pero muy especialmente a Chabelita, por dedicarme su tiempo y aguantar toda la lata que di y por estar ahí cada vez que la necesitaba, gracias!!!.

A Clau por ayudarme en la última etapa de mis experimentos por contribuir en el montaje de los experimento de volatilización y prestarme sus dispositivos.

A todos ustedes muchas gracias!!!!!!

A la memoria de mamá Chayito y del M. en C. José Castillo Tovar, por que gracias a sus enseñanzas y motivación fue posible llegar hasta donde estoy.....muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE	VI
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Contaminación por metales: el mercurio y la problemática ambiental	6
2.2 Mecanismos de entrada de los metales pesados en las plantas	8
2.3 El glutatión y el proceso de detoxificación.....	9
2.3.1 Mecanismos de regulación de los genes de la vía del glutatión	12
2.4 El rol de las fitohormonas en la inducción de genes de la vía del glutatión	13
2.4.1 Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)	13
2.4.2 Resistencia Sistémica Inducida (RSI)	14
2.4.3 Inducción de RSA y RSI por <i>Trichoderma spp.</i>	15
2.5 Medidas de remediación	18
2.6 ¿Por qué trabajar con <i>Trichoderma spp.</i> ?	24
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPOTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
VI. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Muestreo	27
6.2 Aislamiento y caracterización de <i>Trichoderma</i>	27
6.2.1 Aislamiento y preservación de cepas.....	27
6.2.2 Identificación de cepas	28
6.2.3 Caracterización molecular de las cepas.....	28
6.2.4 Caracterización de la resistencia a mercurio de cepas de <i>Trichoderma spp.</i>	29
6.2.5 Producción de compuestos indólicos por <i>Trichoderma</i>	30
6.2.6 Colonización de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Trichoderma spp.</i>	31
6.2.7 Capacidad de volatilización de mercurio por <i>Trichoderma</i>	32
6.3 Toxicidad y determinación de concentraciones de mercurio en <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
6.3.1 Efectos del mercurio en el sistema <i>Trichoderma-Arabidopsis</i> y diseño experimental....	35
6.3.2 Determinación de mercurio en tejido vegetal	36
6.4 Evaluación molecular de la interacción <i>Trichoderma-Arabidopsis</i>	37
6.4.1 Diseño de oligonucleótidos, RT-PCR semicuantitativo y cuantitativo	37
VII. RESULTADOS.....	40
7.1 Aislamientos	40
7.1.1 Selección de cepas de <i>Trichoderma</i> resistentes a $HgCl_2$	40
7.1.2 Descripción de la cepas de <i>Trichoderma</i> seleccionadas	44
7.2 caracterización de cepas	45
7.2.1 Producción de compuestos indólicos	45
7.2.2 Capacidad de las cepas de <i>Trichoderma</i> para colonizar <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
7.2.3 Capacidad volatilización de Hg^0	48

7.2 Interacción <i>Trichoderma-Arabidopsis</i> y los efectos tóxicos del mercurio	50
7.2.1 Crecimiento de <i>A. thaliana</i> bajo la interacción con <i>Trichoderma spp.</i> ,	50
7.2.2 <i>Trichoderma spp.</i> afecta positivamente el desarrollo de <i>A. thaliana</i> a pesar del estrés por $HgCl_2$	55
7.2.3 Niveles de mercurio en tejido vegetal.....	56
7.3 Inducción de genes en <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo la interacción de <i>Trichoderma spp.</i>	58
7.3.1 Efecto del mercurio sobre la expresión de los genes de la vía de síntesis del glutatión (<i>GSH1</i> y <i>GSH2</i>) y de genes marcadores en la síntesis de jasmonatos (<i>PDF1.2</i>) y salicilatos (<i>PR-1a</i>) en <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>Trichoderma spp.</i>	58
7.3.1.1 <i>Trichoderma spp.</i> induce la expresión de los genes de la vía del glutatión (<i>GSH1</i> y <i>GSH2</i>).....	58
7.3.1.2 <i>Trichoderma spp.</i> induce la expresión de los genes de las vías <i>RSI (PDF1.2)</i> y <i>RSA (PR-1a)</i>	66
VIII. DISCUSIÓN.....	70
8.1 La interacción de <i>Trichoderma spp.</i> , disminuye la toxicidad del Hg en <i>A. thaliana</i> ..	70
8.2 El $HgCl_2$ induce los genes implicados en la <i>RSA-RSI</i> pero no los genes de la vía de síntesis del glutatión en <i>A. thaliana</i>	72
8.3 <i>Trichoderma</i> pudiera modificar los niveles de Hg en el suelo relacionándose con la inducción y niveles de expresión génica.	74
8.4 La expresión de <i>GSH1</i> y <i>GSH2</i> continua afectada por Hg en <i>A. thaliana</i> a pesar de la interacción con <i>Trichoderma spp.</i>	75
8.5 La expresión de <i>GSH2</i> y <i>GSH1</i> ocurre primero en las partes aéreas.....	77
8.6 La expresión de <i>GSH1</i> es sensible a Hg en comparación con <i>GSH2</i>	78
8.7 La expresión de <i>GSH1</i> y <i>GSH2</i> se asocia a la expresión de <i>PDF1.2</i>	79
8.8 <i>Trichoderma</i> induce la expresión de <i>GSH1</i> y <i>GSH2</i>	80
8.9 <i>Trichoderma</i> ; buen candidato como agente bioremediador	81
8.10 Probable efecto sinérgico de <i>Trichoderma</i> y Hg^{2+} incrementa los niveles endógenos de jasmonatos generando la resistencia a Hg^{2+}	88
IX. CONSIDERACIONES FINALES.....	93
X. CONCLUSIONES.....	98
XI. PERSPECTIVAS	100
XII. BIBLIOGRAFÍA	103
XIII. ABREVIATURAS, TÉRMINOS Y EQUIVALENCIAS	CXII
XIV. APÉNDICE	I
a. Anexo A Técnicas de Biología Molecular.....	I
b. Anexo B Medios de Cultivo.....	V
c. Anexo C resultados no mostrados.....	VI

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquematiza el segmento de una hifa septada, bajo un ambiente de estrés con clamidospora, para mostrar los mecanismos de biosorción y La bioacumulación de metales-----	22
Figura 6.1. Principales zonas mineras del Estado de Querétaro. -----	27
Figura 6.2. Arreglo de la placa de microtítulo que indica los pozos inoculados con las distintas cepas y la posterior aplicación de los diferentes tratamientos con HgCl ₂ . -----	33
Figura 6.3 Procedimiento para detectar la capacidad de de las cepas de <i>Trichoderma</i> para volatilizar el Hg ²⁺ . -----	33
Figura 6.4 Sistema para determinar cuantitativamente Hg ⁰ volátil por <i>Trichoderma</i> spp.-----	34
Figura 7.1 Curvas de crecimiento de 17 de las 20 cepas de <i>Trichoderma</i> aisladas del municipio de San Joaquín, Qro.. -----	42
Figura 7.2 Comparación del crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> en un medio sin HgCl ₂ y con 200 µg/ml de HgCl ₂ . -----	43
Figura 7.3 Comparativo del crecimiento radial de las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> en bajo 200 µg/ml de HgCl ₂ -----	43
Figura 7.4 Características macroscópicas de las cepas de <i>Trichoderma</i> -----	44
Figura 7.5 Estructuras microscópicas de <i>Trichoderma</i> spp-----	45
Figura 7.6 Identificación de especies de las cepas nativas de <i>Trichoderma</i> mediante el análisis del ITS.-----	45
Figura 7.7. Producción de compuestos indólicos por las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> spp., -----	46
Figura 7.8 Colonización de los tejidos de <i>A. thaliana</i> por <i>Trichoderma</i> spp.-----	47
Figura 7.9 Colonización de plantas de <i>Arabidopsis</i> por <i>Trichoderma</i> spp. (A)Se comparan los diámetros de las rosetas de <i>Arabidopsis thaliana</i> a los 14 días posteriores de la aplicación de los tratamientos con HgCl ₂ . . -----	53
Figura 7.10 Imagen comparativa a 14 días de haber aplicado distintos tratamientos de HgCl ₂ en <i>A. thaliana</i> tratadas con <i>Trichoderma</i> spp.-----	54
Figura 8.1 Procesos por los cuales <i>Trichoderma</i> spp. posiblemente han generado resistencia a metales pesados.. -----	85
Figura 8.2 Modelo que sugiere que <i>Trichoderma</i> spp. sensibiliza (priming) a <i>A. thaliana</i> a un posible estrés por Hg ²⁺ .-----	88
Figura C.3.1 Producción de compuestos indólicos por <i>Trichoderma</i> spp. . -----	VIII
Figura C.4.1 Efectos tóxicos bajo distintas concentraciones de HgCl ₂ , en condiciones <i>in vitro</i> . -----	X
Figura C.4.2 Crecimiento de plántulas bajo condiciones <i>in vitro</i> , -----	XI
Figura C.5.1 La inoculación con las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> disminuye la cianosis provocada por el HgCl ₂ en <i>Arabidopsis thaliana</i> .-----	XIII
Figura C.7.1 Experimento preliminar de la inducción de GSH1, GSH2, PDF1 y PR-1A en <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Trichoderma</i> spp., a 24 horas de haber aplicado el tratamiento con mercurio . -----	XVII

INDICE DE TABLAS

Tabla 6.1. Oligonucleótidos de <i>A. thliana</i> empleados para PCR semiacuantitativa y cuantitativa.....	39
Tabla 7.1 Clasificación de las cepas de <i>Trichoderma</i> y porcentajes de inhibición bajo 200µg de HgCl ₂	42
Tabla 7.2 Concentraciones de Hg acumulado en la biomasa de <i>Trichoderma</i> spp	50
Tabla 7.3 Porcentajes de colonización de <i>Trichoderma</i> spp., en <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
Tabla 7.4 Prueba cualitativa de volatilización de Hg en las distintas cepas de <i>Trichoderma</i> a 24 horas de exposición.....	49
Tabla 7.5 Prueba cuantitativa volatilización de Hg por <i>Trichoderma</i> spp en distintos tiempos.....	49
Tabla 7.6 Niveles de mercurio en tejido vegetal determinados por EAA.....	58
Tabla C.6.1 Concentraciones de Hg en tejido vegetal determinados por EAA	XIV
Tabla C.6.2 Concentraciones de Hg en tejido vegetal y micelio determinados por ICP	XVI

I. INTRODUCCIÓN

Las erupciones volcánicas, la desgasificación de la corteza terrestre, entre otros procesos geológicos, emiten bajas concentraciones de metales pesados entre ellos mercurio elemental (Hg^0), que es volátil e insoluble en agua. Estos vapores entran a la atmósfera distribuyéndose a sitios distantes de la emisión original. En la atmósfera el Hg^0 cambia su estado de oxidación (Hg^{2+}), y esta característica lo hace soluble en agua, por lo cual mediante la lluvia ácida regresa al suelo y cuerpos de agua. Por lo tanto es normal encontrar en la naturaleza Hg y que forme minerales, como el sulfuro de mercurio (HgS), comúnmente denominado cinabrio (Bradl, 2005).

Sin embargo, últimamente las actividades antropogénicas han incrementado los niveles de Hg (Reyes, 1999; Zalups y Koropatnick, 2000; Mendioroz, 2001; Zahir *et al.*, 2005; Selin, 2009; SEMARNAP, 2010; Trush, 2011; Skoog, *et al.*, 2000; Carrasquero y Adams, 2002; Puga, *et al.*, 2006) alterando su ciclo biogeoquímico, generando problemas al medio ambiente y en la salud humana debido a la tendencia del Hg^{2+} a biomagnificarse en las cadenas tróficas (Zahir *et al.*, 2005; Hussein, *et al.*, 2007). Por esta razón se han establecido normas que indican los límites permisibles de Hg en suelo y en los alimentos.

Los procesos celulares naturales como la fotosíntesis, el ataque por patógenos (Xiang y Oliver, 1998; Cobbett, 2000; Vivancos, *et al.*, (2010), el exceso de micronutrientes (Munzuroglu y Geckil 2008) o de metales pesados, generan estrés oxidativo en las células, lo cual se ve reflejado en un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuyos efectos resultan citotóxicos. No obstante todos los seres vivos han desarrollado mecanismos de detoxificación en los cuales interviene el glutatión (GSH), un tripéptido rico en cisteína con actividad antioxidante.

El GSH es precursor de péptidos denominados fitoquelatinas (PC, por sus siglas en inglés), los cuales forman un complejo con los metales pesados, y mediante transportadores (proteínas transmembranales vacuolares) del tipo ABC (ATP binding cassette) el complejo es acumulado al interior de la vacuola (Quig, 1998; Xiang y Oliver, 1998; Cobbett, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005; Zalups y Koropatnick, 2000; Raspanti *et al.*, 2009). La síntesis de dichos transportadores varía de organismo a

organismo, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* es sensible a metales pesados, probablemente debido que la síntesis de estos transportadores es baja en comparación con plantas hiperacumuladoras de metales como *Arabidopsis halleri* o *Brassica napus* (Huai *et al.*, 2006; Venkatachalam, *et al.*, 2009).

En las plantas, los niveles elevados de Hg^{2+} inhiben la síntesis de proteínas transportadoras de agua (acuaporinas) bloqueando su absorción e impidiendo la germinación de las semillas. Además aumenta la degradación de hormonas del crecimiento vegetal (oxidación de auxinas) y pigmentos fotosintéticos (Patra y Sharma, 2000; Jain, *et al.*, 2008; Munzuroğlu, 2008; Rai y Tripanthi, 2008; Zhu, 2005; Xu, *et al.*, 2010).

Por tal motivo, se han desarrollado diversas medidas de biorremediación de suelos, las cuales comprenden el uso de plantas (fitorremediación) y microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados, representando una alternativa viable para remover o reducir la biodisponibilidad de metales en suelos contaminados (Zawiercha y Malina, 2011). Sin embargo, la eficacia de estos depende de factores fisicoquímicos del suelo, siendo uno de ellos el pH (Krantz y Schnürer, 1993; Alexander, 1999; Kredics *et al.*, (2001; Tabak *et al.*, 2003; Tabak *et al.*, 2005), por ello se deben considerar y enfocar las investigaciones en microorganismos nativos para dichos fines, dado que se encuentran adaptados a las características edáficas del sitio (Zawiercha y Malina, 2011).

Los mecanismos mejor conocidos para eliminar o reducir los metales pesados de un entorno contaminado son: **1)** la biosorción, donde comúnmente se emplea la biomasa inactiva (Singh, 2006) explotando las características fisicoquímicas de su pared celular (Krantz *et al.*, (1995; Alexander, 1999; Gadd, 2001; Singh, 2006; Zaidi *et al.*, 2011), **2)** la bioacumulación, donde la célula es capaz de acumular los metales en el citoplasma (Quig, 1998; Gadd, 2001; Gutiérrez *et al.*, (2005; Raspanti *et al.*, (2009; Zaidi *et al.*, 2011) y **3)** la volatilización, la cual puede ocurrir por el cambio en el estado de oxidación o por la adición de grupos metilo.

Se tienen identificados y caracterizados los genes que integran el operón *mer* en bacterias que confieren resistencia a Hg^0 , Hg^{2+} , Hg^+ y CH_3Hg , siendo estos blanco de

numerosas investigaciones en el campo de la fitorremediación, al ser utilizados para la generación de plantas genéticamente modificadas (Yadav, 2010; Patra y Sharma 2000; Li *et al.*, (2006; Rug *et al.*, (1996; Bizily, *et al.*, (1999; Meagher, 2000; Rugh, 2001; Meagher y Heaton, 2005; Hussein *et al.*, (2007). Sin embargo, también se han identificado los genes de resistencia a metales pesados en hongos, insertándolos en las plantas. La finalidad de esto es mejorar la resistencia a metales pesados en las plantas para mejorar la fitorremediación (Ow, 1996; Mehra, 1997 *in* Gadd, 2001).

No obstante, los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son cosmopolitas y han sido aislados de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados (Harman *et al.*, 2004; Argumedo *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos de resistencia que estos presentan a metales pesados, siendo escasos los trabajos sobre fitorremediación empleando *Trichoderma* spp.

La tolerancia de *Trichoderma* a metales pesados es asociada a la síntesis de transportadores dependientes de ATP (ABC¹ por sus siglas en inglés) junto con el aumento en los niveles de GSH, fitoquelatinas (Harman *et al.*, 2004; Ruocco *et al.*, 2009) y su capacidad de adsorción de Hg²⁺ en su pared celular (Krantz y Schnürer, 1993). Otra característica importante de este género es que produce hormonas del crecimiento vegetal (Salas-Marina *et al.*, (2011) y facilita la absorción de nutrientes (Harman *et al.*, (2004), generando un óptimo desarrollo vegetal. También coloniza las raíces de las plantas encendiendo los sistemas de defensa vegetal, al inducir la biosíntesis de hormonas como etileno, jasmonatos y salicilatos (Harman *et al.*, (2004; Mukherjee *et al.*, (2008). Además, la colonización por *Trichoderma* spp. induce la expresión de genes (Bailey *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, (2008; Salas-Marina *et al.*, (2011), entre ellos *LOX-1* el cual codifica para la enzima lipoxigenasa (Soresh *et al.*, 2005), implicada en la biosíntesis de jasmonatos y cuya actividad está regulada por etileno (Martinez, *et al.*, (2001).

Los jasmonatos están implicados en la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) en las plantas, activando la transcripción del gen *PDF1.2* que codifica para proteínas denominadas defensinas (Heldt, 2005; Shores *et al.*, (2005). Por otro lado, *Trichoderma* spp., también incrementan la actividad enzimática de las quitinasas tanto

¹ ATP binding cassette

en raíces como en partes aéreas (Mukherjee *et al.*, (2008) e induce la biosíntesis de salicilatos que inducen la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) activando la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR, por sus siglas en inglés), siendo una de ellas codificada por el gen *PR-1a* (Lotan y Fluhr, 1990; Shores *et al.*, 2005).

Los jasmonatos son factores endógenos que inducen un aumento de la expresión de los genes de la vía del glutatión (*GSH1* y *GSH2*). Estos genes se expresan normalmente en la célula, pero son inducidos por metales pesados. La inducción de estos genes aumentan los niveles de GSH en las hojas, el cual es transportado a la raíz porque es el principal tejido donde se acumulan los metales pesados (Xiang y Oliver, 1999, 2001; Millán *et al.*, 2007; Ben Ammar, *et al.*, 2008). Por este motivo se ha sugerido que los jasmonatos son importantes para que las plantas desarrollen resistencia a metales pesados (DalCorso *et al.*, (2010), y posiblemente la respuesta sea potencializada por *Trichoderma*.

Lo anterior es importante ya que generalmente la RSA y la RSI son mutuamente antagónicas, Martínez *et al.*, (2001) reportaron que en plantas de melón (*Cucumis melo*) inoculadas con *T. longibrachiatum* se genera un sinergismo, causando la reducción de los síntomas provocados por fitopatógenos, efecto que podría ser similar en plantas bajo estrés por metales pesados, tomando en consideración que las plantas colonizadas por *Trichoderma* spp. incrementan la actividad quitinasa en los tejidos vegetales (Mukherjee *et al.*, 2008) y de acuerdo con Dana *et al.*, (2006) la expresión de genes de quitinasas de *Trichoderma* spp. en *Arabidopsis thaliana* reduce los síntomas causados por fitopatógenos y algunos metales pesados.

La inducción de la transcripción de *GSH1* y *GSH2* se ha observado bajo condiciones *in vitro* aplicando de manera independiente tratamientos de ácido jasmónico y metales como Cd y Cu (Xiang y Oliver, 1999). Sin embargo, a pesar que se ha reportado la resistencia a metales pesados, principalmente a Hg⁰, en **1**) plantas transgénicas con el operón *mer* (Hussein *et al.*, 2007), **2**) plantas sobreexpresantes de genes de quitinasas de *Trichoderma* sp. (Dana *et al.*, 2006) y en **3**) plantas sobreexpresantes de *GSH1* y *GSH2* procedentes de otros organismos (Sarowar *et al.*, 2005; Yadav, 2010), no se ha reportado la inducción de *GSH1* y *GSH2* bajo un modelo de

interacción planta-microorganismo en plantas bajo condiciones de estrés por metales pesados.

El presente trabajo es la primera investigación que reporta mediante RT-PCR semicuantitativa la inducción de los genes *GSH1* y *GSH2* así como los niveles de Hg^{2+} (mg/g^{-1}) en raíces y partes aéreas de *Arabidopsis thaliana* bajo la interacción con cepas de *Trichoderma* spp. resistentes a mercurio y en condiciones de estrés por HgCl_2 .

Por ello, el objetivo de la investigación fue caracterizar cepas *Trichoderma* aisladas de suelos contaminados con mercurio para efectuar ensayos de interacción planta-microorganismo en invernadero. Además, con los resultados obtenidos se generó un modelo que explica un posible sinergismo entre *Trichoderma* sp. y el Hg^{2+} que induce un incremento de la expresión de *LOX-1* generando que los niveles endógenos de jasmonatos se incrementen, reflejándose en un aumento de la expresión de *GSH1* y *GSH2* lo que permite que las plantas sean resistentes a Hg^{2+} por un incremento en los niveles de GSH. El incremento de los niveles de GSH podría explicar que las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. y bajo condiciones de estrés incrementen el diámetro de las rosetas y el porcentaje de inflorescencias a diferencia de las plantas no inoculadas con *Trichoderma* spp.

II. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación por metales: el mercurio y la problemática ambiental

Los metales pesados presentan una densidad superior a 5g/cm^3 , algunos metales pesados no son esenciales para la vida, en bajas concentraciones alteran procesos metabólicos pero en altas concentraciones son letales (Bradl, 2005).

La corteza terrestre contiene en promedio 50 partes por billón (ppb) de Hg, principalmente como HgS (Bradl, 2005), además es liberado a la naturaleza por erupciones volcánicas y otras actividades geotermales en su forma elemental (Hg^0). El Hg^0 entra a la circulación atmosférica, el promedio global de la concentración de Hg^0 en el aire es de 1.6 ng/m^3 y su tiempo de vida media es de 6 a 12 meses en la atmosfera (Selin, 2009). En suelos, los niveles naturales de Hg^{2+} alcanzan en promedio entre 69 y 160 ppb (Bradl, 2005), no obstante Selin (2009) indicó que la concentración de éste se encuentra entre 20 y 70 ng/g^{-1} (ppb). El rango en los niveles de Hg^{2+} depende del contenido de éste en la roca madre y otros minerales que dan origen a los suelos (Bradl, 2005), sin embargo la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 establece que los niveles de Hg en suelos para uso residencial o agrícola deben ser menores a 23 ppm (23000ppb) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que los niveles permisibles de Hg en los alimentos deben ser menores a 0.5ppm (500ppb).

El Hg comúnmente se asocia con el azufre (S) formando sulfuro de mercurio (HgS), un mineral de color rojizo denominado comúnmente “cinabrio” (**Figura 1.1 B**) que contiene 86.2% de Hg (Bradl, 2005). Por sus características, causó un interés religioso que justificaba su extracción y comercialización, motivo por el cual se explotaba de manera artesanal durante la época prehispánica. Sin embargo, en la época de la colonia, los españoles continuaron con la explotación masiva buscando mejorar las técnicas de extracción, dado que el Hg^0 era empleado para eficientizar la extracción de oro y plata por su capacidad de formar amalgamas con otros metales (Carrasquero y Adams, 2002; Muñoz, 2011; Vega, 2011). Estas fueron las primeras actividades antropogénicas de la historia que generaron contaminación del ambiente por mercurio.

No obstante, actualmente las actividades antropogénicas han incrementado considerablemente los niveles de Hg^0 en el ambiente (Skoog, *et al.*, 2000; Mendioroz, 2001; Turpeinen, 2002; Carrasquero y Adams, 2002; Puga, *et al.*, 2006), tan solo en 1970 la producción de Hg^0 alcanzó las 3712 toneladas (Secretaría de Economía, 2010).



Figura 1.1 En (A) se muestra el mercurio metálico (Hg^0), tomada de <http://www.dmartz77.org/2012/01/el-mercurio-contamina.html>. En (B) se muestra el Hg^0 en su forma mineral asociado con azufre sulfuro de mercurio (HgS) o comúnmente denominado cinabrio, tomada de <http://ampliacionbg441.blogspot.com/2009/12/cinabrio.html>.

Ejemplo de ello se da en la industria aurífera que utiliza Hg^0 para generar amalgamas que al calentarlas recuperan el oro y liberan vapores de Hg , los cuales se incorporan a la atmósfera. Entre el 70% y el 80% de Hg total en la atmósfera proviene de la quema de combustibles fósiles, la incineración de desechos, entre otras actividades antropogénicas (Carrasquero y Adams 2002; Bradl, 2005; Ávila, 2008; Carta geológica-minera San Joaquín; Enciclopedia de los municipios de México Querétaro; Muñoz, 2011; Vega, 2011).

El Hg^0 en la atmósfera es oxidado (Hg^{2+}) disolviéndose en las gotas de agua, regresando al suelo y cuerpos de agua mediante la lluvia. Por acción de microorganismos anaerobios acuáticos y algunos hongos filamentosos del suelo, el Hg^{2+} es transformado a compuestos orgánicos tales como el metil mercurio (CH_3Hg) y acetato de fenil mercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgO}_2$), también hay microorganismos que se encargan de romper estos compuestos orgánicos mediante enzimas específicas liberándolo nuevamente a la atmósfera en Hg^0 , de este modo continúa su ciclo biogeoquímico.

Los compuestos orgánicos de Hg (CH_3Hg) presentan una elevada tasa de absorción en los seres vivos del 90% frente al 2% del Hg^0 y Hg^{2+} (SEMARNAP, 2010), debido

que los compuestos organomercuriales son liposolubles y presentan afinidad por los grupos sulfhidrilo de la proteínas (Selin, 2009). Esta característica provoca la tendencia a biomagnificarse en las cadenas tróficas (Skoog *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, (2005; Zahir *et al.*, 2005; Hussein, *et al.*, (2007) causando serios problemas a los seres vivos.

Se han reportado dos casos importantes de intoxicación por Hg en poblaciones humanas, el primero de ellos sucedió en Minamata, Japón (1950) por el consumo de pescado contaminado con CH₃Hg, y en Iraq (1970) por el consumo de pan elaborado con granos de trigo tratados con cloruro de mercurio (HgCl₂) como fungicida (Selin, 2009; SEMARNAP, 2010; Trush, 2011).

En mamíferos, el Hg⁰ provoca daños en las vías respiratorias y sus especies orgánicas afecta el sistema nervioso central, hígado, sistema inmunológico, corazón, riñón pudiendo causar ceguera, sordera y bajas tasas de fertilidad (Reyes, 1999; Zalups y Koropatnick, 2000; Mendioroz, 2001; Zahir *et al.*, 2005). Mientras que en plantas genera degradación de pigmentos e inhibe la síntesis de clorofilas reduciendo la actividad fotosintética, inhibe o aletarga el crecimiento debido que incrementa degradación de fitohormonas involucradas en el crecimiento, inhibe la síntesis de acuaporinas que conlleva a un retardo o inhibición de la germinación (Patra y Sharma, 2000; Bradl, 2005; Zhu, 2005; Jain, *et al.*, 2008; Munzuroğlu, 2008; Rai y Tripanthi, 2008; Xu, *et al.*, 2010).

No obstante, a pesar de su toxicidad el Hg se encuentra en la naturaleza, motivo por el cual los seres vivos han desarrollado mecanismos para disminuir los efectos tóxicos de los metales pesados, pero antes de detallarlos se explicara como entra a los tejidos vegetales debido que el tema principal del trabajo es la fitorremediación.

2.2 Mecanismos de entrada de los metales pesados en las plantas

En los sistemas biológicos algunos metales tales como calcio (Ca), cobalto (Co), cromo (Cr), molibdeno (Mo), cobre (Cu), hierro (Fe), potasio (K), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn) (Munzuroglu y Geckil, 2002; Zaidi *et al.*, 2011)

son importantes ya que son utilizados como cofactores enzimáticos, es decir, que son necesarios para el funcionamiento de determinadas enzimas. Estos son transportados al interior de las plantas mediante proteínas transportadoras presentes en la membrana. Una vez dentro, se translocan de las raíces a la parte aérea por el xilema.

Algunos metales son importantes en la nutrición vegetal, siendo algunos de estos requeridos en mayor proporción (macronutrientes) que otros (micronutrientes) debiendo haber un balance y cuya carencia generaría deficiencias que harían a la planta vulnerable a factores bióticos y abióticos. Sin embargo, el exceso de micronutrientes origina un daño a la planta que desencadenaría una respuesta de estrés generando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), misma respuesta que se desencadena cuando la planta se encuentra en contacto con metales pesados (Gadd *et al.*, (2001; Navarro *et al.*, (2007; Yadav, 2010; Zaidi *et al.*, (2011) como el cadmio (Cd) o mercurio (Hg^{2+}).

Los metales pesados al generar ROS, entre estos el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) el cual es altamente reactivo, dañando los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos de las membranas celulares (Murray, 2005; , 2007; Tamás *et al.*, 2009). Los radicales OH^{\cdot} se generan a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por una reacción no enzimática; la reacción de Fenton (Heinderich *et al.*, 2001), la cual es catalizada por iones metálicos, en este caso el Hg^{2+} . No obstante, los efectos citotóxicos de las ROS son aliviados con glutatión (GSH).

2.3 El glutatión y el proceso de detoxificación

Las plantas, animales y hongos ante condiciones de estrés ocasionados por factores bióticos o abióticos aumentan la síntesis GSH, un tripéptido conformado por glutamato, cisteína y glicina ($[\gamma\text{-glutamil cisteína}]_n\text{-glicina}$) cuya síntesis depende de dos enzimas, la γ -glutamilcisteinil ligasa (codificada por el gen *GSH1* que cataliza la unión de glutamato y cisteína formando γ -glutamil cisteína) y la glutatión-sintetasa (codificada por el gen *GSH2*, une glicina al γ -glutamil cisteína).

El GSH es de gran importancia para la sobrevivencia, debido que es capaz de conjugarse con los xenobióticos por medio de la glutatión-S-transferasa (GST) disminuyendo la toxicidad de diversos contaminantes orgánicos incluyendo insecticidas y herbicidas. Además, el GSH es precursor de péptidos especializados denominadas fitoquelatinas, que acumulan metales pesados, pero también presentan actividad antioxidante, degradando las especies reactivas de oxígeno generadas durante diversos procesos biológicos como la proliferación celular, el crecimiento, la floración, fotosíntesis o ante el ataque de patógenos (Xiang y Oliver, 1998; Xiang y Oliver, 2001; Cobbett, 2000; Zalups y Koropatnick, 2000; Koornneff, *et al.*, 2008; Vivancos *et al.*, 2010).

Los metales pesados inducen la síntesis de fitoquelatinas, las cuales interactúan con éstos formando un complejo que es transportado al interior de la vacuola por proteínas transmembranales del tipo ABC (ATP binding cassette) y cuyo transporte requiere de energía. La expresión de estos transportadores es mayor en plantas hiperacumuladoras de metales pesados como *Arabidopsis halleri*, *Brassica napus* y *Thlaspi* spp., a diferencia de *A. thaliana* que es susceptible a metales pesados (Huai *et al.*, 2006; Venkatachalam, *et al.*, (2009).

En relación a los tejidos vegetales, los metales pesados se acumulan principalmente en las raíces, donde se reportan niveles elevados de fitoquelatinas en comparación con las hojas (Xiang y Oliver, 1998; Cobbett, 2000, Cobbett y Goldbrough, 2002; Foyer y Noctor, 2002; Schröder, 2002; Rauser, 2002; Inouche, 2005).

Ben Ammar *et al.*, (2008) indican que la síntesis de fitoquelatinas en las raíces está acoplada a la disminución de GSH en las hojas. Lo anterior coincide con los estudios efectuados en Almadén, España por Millán *et al.*, (2007), indicando que los metales pesados se acumulan principalmente en la raíz. No obstante, reportan que la translocación a los órganos aéreos está en función de los niveles de metales y el estadio de maduración de la planta. En el caso del mercurio, tanto en sus formas elemental (Hg^0) y Hg^{2+} , junto con los arsenatos (AsO_4^{-3}) presentan gran movilidad por el xilema a diferencia de otros metales (Fitter y Hay, 2002; Meagher y Heaton, 2005).

Sin embargo, como ya se menciona el glutatión también actúa como antioxidante, normalmente los niveles de GSH son bajos debido a los procesos oxidativos que ocurren normalmente en la célula, disminuyendo los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno generadas durante el ciclo celular y la fotosíntesis para evitar el daño del DNA y de las membranas celulares por lipoperoxidación.

Dado que el GSH es un agente reductor, éste se oxida a disulfuro de glutatión (GSSG) siendo el grupo sulfhidrilo de la cisteína el que brinda la capacidad donadora de electrones. Posteriormente, por acción de la enzima glutatión reductasa (GR), el GSSG es nuevamente reducido a GSH, manteniendo así la homeostasis del GSH bajo condiciones normales. Por estos motivos, el GSH es empleado como marcador de los niveles de estrés oxidativo en los seres vivos, y se ha demostrado que su carencia resulta letal (Vivancos *et al.*, 2010).

Es conocido que los metales pesados inducen estrés oxidativo en las plantas causando el aumento de los niveles de GSH (Xiang y Oliver, 1998; Foyer y Noctor, 2002; Waldemar, 2007), dado que se incrementa la expresión de los genes que codifican las enzimas que lo sintetizan (*GSH1*, *GSH2*), glutatión reductasa (*GR1*, *GR2*), glutatión-S-transferasa (*GST*) y las fitoquelatinas (*CAD1*, *CAD2*).

Vivancos *et al.*, (2010) reportan que plantas knockout (KO) de *Arabidopsis thaliana* para *GSH1* resulta letal inhibiendo el desarrollo del embrión, mientras que las plantas KO para *GSH2* resulta letal en el estadio adulto (Wachter *et al.*, 2005). La expresión de ambos genes es inducida equitativamente en todos los tejidos vegetales de plántulas modificando su patrón de expresión cuando éstas maduran, encontrando que la cantidad de transcrito varía en cada tejido (Xiang y Oliver, 2001).

Esto nos indica que la translocación a los diferentes tejidos está en función de las necesidades fisiológicas de cada órgano, sobre todos cuando las plantas se desarrollan en sitios con metales pesados, además el GSH presenta distintos niveles regulación, que a continuación se describen.

2.3.1 Mecanismos de regulación de los genes de la vía del glutatión

La expresión de *GSH1* y *GSH2*, se encuentra regulada bajo distintos mecanismos, uno de ellos es el **transcripcional**, en el cual las fitohormonas involucradas en la protección vegetal y los metales pesados aumentan 10 veces la expresión de *GSH1* mientras que las especies reactivas de oxígeno los inducen escasamente (Xiang y Oliver, 1999; 2001). Sin embargo los niveles de GSH no siempre se encuentran asociados a una alta expresión de los genes, esto se debe a una regulación **postraducciona**, y depende del factor que los haya inducido. La aplicación de ácido jasmónico (JA) aumenta la expresión de *GSH1* sin alterar los niveles de GSH. En cambio, cuando la inducción es efectuada por metales, especies reactivas de oxígeno o ácido salicílico (SA) los niveles de GSH aumentan considerablemente (Xiang y Oliver, 2001; Vivancos *et al.*, 2010). Pero cuando los niveles de GSH son demasiado elevados éste inhibe a la enzima γ -glutamilcisteinil ligasa por **retroalimentación negativa** (Xiang y Oliver, 2001), sin alterar la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Vivancos *et al.*, 2010). Sin embargo, en condiciones normales, los niveles de GSH se mantienen por la glutatión reductasa (Xiang y Oliver 1998, 2001; Koornneef *et al.*, (2008).

Finalmente, otro mecanismo de regulación es la **disponibilidad de sustrato** para su síntesis, dado que la cisteína es un componente estructural del GSH, la aplicación de azufre genera el aumento de la concentración de cisteína en hojas, incrementando la expresión de *GSH1* y *GSH2*. En presencia de patógenos el patrón de expresión de ambos genes varía, debido que *GSH1* intensifica su expresión, mientras que *GSH2* se mantiene sin cambios (Höller, *et al.*, 2010). Este hecho indica que existe una relación entre la vía del glutatión y las vías relacionadas con la respuesta sistémica en las plantas ante el ataque de microorganismos patógenos, la cual se describe a continuación.

2.4 El rol de las fitohormonas en la inducción de genes de la vía del glutatión

No solo los metales pesados inducen la expresión de los genes de la vía del glutatión, sino también las fitohormonas como el ácido jasmónico y ácido salicílico (Xiang y Oliver, 1998), las cuales están involucradas en la resistencia sistémica inducida (RSI) y resistencia sistémica adquirida (RSA) respectivamente, para combatir el ataque de patógenos. Estas vías, se describen brevemente a continuación.

2.4.1 Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)

Los fitopatógenos biotrofos desencadenan una respuesta hipersensible que conlleva la lignificación, producción de compuestos fenólicos, especies reactivas de oxígeno e inducen la biosíntesis de ácido salicílico (SA) cuya función es impedir la dispersión sistémica del patógeno y desarrollar la RSA.

Debido que el SA se moviliza sistémicamente, es el inductor de la expresión de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) en órganos distantes a la infección para sensibilizar a la planta y prepararla ante el ataque de patógenos. Se conocen 14 familias de proteínas PR, y la actividad bioquímica de algunas de ellas han caracterizadas. Por ejemplo, **1)** PR-1a presenta actividad quitinasa que disminuye la toxicidad del HgCl₂ y CdCl₂ en *Nicotiana tabacum* (Sarowar *et al.*, 2005) e incrementa la expresión del gen de la glutatión S-transferasa (GST) involucrado en la detoxificación de xenobióticos, **2)** PR-2 de β -1-3-glucanasa, **3)** PR-3, 4, 11, q de quitinasas, **4)** PR-5 de proteínas parecidas a la taumatina, **5)** PR-6 son inhibidores de proteínasa, **6)** PR-7 presentan actividad de proteasas, **7)** PR-8 de quitinasas con actividad de lisozima y **8)** PR-9 de peroxidasa (Sarowar *et al.*, 2005; Soresh *et al.*, 2005; Gallou *et al.*, 2009).

Todas las proteínas PR son inducidas por SA, a excepción de *PR8* que es inducida por jasmonatos (Shoresh, *et al.*, 2005). Lothan y Fluhr (1990) reportaron que el etileno juega un papel importante en la regulación de la síntesis de las proteínas PR ya que

potencializa la transducción de la señal del SA al núcleo para activar los genes de las proteínas PR (León *et al.*, 2010).

Esto es importante ya que se ha reportado que el aumento de SA eleva los niveles de GSH aliviando el estrés oxidativo generado por el Hg^{2+} (Zhou, *et al.*, 2009; Vivancos, *et al.*, (2010), a pesar de que Xiang y Oliver (1999) reportaron que esta hormona disminuye la expresión de *GSH1* y *GSH2* en comparación en comparación con ácido jasmónico (JA) que incrementa la expresión de ambos genes, pero manteniendo basales los niveles de GSH.

Debido que el SA incrementa los niveles de GSH, se ha reportado que el GSH modula el efecto antagónico entre SA y JA. Es decir, que si se bloqueara la síntesis de GSH, el efecto antagónico del SA sobre JA desaparece induciéndose una u otra vía (Koorneef *et al.*, (2008; Vivancos *et al.*, (2010; Noctor y Foyer *et al.*, 2011).

2.4.2 Resistencia Sistémica Inducida (RSI)

A diferencia de la RSA, la RSI es encendida por rizobacterias, daño por insectos y herbívoros pero también por fitopatógenos necrotrofos, y algunos hongos benéficos, entre ellos *Trichoderma* spp., que colonizan la raíz e inducen las vías del ácido jasmónico (JA) y etileno. Estas fitohormonas regulan la expresión del gen involucrado en la síntesis de proteínas ricas en cisteína denominadas defensinas de plantas PDF1.2 (*PDF1.2*) (Harman *et al.*, (2004; Benítez, 2005; Shores *et al.*, 2005; Camarena y de la Torre, 2007; Van der Ent, *et al.*, 2009). Además las xilanasas secretadas por *Trichoderma viride* y metales como Cd, Cu, Zn y Fe inducen la síntesis de la enzima ACC sintasa en *Nicotiana tabacum*, cuyo producto es el ácido 1-amino-ciclopropano-1- carboxilo (ACC), precursor del etileno (Shores *et al.*, 2005). Cuando se aplica el ACC de manera exógena en plantas de *Arabidopsis thaliana* la expresión del gen *PDF1.2* aumenta considerablemente (Avni *et al.*, 1994; Waldemar, 2007; León *et al.*, (2010).

Como se ha visto los microorganismos desempeñan un papel importante al inducir la biosíntesis de fitohormonas que activan y regulan varios procesos fisiológicos, entre ellos los mecanismo de resistencia sistémica (Verhagen *et al.*, 2010).

Por ejemplo cepas patógenas del hongo *Fusarium oxysporium* causan el marchitamiento vascular en *Solanum lycopersicum* (jitomate) porque inhiben la RSI, bloqueando la acción del ácido jasmónico, por su parte la bacteria *Pseudomonas syringae* aumenta la biosíntesis de ácido abscisico (ABA) y produce coronatina² reprimiendo la síntesis de SA e insensibilizando a la planta de JA, por lo que reprime ambas vías (Wasternack, 2006). El hongo *Piriformospora indica* modula la inducción del etileno en *Arabidopsis*, mientras que en tomate suprime su inducción. Como ya se ha mencionado el hongo del género *Trichoderma* es capaz de inducir la síntesis de precursores de etileno (ACC), jasmonatos y también salicilatos induciendo un sinergismo entre la RSI y la RSA al expresarse los genes de ambas vías, y que a continuación se describen.

2.4.3 Inducción de RSA y RSI por *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* son cosmopolitas, encontrándolas en todo tipo de ambientes, incluso en suelos contaminados con hidrocarburos, colorantes, explosivos, fungicidas, compuestos organofosforados y cianuro a los cuales los hongos son resistentes, debido que expresan los genes que codifican los transportadores ABC y de la glutatión-S transferasa (*gst*) (Heiss *et al.*, (2003; Vullo, 2003; Harman *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, (2008; Argumedo *et al.*, (2009; Raspanti *et al.*, 2009; Ruocco *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han aislados de suelos contaminados con metales pesados, a lo cual los hongos expresan genes de la vía de síntesis de GSH, fitoquelatinas y metalotioneinas (Gadd, 2001; Cobbett, 2000; Cobbett y Golsbrough, 2002) para aliviar el estrés oxidativo generado por éstos y acumularlos en su citoplasma para aminorar los efectos tóxicos de los metales.

² La coronatina es un factor de virulencia permitiendo altas tasa de colonización de *P. syringae*, análogo estructuralmente del JA que induce la síntesis de JA, pero compite por los receptores de esta hormona bloqueando la RSI.

Además, son organismos micoparásitos que presentan gran versatilidad, por lo que son empleadas en el biocontrol de fitopatógenos. También secretan una gran variedad de metabolitos secundarios con efecto fungicida o fungistático. Además estimulan el crecimiento vegetal al inducir la producción de compuestos indólicos como el ácido indol acético y otras fitohormonas implicadas en la resistencia sistémica adquirida (RSA) e inducida (RSI) (Harman *et al.*, (2004).

Los hongos del género *Trichoderma* spp., interactúan con las plantas penetrando las primeras capas de sus raíces, sin embargo hay cepas endófitas³ (Harman *et al.*, 2004). Varios estudios han indicado que la colonización de *Trichoderma* en *Arabidopsis thaliana* inducen ambos tipos de resistencia sistémica, ya que éste induce los genes involucrados en la biosíntesis de las moléculas inductoras de cada vía. En el caso de la RSI, las celulasas (Martinez, *et al.*, (2001) secretadas por *Trichoderma* inducen la expresión de ACC sintasa⁴ y el gen *LOX-1* (Shoresh *et al.*, (2005), que codifica para una lipoxigenasa, que cataliza la lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados y finalmente por β -oxidación se forma el ácido jasmónico (Heldt, 2005). La actividad de la lipoxigenasa se encuentra regulada por los niveles de etileno⁵, ya que estos al ser bajos disminuyen la producción de JA (Martinez, *et al.*, 2001).

En lo que se refiere a la RSA, es necesaria la síntesis de la enzima fenil amonio liasa (PAL) para generar los precursores para la síntesis de SA (Gallou *et al.*, 2009). Shoresh *et al.*, (2005) indican que plantas inoculadas con *T. asperellum* y plantas tratadas con xylanases de *Trichoderma* spp., inducen una mayor actividad de la PAL, que su vez coincide con un aumento en los niveles de SA en las plantas, esto indica que la RSA es inducida por *Trichoderma*.

Varios autores han reportado que ambas vías son antagónicas, debido que el SA inhibe la síntesis de JA, sin embargo bajo ciertas condiciones, como por ejemplo la

³ Los hongos endófitos se dispersan en todos los tejidos vegetales, es decir que viven al interior de la planta

⁴ Convierte el S-adenosil-L-metionina en ácido 1-amino-ciclopropano-1 carboxílico (ACC) que es el precursor en la síntesis de etileno

interacción con ciertos microorganismos, puede haber un sinergismo entre ambas vías dependiendo de las moléculas efectoras y factores transcripcionales que estén presentes en el medio (Spoel *et al.*, 2003; Pieterse y Koornneef, 2008; Van der Ent, *et al.*, 2009; Rangel, *et al.*, 2010).

Recientemente se ha reportado que cuando los niveles de JA y SA son bajos, tanto la RSI como la RSA son activadas, habiendo expresión de los genes *PDF1.2* y *PR-1a*, sin embargo, cuando el nivel de SA es mayor que el de JA, se inhibe la expresión de *PDF1.2* reprimiéndose la RSI (León *et al.*, (2010) por mecanismos redox, en el cual está implicado el GSH (Koornneef *et al.*, 2008; Vivancos *et al.*, 2010). Este efecto sinérgico se encuentra modulado principalmente por el etileno que contrarresta el efecto del SA sobre el JA, lo que le da un papel de modulador de ambas vías, regulando la expresión de la enzima PAL encargada en la síntesis de los precursores de SA (Soresh *et al.*, 2005) que a su vez modula los niveles de GSH (Koornneef *et al.*, 2008; Vivancos *et al.*, 2010) y activa la RSI (Kato *et al.*, (2000; Shoresh *et al.*, (2005). Es decir un inductor de la RSI es capaz de inducir la síntesis de SA que se relaciona con la RSA.

El orden en el cual se inducen ambas vías es de gran importancia para que tanto RSI como la RSA sean sinérgicas. Primeramente debe prenderse la RSI y luego la RSA, debido que el SA induce la expresión de un represor que se une a la caja GCC de la región promotora de *PDF1.2* impidiendo la unión del activador transcripcional ORA59 bloqueando la transcripción. Este factor transcripcional es inducido por el JA y etileno, y para que se desarrolle el efecto sinérgico deben actuar en conjunto, de otra forma la RSI quedaría inhibida por el efecto del SA (León *et al.*, 2010).

Con esto queda claro que existe un efecto sinérgico entre ambas vías bajo ciertas condiciones dependiendo de los factores ambientales (Harman *et al.*, 2004), debido que los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inducción de la RSA y RSI es importante. Por un lado los jasmonatos incrementan la expresión de los genes implicados en la vía de síntesis del glutatión (Xiang y Oliver, 1998) mientras que los salicilatos actúan disminuyendo los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (Zhou *et al.*, 2009), generadas por los metales pesados.

Además el estudio de Martínez *et al* (2001) indica que en plantas de melón (*Cucumis melo*) bajo la interacción con *Trichoderma longibrachiatum* se induce tanto RSI y RSA, registrando un mayor índice de resistencia a *Sphaeroteca fulginea*, lo que podría indicar que la inducción de ambas vías de resistencia sistémica también podrían disminuir los efectos tóxicos causados por metales pesados o generar una resistencia a éstos, justificándose con los reportes de Xiang y Oliver (1998) que indican que los inductores de la RSI y la RSA (jasmonatos y salicilatos, respectivamente), inducen la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *Arabidopsis thaliana*.

Una vez detallado el mecanismo del GSH para aliviar el estrés oxidativo y las moléculas que inducen su síntesis, hay que tomar en cuenta que en los últimos años los niveles de contaminantes en el suelo han aumentado considerablemente. Por estas razones es importante tomar medidas para reducir, retener o transformar el mercurio presente en los ecosistemas empleando tecnologías de remediación ambiental. Algunas medidas emplean métodos físicos y químicos para remediar suelos contaminados. Mientras que otros se basan en los mecanismos naturales que presentan algunos organismos para limpiar los suelos, a esto se denomina biorremediación.

2.5 Medidas de remediación

La contaminación genera una gran problemática ambiental repercutiendo en la salud del hombre, motivo por el cual se han desarrollado técnicas fisicoquímicas para reducir o eliminar las concentraciones de varios contaminantes, tales como la electroremediación y el lavado de los suelos, sin embargo son poco accesibles debido a los altos costos (Volke *et al*, 2005; Tabak *et al*, 2005) y que algunas de ellas generan contaminación secundaria siendo necesarios tratamientos adicionales (Liang *et al.*, 2009 in Zawiercha y Malina, 2011). Una alternativa viable es la bioremediación, que cuenta con dos vertientes: la fitorremediación y la aplicación de microorganismos.

La fitorremediación emplea plantas hiperacumuladoras, de condición silvestre o transgénicas, resistentes o tolerantes a metales pesados almacenándolos en sus

tejidos, disminuyendo de esta manera la biodisponibilidad en el suelo. Por otro lado ciertos microorganismos son capaces de biodegradar moléculas de compuestos orgánicos o bioacumular metales pesados (Zawiercha y Malina, 2011). Además, algunos son capaces de inducir el crecimiento vegetal y al ser resistentes a gran cantidad de contaminantes (Argumedo *et al.*, 2009), debido que para limpiar superficies grandes de contaminantes se requiere de plantas que generen la biomasa suficiente para acumular los metales (Hussein *et al.*, 2007).

Ambas medidas de biorremediación son eficaces en la destoxificación de ambientes contaminados con hidrocarburos y metales pesados (Zawiercha y Malina, 2011). Sin embargo, es necesario conocer el ciclo biogeoquímico del contaminante así como las características fisicoquímicas y edáficas del sitio para determinar la acción a desarrollar, debido que los organismos presentan un umbral para su actividad bioremediadora (Krantz y Schnürer, 1993; Kredics *et al.*, (2001; Tabak *et al.*, 2003; Tabak *et al.*, (2005; Zawiercha y Malina, 2011). Es decir, sería preciso emplear microorganismos nativos cuando las condiciones ambientales no permitieran el desarrollo de las plantas hiperacumuladoras o utilizarlas cuando las características del suelo no permitieran el desarrollo de los microorganismos o interfieran con los procesos de éstos para remediar el ambiente. Sin embargo, los metales pesados y metaloides difícilmente son transformados por procesos microbianos, por ello éstos emplean otros mecanismos tales como la **biosorción**, **bioacumulación** y la **biotransformación**, esta última ya sea por reducción o metilación generando su volatilización (Alexander, 1999).

Los tres procesos han sido bien definidos en procariotas con la identificación del operón *mer*, que integra 6 genes; *merR* y *merD* que son reguladores, *merP* y *merT* que codifican para proteínas transportadoras de Hg, *merA* que codifica una reductasa que reduce de Hg^{2+} a Hg^0 y el *merB* que codifica para una organomercurial lyasa que rompe las moléculas organomercuriales como el metil mercurio (CH_3Hg) (Tabak *et al.*, (2005).

Con los genes *merA* y *merB* se han generado plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, mostrando una gran resistencia a elevados niveles de

Hg^0 , Hg^{2+} , CH_3Hg y $\text{C}_8\text{H}_8\text{HgO}_2$ que resultarían letales para los genotipos silvestres, es importante indicar que dichos estudios se han efectuado bajo condiciones *in vitro* (Rug *et al.*, (1996; Bizily, *et al.*, (1999; Patra y Sharma, 2000; Meagher, 2000; Rugh, 2001; Meagher y Heaton, 2005; Hussein *et al.*, (2007) y aun falta evaluar bajo condiciones *in vivo*. Es importante hacer hincapié en esto porque su comportamiento podría ser distinto a lo que se observa bajo condiciones de laboratorio.

No obstante, en hongos se han reportado algunos hongos filamentosos capaces de detoxificar ambientes contaminados con metales pesados mediante biosorción o bioacumulación (**Figura 2.1**), siendo estos mecanismos los más estudiados y empleados en comparación con la transformación de los metales. Sin embargo, unos cuantos hongos presentan mecanismos de biotransformación. A continuación se describen brevemente los tres mecanismos:

1) Biotransformación: Se tiene conocimiento que algunas levaduras como *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* metilan Hg^{2+} generando su volatilización mientras que en hongos filamentosos se ha reportado la biotransformación de distintos metales causando su volatilización, por ejemplo *Alternaria alternata* metila Se, *Fusarium* spp. reducen el telurito (TeO_3^{2-}) a Te^0 , mientras que *Fusarium oxysporium*, *Gliocladium roseum*, *Penicillium* spp. y *Candida humicola* metilan el As, selenitos (SeO_3^{2-}) y selenatos (SeO_4^{2-}) (Gadd, 2001; Sing, 2006).

2) Biosorción: Ocurre cuando los contaminantes se adsorben a la pared celular, este proceso no es metabólicamente activo al no utilizar ATP debido a la atracción electrostática entre los metales pesados que poseen carga positiva y la pared celular o polímeros sintetizados y excretados por el microorganismo que presentan carga negativa (Alexander, 1999; Gadd, 2001; Singh, 2006). Por lo tanto mediante este proceso se puede remediar ambientes contaminados con altas concentraciones de metales pesados, aunque inhiban o disminuyan la actividad metabólica de los microorganismos, ya que para estos fines generalmente se ocupa la biomasa inactivada por calor.

Por ejemplo se ha reportado que el micelio vivo de *Funolia trogii* y *Phanerochaete chrysosporium* remueven respectivamente 333.0mg/g y 66mg/g de Hg²⁺, mientras que la biomasa muerta remueve concentraciones mayores, 403.2mg/g y 112.0mg/g Hg(II), respectivamente (Sinhg, 2006).

El pH es uno de los factores fisicoquímicos del suelo que afectan la biosorción y varía dependiendo del microorganismo. Las plantas generalmente acidifican los suelos al secretar metabolitos y ácidos orgánicos que sirven de estímulo para que los microorganismos de la rizósfera las colonicen los tejidos vegetales (Meagher y Heaton, 2005). El pH básico incrementa la biosorción de metales en la bacteria *Bacillus subtilis* *B. megaterium* y *Desulfovibrio desulfuricans* (Bizily *et al.*, 1998; Alexander, 1999; Gadd, 2001) pero en hongos del género *Trichoderma* es necesario un pH ácido (Krantz y Schnürer, 1993). Sin embargo, respecto a los hongos dicha capacidad depende del microorganismo y del metal, por ejemplo la biosorción de Cr, Ni, Zn y Pb por *Penicillium chrysogenum* es inhibida en pH inferiores a 3 y por debajo de 4 disminuye la biosorción de Cd, pero la biosorción de todos éstos incrementa con pH básicos (Zaid *et al.*, 2011).

Otro factor importante es la complejidad de la pared celular (Zaidi *et al.*, 2011), lo anterior dado que se ha reportado que matrices con quitina (un polisacárido de la pared celular de los hongos y del exoesqueleto de los insectos) adsorben 10 mmol/Kg de Hg, en tanto que el micelio de *Trichoderma* adsorbe hasta 50 mmol Kg⁻¹ de Hg, (Krantz y Schnürer., 1993; Krantz *et al.*, (1995; Alexander, 1999; Dana *et al.*, (2006).

3) Bioacumulación: Este mecanismo requiere actividad metabólica, debido que se activa la ruta de asimilación de azufre⁶ para producir cisteína (Xiang y Oliver, 1999) la cual es utilizada para la síntesis de proteínas quelantes denominadas metalotioneinas (Cobbett, 2000; Cobbett y Goldsbrough, 2002) o para la biosíntesis del glutatión (GSH). El GSH es importante para la síntesis de fitoquelatinas, los cuales son péptidos quelantes. Tanto las fitoquelatinas como las metalotioneinas, forman un

⁶ Para la asimilación de azufre es necesaria expresión de la 5-adenililsulfato [APS] reductasa, cuyo gen se encuentra coordinado con los genes de la vía del GSH que se inducen ante estrés por metales pesados.

complejo con los metales pesados que es transportado al interior de las vacuolas utilizando proteínas transportadoras del tipo ABC (**Figura 2.1**) (Quig, 1998; Gutiérrez *et al.*, (2005; Raspanti *et al.*, (2009). Estos complejos han sido observados mediante microscopia electrónica como gránulos, los cuales brindan a las colonias de los microorganismos pigmentaciones características dependiendo del metal. Por ejemplo el Se y Te generan coloraciones rojas y oscuras respectivamente (Gadd, 2001). De este modo los microorganismos disminuyen los niveles de metales pesados en el medio ambiente y su biodisponibilidad para las plantas. Por lo tanto, para este fin los microorganismos deben de estar vivos a diferencia del mecanismo de biosorción.

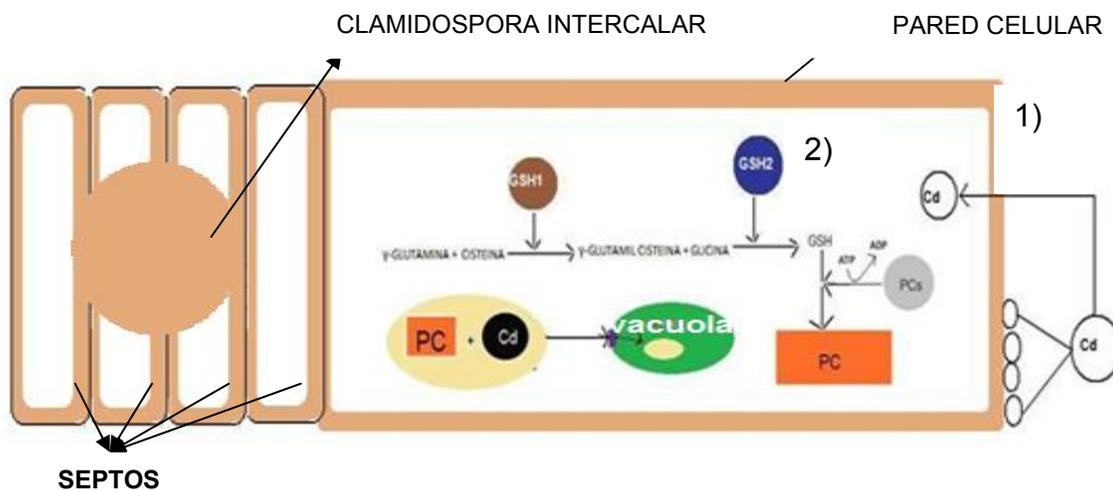


Figura 2.1 Esquematiza el segmento de una hifa septada, bajo un ambiente de estrés con clamidospora, para mostrar los mecanismos de **1)** biosorción de metales pesados en la pared celular, por atracción electrostática el metal con carga (+), en este caso Cd representado con círculos, se une a la pared celular que tiene carga (-), representada de color mamey. **2)** La bioacumulación, los metales pesados entran al citoplasma mediante transportadores que acarrean micro o macronutrientes, donde participa un transportador transmembranal de la vacuola del tipo ABC; la vacuola se esquematiza de color verde y en su contorno las proteínas ABC de color morado, mientras que el complejo PC+Cd de color amarillo. Para este mecanismo participan dos enzimas, la primera es la γ -glutamil cisteinil ligasa (codificada por *GSH1*) que une glutamina y cisteína, la otra enzima es la GSH sintetasa (codificada por *GSH2*) que se encarga de formar un polímero de $[\gamma\text{-glutamil cisteína}]_n$ al cual le añaden glicina, de esta forma se genera el GSH. El GSH es un tripéptido con actividad antioxidante que disminuye los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno. No obstante el GSH es el sustrato de la enzima fitoquelatín sintetasa (PCs) para producir fitoquelatinas. Las fitoquelatinas (PC) son péptidos que forman un complejo con los metales y son transportados al interior de las vacuolas, donde es almacenado e impedir que dañe las membranas, debido que los metales generan ROS mediante la reacción de Fenton.

Considerando que todo anteriormente mencionado pero sobretodo que **1)** las plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* con genes de *Trichoderma* spp. que codifican para quitinasas (*Chit33* y *Chit44*) y la glutatión-S-transferasa (*gst*) (Dana *et al.*, 2006; Dixit *et al.*, 2011) y **2)** que la sobreexpresión del gen *CABPR1* (que codifica la proteína PR-1a proveniente de plantas de chile *Capsicum annumm*) en las plantas de *N. tabacum* (Sarowar *et al.*, 2005) disminuyen significativamente los daños causados por fitopatógenos y la toxicidad por metales pesados, se planteo que la aplicación de cepas de *Trichoderma* sp. resistentes a Hg^{2+} disminuyan significativamente los efectos tóxicos éste en *A. thaliana*. Debido que, *Trichoderma* spp., cuenta con las características como agente bioremediador (Mrozik y Piotrowska-Segel, 2009 in Zawiercha y Malina, 2011).

Además, *Trichoderma* spp., inducen la síntesis de jasmonatos, estos a su vez inducen la expresión de *PR-1a* e incrementan la expresión de *GSH1* y *GSH2*. La interacción de *Trichoderma* spp. con *Arabidopsis thaliana* podría disminuir los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales y podría inducir la resistencia a Hg^{2+} probablemente relacionada por la inducción de la RSI, en la cual están involucrados los jasmonatos. La hipótesis anterior surge porque *Trichoderma* sp. es capaz de degradar el cianuro de potasio, intensificándose al interactuar con plantas de trigo (*Triticum aestivum*) o chícharo (*Pisum sativum*) (Ezzi y Lynch in Argumedo *et al.*, 2009), lo cual indica que durante la interacción con las plantas se modifica la expresión de los genes (Bailey *et al.*, 2006) y en este caso se pudiera intensificar la expresión de la enzima que degrada el cianuro de potasio, de tal manera que *Trichoderma* representa una alternativa viable en la fitorremediación, en este caso potencializando la degradación de cianuro de potasio en los suelos.

Por lo tanto, se efectuaron ensayos de interacción *Trichoderma* spp.-*Arabidopsis thaliana* encontrando que los genes implicados en la vía de síntesis del glutatión se inducen indirectamente con la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a*, los cuales se emplearon Como genes marcadores de la producción de jasmonatos y salicilatos, respectivamente inducidos por *Trichoderma*, encontrando también que durante la interacción las plantas disminuyeron los efectos tóxicos del $HgCl_2$.

2.6 ¿Por qué trabajar con *Trichoderma* spp.?

Los hongos del género *Trichoderma* son fácil aislamiento, al no requerir de nutrientes ni condiciones específicas para su crecimiento, además generan abundante biomasa, lo cual es importante porque hacen que su cultivo sea económicamente redituable. Además, el ser hongos cosmopolitas indica que son fácilmente adaptables a cualquier ambiente y que presentan mecanismos de resistencia al **1)** biodegradar xenobióticos o **2)** biotransformar xenobióticos o **3)** bioacumular metales pesados, porque han sido aislados de sitios contaminados con éstos (Argumedo *et al.*, 2009). Estas características son importantes ya que son las esenciales para elegir microorganismos con fines de biorremediación (Mrozik y Piotrowska-Segel, 2009 *in* Zawiercha y Malina, 2011).

Otra característica importante por la cual se determino emplear a *Trichoderma* spp., es que estos inducen el crecimiento vegetal y la biosíntesis de salicilatos, etileno y jasmonatos. Los jasmonatos son fitohormonas involucradas en varios procesos fisiológicos, entre ellos la inducción de la RSI. Pero se ha reportado que los jasmonatos inducen un aumento de la expresión de los genes de estrés oxidativo (*GSH1* y *GSH2*), los cuales son expresados normalmente en la célula e inducidos ante situaciones de estrés (Xiang y Oliver, 1999). Por lo que se ha sugerido que los jasmonatos estén relacionados con la resistencia a metales pesados (Maksymiec *et al.*, 2007).

Además, actualmente existen bioinsecticidas y biofungicidas en el mercado formulados con *Trichoderma* spp., ya que son agentes de control biológico altamente eficaces y versátiles al parasitar hongos patógenos (micoparasitismo), competir con otros microorganismos por nutrientes y/o espacio (competencia) o producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (antibiosis).

Es decir, *Trichoderma* es un hongo versátil con potencial como agente de control biológico y bioremediador, por lo que es importante continuar investigando las especies de este género fúngico para aprovechar su potencial a favor del ambiente y combatir plagas.

III. JUSTIFICACIÓN

El Hg⁰ es uno de los metales que provocan problemas en los ecosistemas y generan serios daños a los seres vivos. Las técnicas clásicas de remediación son poco accesibles y causan contaminación secundaria. Por ello se deben buscar alternativas, utilizando microorganismos, plantas o asociaciones entre estos. De este último punto no se ha abordado el tema con respecto a su potencial biorremediador, por lo tanto es importante desarrollar investigaciones al respecto.

Trichoderma spp., son microorganismos que han sido utilizados ampliamente en el control biológico de hongos fitopatógenos. Otro mecanismo adicional al control de enfermedades en plantas de estos microorganismos esta dado por su capacidad de establecer relaciones simbióticas con las plantas, lo cual conlleva a una promoción del crecimiento vegetal.

Además, los hongos del genero *Trichoderma* son microorganismos cosmopolitas al grado que han llegado a encontrarse en zonas contaminadas por xenobióticos como petróleo, metales pesados, insecticidas, entre otros contaminantes.

Debido que el ácido salicílico y ácido jasmónico al aplicarlos exógenamente a plantas induce la expresión de los genes involucrados en la síntesis de glutatión y que *Trichoderma* spp. inducen las vías asociadas a estas fitohormonas, en el presente trabajo pretendemos analizar el papel de esta asociación para que las plantas contiendan con metales pesados como el mercurio. De este modo podría plantearse que la asociación de las plantas con *Trichoderma* spp., sea una alternativa que mejore la fitorremediación de ambientes contaminados por mercurio.

IV. HIPOTESIS

La simbiosis de las plantas de *Arabidopsis thaliana* con hongos del género *Trichoderma* spp., conferirá resistencia a mercurio en las plantas.

V. OBJETIVOS

- Objetivo General

Aislar microorganismos benéficos a plantas, para determinar su potencial como agentes que incrementen la respuesta al estrés por mercurio al analizar la inducción de genes implicados en la detoxificación de metales pesados en las plantas empleando como modelo *Arabidopsis thaliana*. Determinar si la asociación *Trichoderma-A. thaliana* incrementa la tolerancia o resistencia a mercurio.

- Objetivos Particulares

1. Identificar especies del género *Trichoderma* de las cepas aisladas en suelos contaminados con mercurio.
2. Determinar los niveles de resistencia a mercurio en las distintas cepas aisladas de *Trichoderma*.
3. Determinar los efectos tóxicos y la dosis letal de HgCl_2 en *Arabidopsis thaliana*.
4. Evaluar los efectos tóxicos del HgCl_2 en *A. thaliana* inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma* bajo condiciones de invernadero.
5. Determinar el patrón de expresión de los genes implicados en la vía de síntesis de glutatión y los niveles de Hg^{2+} en las raíces y partes aéreas de las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. en presencia de HgCl_2 .
6. Determinar el patrón de expresión de los genes asociados a la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y Adquirida (RSA) en *A. thaliana* en presencia *Trichoderma* y HgCl_2 .

VI. METODOLOGÍA

6.1 Muestreo

Los puntos de muestreo fueron **1)** la zona arqueológica de Ranas ubicada a $99^{\circ}33'54.72''$ de longitud oeste y a $20^{\circ}55'30.74''$ de latitud norte, **2)** la zona arqueológica de Toluquilla ubicada a $99^{\circ}31'52.49''$ de longitud oeste y a $20^{\circ}53.35''$ de latitud norte. Ambas zonas constan de vegetación de pino-encino y **3)** Nuevo San Joaquín (donde se cultivan hortalizas y manzana para el autoconsumo).

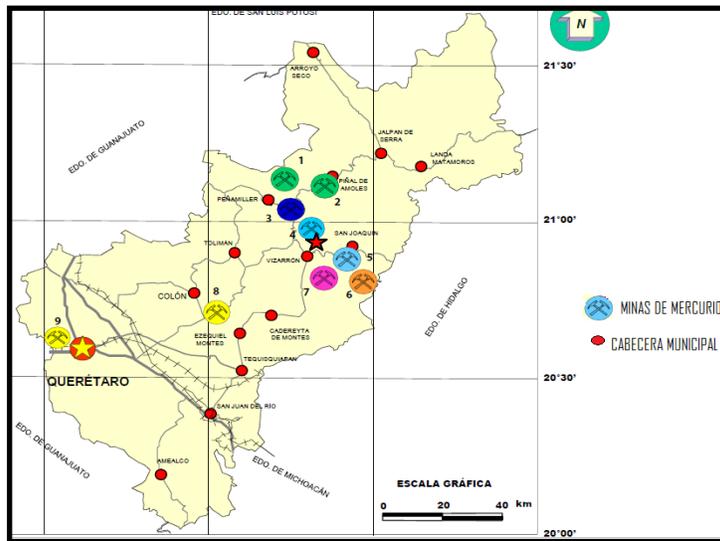


Figura 6.1. Principales zonas mineras del Estado de Querétaro. Muestra las distintas minas del Estado de Querétaro de las cuales se extrae oro, zinc, plata, plomo, cobre antimonio y mercurio, se marca con una estrella roja el área de estudio. Tomado de *Panorama Minero del Estado de Querétaro*, Secretaría de Economía 2010.

Se colectaron muestras de raíz y suelo a 10 cm de profundidad y se almacenaron en bolsas con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

6.2 Aislamiento y caracterización de *Trichoderma*.

6.2.1 Aislamiento y preservación de cepas

Se pesaron 0.5 g de raíces que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml, se eliminó la carga microbiana superficial con hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos y se

enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Posteriormente los cortes de raíz se trituraron e inocularon en cajas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), y se incubaron a 28°C una semana.

Se generaron cultivos puros, de los cuales se colectaron las conidias a los siete días, colectándolas en tubos Eppendorf con agua destilada estéril. De éstos se generaron stocks con glicerol al 20% para su preservación a -80°C. Los stocks de uso frecuente solo se les agregó agua destilada estéril y se almacenaron a 4°C.

6.2.2 Identificación de cepas

Las cepas se identificaron fácilmente por su morfología macroscópica, sin embargo se confirmó el género *Trichoderma* mediante sus características microscópicas empleando las claves taxonómicas para hongos imperfectos de Barnett y Hunter (1972). El nivel de especie se determinó empleando las claves taxonómicas de Gams *et al.*, (1998) y Samuels *et al.*, (2011).

Como cepa de referencia se empleó a *T. atroviride* cepa IMI 206040 (referida en adelante como IMI).

6.2.3 Caracterización molecular de las cepas

Un disco de crecimiento micelial activo de cada cepa fue inoculado en PDA con un papel celofán estéril, colocado sobre el medio y se incubaron a 28°C por 72 horas. El micelio se colectó y molió en nitrógeno líquido. El DNA se extrajo siguiendo el método de Reader-Broda (1985), basado en extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v).

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó la región espaciadora transcrita interna (ITS), que incluye al 18S RNAr, utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') del rDNA, amplificando un fragmento de aproximadamente 700 pares de bases (pb) (White *et al.*, 1990; Kubicek *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2008), empleando la DNA polimerasa Platinum[®] Taq (Invitrogen[®]) con el

siguiente programa de amplificación: 95°C por 5 minutos (desnaturalización) seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 60°C por 45 segundos (alineamiento), 72°C por 1.5 minutos (extensión), seguido por una última extensión final de 72°C por 8 minutos. Para verificar el producto de PCR, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Anexo A2**).

El producto de PCR se ligó en el vector pGEM[®] (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del fabricante y se transformaron células tratadas con Ca²⁺ competentes de *Escherichia coli* TOP10 F' y se seleccionaron en medio LB con carbenicilina (Sambrook, *et al.*, 1987) (**Anexo A3**). El DNA plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Birboim y Doly *in* Sambrook, *et al.*, 1987) (**Anexo A4**). La presencia del inserto en el plásmido se comprobó por digestión utilizando la enzima de restricción *Eco* RI y por electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Anexo A5**). Las muestras fueron purificadas utilizando columnas del kit Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System (Promega[®]), bajo las especificaciones del fabricante para su posterior secuenciación.

Los ácidos nucleicos se cuantificaron por espectrofotometría con el equipo nanodrop (Thermo[®] scientific) y se alicuotaron a una concentración de 200 ng/μl para su secuenciación por el método de Sanger *et al.*, (1977), utilizando el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del LANBAMA (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental). Los hongos se identificaron al comparar las secuencias nucleotídicas de cada cepa con las bases de datos de la NCBI usando el algoritmo BLAST X⁷ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1990; Curran y Bugeja, 2005).

6.2.4 Caracterización de la resistencia a mercurio de cepas de *Trichoderma* spp.

Los niveles de resistencia a Hg en las distintas cepas de *Trichoderma* spp. fueron determinados, inoculando 5 μl de conidias en un extremo de una caja Petri con PDA adicionado con distintas concentraciones de HgCl₂. Los tratamientos empleados fueron 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 250 μg/ml de HgCl₂. Cada 12 horas se registró el crecimiento radial para generar las curvas de crecimiento. Con estos datos se calcularon los porcentajes de inhibición o porcentaje de tolerancia para cada cepa

⁷ BLAST por sus singlas en ingles, Basical Local Alingnment Sequence Tool

como lo determinan Ezzouhri *et al.*, (2009) utilizando la fórmula de Sundar *et al.*, que se muestra a continuación (1995, Sarkar *et al.*, 2010).

$$PI = \frac{X-Y}{X} * 100$$

Donde X es el diámetro de las colonias creciendo en medio de cultivo sin $HgCl_2$, y Y es el diámetro de las colonias creciendo en medio con $HgCl_2$. Como control se empleó la cepa de referencia IMI 206040 de *T. atroviride*. Una vez tomadas las mediciones, los cultivos en 0 y 75 μg de $HgCl_2$ fueron empleados para determinar la concentración de Hg^{2+} en la biomasa, se colectó y congeló el micelio en nitrógeno líquido. Las muestras se digirieron con ácido nítrico ($HCl: HNO_3$) en horno de microondas a $175^\circ C$ por 30 minutos (147-SEMARNAT/SSA-2004). Posteriormente se cuantificó la concentración de Hg por espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (ICP).

6.2.5 Producción de compuestos indólicos por *Trichoderma*

La producción de compuestos indólicos se determinó por colorimetría utilizando el reactivo de Salkowski (**Anexo C1**), elaborado con ácido perclórico para intensificar el potencial oxidativo y brindar mayor sensibilidad a la reacción (Sarwar y Kremer, 1995; Mantilla, 2007).

Se inocularon discos de crecimiento activo en 150 ml de medio Murashige-Skoog (MS, por sus siglas en inglés, marca Phytotechnology Laboratories®) con $200 \mu g/ml^{-1}$ de triptófano, debido que es el precursor para la biosíntesis de compuestos indólicos. Como control se emplearon cultivos sin triptófano. El periodo de incubación fue de 14 días a $28^\circ C$ sin agitación. Como control positivo se empleo la bacteria *Bacillus thuringiensis*, la cual se sabe es productora de indoles. Los cultivos se decantaron, se centrifugaron por 15 minutos a 8000 rpm, y se filtraron a través de una membrana Milipore de $0.45 \mu m$.

El análisis se efectuó con de 1 ml del filtrado, 2 ml del reactivo de Salkowski y 200 μl de ácido ortofosfórico, homogenizando perfectamente por agitación y dejando reposar por 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se protegieron de la luz para

evitar la degradación de los compuestos indólicos. Se registraron las absorbancias a 530 nm.

Para las muestras con triptófano se empleo medio MS con triptófano como blanco, mientras que para las muestras sin triptófano el blanco consistió únicamente de medio MS. La concentración de compuestos indólicos se determinó por medio de la curva estándar utilizando ácido indolacético (IAA, por sus siglas en inglés) comercial (Sigma-Aldrich®) (**Anexo C2**). Las reacciones se efectuaron por triplicado.

6.2.6 Colonización de *Arabidopsis thaliana* por *Trichoderma* spp.

La capacidad de *Trichoderma* spp. para colonizar a *Arabidopsis thaliana* se determinó bajo condiciones de invernadero. Se inocularon grupos de 25 plantas de *A. thaliana* de 7 días de edad con 5×10^6 conidias de las distintas cepas de *Trichoderma* con un periodo de interacción de 14 días. Por cada grupo de plantas, se seleccionaron aleatoriamente 6 plantas de cada grupo de plantas inoculadas.

Estas plantas fueron tratadas con etanol al 50% por 30 segundos, seguidas de un lavado con hipoclorito de sodio al 10% por 15 minutos y se enjuagaron 4 veces con agua bidestilada estéril (Rebolledo *et al.*, 2006). Una vez desinfectadas se colocaron por separado la parte aérea y la raíz en agar MS (**Anexo B3**) y se incubaron a 26°C con una humedad relativa del 65% e iluminación con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Se consideraron como controles aquellas plantas que no fueron inoculadas con *Trichoderma*. El porcentaje de colonización se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{número de plantas con crecimiento fúngico}}{\text{total de plantas}} \times 100$$

Además se efectuaron diluciones seriadas con muestras del sustrato para corroborar la presencia de *Trichoderma* spp.

6.2.7 Capacidad de volatilización de mercurio por *Trichoderma*

La técnica de X-ray (Nakamura *et al.*, 1990) fue utilizada para detectar de manera cualitativa y rápida la volatilización de mercurio. Esta técnica se ha empleado en bacterias y levaduras con la capacidad de efectuar la reacción de reducción de mercurio generándose vapores de éste. A la fecha, esta técnica no ha sido empleada en hongos filamentosos.

Se utilizaron placas de microtitulo de 96 pozos, a cada pozo se le añadieron 200µl de PDB, cada fila de la placa fue destinada para una cepa distinta inoculando 10µl de conidias por pozo. Las placas se incubaron a 26°C con una humedad relativa del 65% e iluminación constante por 8 días.

Después de este tiempo, se aplicaron los tratamientos que constaron de 20, 40, 60, 80 y 100µg de HgCl₂, como control positivo se utilizo PDB con HgCl₂ + cloruro de aluminio 2M, donde este último genera una reacción de reducción del Hg²⁺, por lo que se producen vapores que son detectados por la placa. Como control negativo se considero el PDB.

El arreglo de los tratamientos en las placas de microtítulo se muestra en la **Figura 6.2**. En el cuarto oscuro y con la luz roja de seguridad se colocó la placa de rayos X (Amersham hyperfilm ECL L&G[®]) sobre la placa de microtítulo, incubándola a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz y cerrándola con pinzas a presión para garantizar que la placa de rayos X estuviera en contacto con las muestras (**Figura 6.3**). El experimento se efectuó con tiempos de exposición a 12, 24 y 48 horas.

La placa de rayos X se reveló manteniéndola 1 minuto en la solución de revelado, posteriormente 1 minuto en agua corriente y 1 minuto en la solución fijadora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	POZOS DESTINADOS AL CONTROL NEGATIVO (POZOS CON PDB SIN TRICHODERMA)
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	POZOS SIN NADA
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	CEPA IMI 206040
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	CEPA 20-D
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	CEPA 20-F
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	CEPA II
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	POZOS SIN NADA
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	POZOS DESTINADOS AL CONTROL POSITIVO (CLORURO DE ALUMINIO 2M)
	0 ug de cloruro de mercurio		20 ug de cloruro de mercurio		40 ug de cloruro de mercurio		60 ug de cloruro de mercurio		80 ug de cloruro de mercurio		100 ug de cloruro de mercurio		● pozos vacios

Figura 6.2. Arreglo de la placa de microtítulo que indica los pozos inoculados con las distintas cepas y la posterior aplicación de los diferentes tratamientos con $HgCl_2$.



Figura 6.3 Procedimiento para detectar la capacidad de de las cepas de *Trichoderma* para volatilizar el Hg^{2+} . En (A) se muestra la placa en la cual inocularon las cepas y los tratamientos de $HgCl_2$ a la cual posteriormente se le colocó la placa de rayos X (B). El dispositivo se cerró colocando pinzas a presión (C) para que los vapores de Hg^{2+} no se pierdan y sean detectados por la placa.

También se determinó cuantitativamente la concentración de Hg^{2+} que fue volatilizado por cada cepa. Para esto, en un matraz de 1000ml con 60ml de medio PDB, se inoculó con 5 μ l de conidias de cada cepa. Los hongos se dejaron crecer por 7 días a 25-28°C.

Posteriormente se les añadió $HgCl_2$, la concentración final en el medio fue de 100 μ g de $HgCl_2$. Los matraces se taparon herméticamente empleando tapones con válvulas (**Figura 6.4**). Por duplicado y en matraces independientes, a las 3, 6 y 24 horas posteriores a la aplicación del tratamiento se abrió la válvula para permitir el flujo de aire de una bomba para acuario con un caudal de 1.5 L/ml durante 5 minutos. El Hg volátil fue retenido en una trampa con 20 ml de permanganato de potasio ($KMnO_4$) al 0.6% y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 5%. El Hg^0 es insoluble en solución, el $KMnO_4$ es un agente oxidante y el Hg^{2+} se solubiliza en la solución. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su análisis. La determinación de Hg fue mediante

espectrofotometría de absorción atómica (EAA, por sus siglas en español) (Perkin Elmer® Analyst 100) por el método de vapor frío empleando un generador de hidruros (Perkin Elmer® MH-15). La concentración de Hg^{2+} por m^3 , fue determinada con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}(\text{vol. de la trampa en ml})}{K(t)(10^{-3})}$$

Donde $\mu\text{g/L}$ es el valor dado por EAA; K es el caudal de la bomba (1.5 ml/L) y t es el tiempo que se permitió el flujo de aire (5 minutos). La concentración de Hg obtenida por ICP está dada en ppb ($\mu\text{g/L}$), motivo por el cual se tiene que convertir a ppm ($\mu\text{g/ml}$).



Figura 6.4 Sistema para determinar cuantitativamente Hg^0 volátil por *Trichoderma* spp. En el matraz de 1000 ml se crece el hongo, mientras que el matraz cubierto contiene KMnO_4 al 0.6% que funciona como trampa.

6.3 Toxicidad y determinación de concentraciones de mercurio en *Arabidopsis thaliana*

Como modelo experimental de la interacción planta-microorganismo para se empleó la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0, debido que presenta un ciclo de vida corto y no es hiperacumuladora de metales pesados como *A. halleri* (Huai *et al.*, 2006). Para determinar la concentración de HgCl_2 , fue necesario conocer los efectos tóxicos que éste causa a las plantas tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (bajo condiciones de invernadero en un modelo semihidropónico), para lo cual se efectuó lo siguiente:

Se determinaron las dosis inhibitorias de la germinación y las dosis letales en plántulas. Para estos experimentos, las testas de las semillas de *A. thaliana* se desinfectaron con etanol al 70% por un minuto e hipoclorito de sodio al 20% por 6 minutos, se colocaron en medio MS incubándolas en una cámara de crecimiento con las mismas condiciones enunciadas en la sección anterior.

La dosis inhibitoria de la germinación se estableció *in vitro* bajo los tratamientos con 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 6 y 12 μM de HgCl_2 . La dosis letal en las plántulas se determinó bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*, ésta última se evaluó en un sistema semi-hidropónico con vermiculita que es un sustrato inerte cuyo pH es neutro. En condiciones *in vitro*, las plántulas de 2 días de edad se transfirieron a medio MS con 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 6, 12 y 20 μM de HgCl_2 y cada 12 horas se observaron los efectos tóxicos y se registro el crecimiento radicular.

Para determinar la dosis letal en condiciones semihidropónicas, las semillas germinadas fueron transferidas a charolas de unicel con el sustrato previamente humedecido y drenado. Por una semana y sin permitir el drenaje, cada pozo se regó con 20 ml de medio MS al 3%, el libre drenaje se permitió al cumplir dos semanas y al día siguiente se aplicaron los tratamientos con 5, 10, 20 y 40 μM de HgCl_2 (150 ml de medio MS: 50 de la solución de HgCl_2), nuevamente se impidió el drenaje para mantener una concentración de mercurio constante. El riego fue con la solución nutritiva baja en sales Hoagland al 0.5% (Hoagland y Arnon, 1950) (**Anexo B4**).

6.3.1 Efectos del mercurio en el sistema Trichoderma-Arabidopsis y diseño experimental

Una vez determinados los efectos del mercurio en plantas de *Arabidopsis* y después de haber caracterizado las cepas de *Trichoderma*, se diseñaron experimentos para evaluar la interacción de *Arabidopsis-Trichoderma* y determinar la respuesta generada en las plantas por efecto del hongo bajo un estrés inducido por mercurio.

Las semillas de *A. thaliana* se desinfectaron de la forma descrita en la sección 6.3, las cuales se transfirieron a un sistema semi-hidropónico 48 horas posteriores a la germinación. Se formaron cuatro grupos de 125 plantas, éstas fueron inoculadas con

una cepa fúngica distinta a los siete días de edad. Todas las plantas fueron inoculadas con 5×10^6 de conidias con un periodo de interacción de 14 días.

Cada grupo fue dividido en 5 subgrupos con 25 individuos cada uno para la aplicación de los distintos tratamientos que constaron de 0, 5, 10, 20 y 40 de HgCl_2 μM . El grupo control constó de 100 plantas no inoculadas con *Trichoderma* spp. A este grupo únicamente se aplicaron los distintos tratamientos con HgCl_2 . Dichas concentraciones se establecieron mediante la bibliografía revisada y los datos del presente estudio.

Una vez aplicados los tratamientos, se efectuaron observaciones diarias y se registraron los efectos tóxicos en las plantas (cianosis y sobrevivencia). A los 7 y 14 días posteriores a la aplicación de los tratamientos se midieron los diámetros de las rosetas empleando un vernier. Este experimento se efectuó por duplicado (Octubre-Noviembre de 2010 y Mayo-Junio de 2011).

El diseño experimental fue por bloques al azar con un arreglo factorial, se efectuó un ANOVA y una prueba de rangos múltiples de Tukey ($P\alpha=0.05$) con el paquete estadístico Minitab® 15 y los gráficos se efectuaron con el paquete Zigma Plot® 10.0.

6.3.2 Determinación de mercurio en tejido vegetal

Después de 25 días de observación de las plantas, éstas fueron colectadas, lavadas perfectamente con agua corriente, eliminando el exceso del sustrato y finalmente se separaron raíces y partes aéreas. Las muestras se secaron a temperatura ambiente por 2 días y se digirieron con ácido nítrico y ácido clorhídrico (3:1) en horno de microondas por 30 minutos a 175°C (147-SEMARNAT/SSA-2004). Los niveles de mercurio se determinaron por **1**) espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP, por sus siglas en inglés) en el LANBAMA del IPICYT y por **2**) espectrofotometría de absorción atómica por generador de hidruros en el Centro de Estudios de Contaminación Ambiental (CEACA) de la UAQ según las especificaciones de la Farmacopea Argentina (2003), (García *et al.*, (2007; Álvarez *et al.*, 2008).

6.4 Evaluación molecular de la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*

Con los datos obtenidos de la interacción de *Trichoderma-Arabidopsis* se determinó que 40 μM es una dosis letal (tanto en plantas inoculadas como las no inoculadas con los hongos) y en 20 μM las plantas inoculadas resisten el estrés por mercurio, por ello se decidió utilizar la concentración de 30 μM para analizar la inducción de genes relacionados con la vía de la síntesis del glutatión, de la resistencia sistémica inducida (RSI) y de la resistencia sistémica adquirida (RSA). Se emplearon los genes *PDF1.2* y *PR-1a* como marcadores de las vías RSI y RSA, respectivamente.

Las semillas se procesaron de la misma manera como se describe en el apartado anterior. Las plántulas se inocularon con la misma cantidad de conidias y el tiempo de interacción fue el mencionado. Las colectas se efectuaron a las 12, 24 y 48 horas, posteriores a la aplicación del HgCl_2 , separando raíces y partes aéreas, congelándolas inmediatamente en nitrógeno líquido.

Posteriormente se trituraron y almacenaron a -80°C hasta el procesamiento de las muestras. La extracción del RNA total se efectuó con TRIzol[®] (Invitrogen[®]) según las especificaciones del fabricante. La calidad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel desnaturizante de agarosa (**Anexos A6-A7**).

Para la síntesis de la cadena complementaria de DNA (cDNA) se utilizó 1 μg de RNA total y 0.5 μl de transcriptasa reversa SuperScriptII[®] (Invitrogen[®]) (**Anexo A7**). El cDNA se cuantificó por espectrofotometría empleando el nanodrop.

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos, RT-PCR semicuantitativo y cuantitativo

Las secuencias de RNAm y DNA genómico de glutamato-cisteina-ligasa (*GSH1*), glutatión sintetasa (*GSH2*), actina 8 (*ACT8*) fueron tomadas de las bases de datos de NCBI para el diseño de los oligonucleótidos para ensayos de RT-PCR tiempo real (TR) y RT-PCR punto final (PF) que se especifican en la **Tabla 6.1**.

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software Primer Express 3.0 de Applied Biosystems® utilizando los parámetros para obtener fragmentos entre 60-100 pares de bases (pb).

Los RNA se amplificaron por RT-PCR semicuantitativo, y como la eficiencia de síntesis de cDNA no fue la misma para todas las muestras, se ajustaron las concentraciones de cDNA antes de evaluar los genes de interés. Se utilizó como control de expresión la actina 8 (*act8*) (**Tabla 6.1**). Para la amplificación de los genes se utilizó el siguiente programa de PCR: 94°C (desnaturalización) y 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 60°C por 55 segundos con una extensión de 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1.8%.

Tabla 6.1. Oligonucleótidos de *Arabidopsis thaliana* empleados para PCR semiacuantitativa y cuantitativa

GEN	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	Tamaño del fragmento (pb)	Clave de Acceso a GeneBank
<i>GSH1</i>	5'-TGGAAGGTGACAAGATCATTGG-3'	5'-CCCAGGTTCAAGTGAAATGCTT-3'	62 (TR*)	Z29490
<i>GSH2</i>	5'-TTCCTGGCCTTAGTCGTCTTG-3'	5'-GATCCCCATAAGATCGAAGCAA-3'	62 (TR)	U22359
<i>PDF1.2.</i>	5'-CAC CCT TAT CTT CGC TGC TC -3'	5'-GGA AGA CAT AGT TGC ATG ATC C -3'	185 (PF*)	NM_123809.3
<i>PDF1.2.</i>	5'-CACCTTATCTTCGCTGCTC-3'	5'-GGAAGACATAGTTGCATGATCC-3'	62 (TR)	
<i>PR-1a</i>	5'-CGTCTCCGCCGTGAACAT-3'	5'-CGTGTTCCGCAGCGTAGTTGT-3'	62 (TR)	NM_127557.2
<i>PR-1a</i>	5'ATCTAA GGG TTC ACA ACC AGG CAC-3'	5'TGC CTC TTA GTT GTT CTG CGT AGC-3'	108 (TR)	
<i>LOX-1</i>	5' TCCTCATTTCGGCTACACCAT-3'	5'CCTCCGTTGACAAGACTTTGG-3'	(TR)	NM_104376.2
<i>ACT8</i>	5' - GAC TCA GAT CAT GTT TGA GAC C -3'	5' - CAT GTA ACC TCT CTG GGT AAG G-3''	200 (PF)	NM_103814.3
<i>ACT8</i>	5' TGTGACAATGGTACCGGTATGG-3'	5' CAGCCCTGGGAGCATCAT-3'	62 (TR)	

*TR se refiere a la PCR cuantitativa por PCR en tiempo real y PF a la PCR punto final.

VII. RESULTADOS

7.1 Asilamientos y caracterización de las cepas de las cepas fúngicas en distintas concentraciones de $HgCl_2$ respecto al crecimiento radial.

7.1.1 Selección de cepas de *Trichoderma* resistentes a $HgCl_2$

En el presente trabajo se aislaron 20 cepas distintas del género *Trichoderma* de suelos contaminados por mercurio en los sitios arqueológicos de Ranas, Toluquillas y en la localidad de Nuevo San Joaquín, en la Sierra Gorda de Querétaro, Qro. Con la finalidad de seleccionar y determinar la resistencia de las cepas al $HgCl_2$, se efectuaron curvas de crecimiento bajo distintas concentraciones de $HgCl_2$ (**Figura 7.1**) y se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento por $HgCl_2$ (**Tabla 7.1**).

Los resultados observados en las curvas de crecimiento para cada cepa aislada y la cepa de referencia (IMI), indicaron que las concentraciones de 0, 25, 50 y 100 μM de $HgCl_2$ no afectaron significativamente el crecimiento radial de las distintas cepas de *Trichoderma* ($P > 0.05$) (**Figura 7.1**). Sin embargo, la concentración de 200 μM de $HgCl_2$ fue importante porque permitió determinar los distintos niveles de resistencia a $HgCl_2$ en *Trichoderma* spp., debido que el crecimiento de éstas fue afectado significativamente en comparación con el crecimiento registrado en el medio sin $HgCl_2$ ($P < 0.05$).

El diámetro de las colonias de las distintas cepas aisladas y la cepa IMI que se desarrollaron bajo la concentración de 200 μM de $HgCl_2$, permitió identificar y seleccionar las cepas resistentes (IMI), medianamente resistentes (20-F), sensibles (20-D) e hipersensibles (cepa 11) de *Trichoderma* (**Tabla 7.1**). Todas las cepas se seleccionaron aleatoriamente. Se seleccionó una cepa por nivel de resistencia. Es importante mencionar que todas las cepas seleccionadas correspondieron a la localidad de Ranas.

Los principales criterios para caracterizar los niveles de resistencia a $HgCl_2$ fueron las curvas de crecimiento para cada cepa (**Figura 7.1**). Los porcentajes de inhibición del

crecimiento por HgCl_2 indicaron una estimación sesgada de los niveles de resistencia por considerar el crecimiento en un medio libre de HgCl_2 (**Tabla 7.1**), sin embargo estos datos fueron importantes porque complementaron los resultados indicando la tendencia en la velocidad del crecimiento radial de las cepas para entender los datos que se observaron en las curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento bajo la concentración de $200 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , indicaron que la cepa IMI presentó mayor crecimiento (2.54 cm) en comparación con las seleccionadas; cepas 20-F (2.1730 cm), 20-D (0.2816 cm) y cepa 11 (0.377 cm). En la **Figura 7.1** se muestran los datos del crecimiento bajo $200 \mu\text{M}$ de HgCl_2 , mientras que en la **Figura 7.2** se muestra un comparativo del crecimiento en el medio con y sin HgCl_2 a los 10 días y en la **Figura 7.3** a los 6 días.

Los porcentajes de inhibición ayudaron a determinar la velocidad del crecimiento de las distintas cepas de *Trichoderma*. Se encontró que la cepa IMI presentó mayor velocidad del crecimiento que presentó una inhibición del 99.4% en su crecimiento por HgCl_2 a las 24 horas y disminuyó considerablemente a las 144 horas con un 88.52 % (**Tabla 7.1**), estos datos son evidentes en sus curvas de crecimientos (**Figura 7.1**), por tal motivo se caracterizó como resistente. Seguida a la cepa IMI, se encontró la cepa 20-F, que mostró una inhibición del crecimiento del 85 % y 80% por HgCl_2 a las 24 y 144 horas respectivamente, estos datos también fueron consistentes con sus curvas de crecimiento, y al no haber una disminución considerable de estos valores fue caracterizada como medianamente resistente.

La cepa 20-D presentó una inhibición de su crecimiento del 68.3% por HgCl_2 a las 24 horas pero se incrementó a las 144 horas con un 96.24 %, este resultado indicó que ésta cepa es sensible a HgCl_2 . Por último se encontró que la cepa 11 fue inhibida por HgCl_2 un 91.43% en su crecimiento aumentando a las 144 horas con un 97.38%, debido al escaso crecimiento radial que mostró ésta cepa se caracterizó como hipersensible a HgCl_2 .

Tabla 7.1 Clasificación de las cepas de *Trichoderma* por el porcentaje de inhibición respecto al tiempo de crecimiento en 200µg de HgCl₂.

Porcentaje de Inhibición de Crecimiento				
CEPA	24 h	72 h	144 h	CLASIFICACIÓN
IMI	99.486	95.73	88.52	RESISTENTE
20-D	68.312	94.23	96.24	SENSIBLE
20-F	85.09	84.94	80.14	MEDIANAMENTE RESISTENTE
11	91.43	98.20	97.38	HIPERSENSIBLE

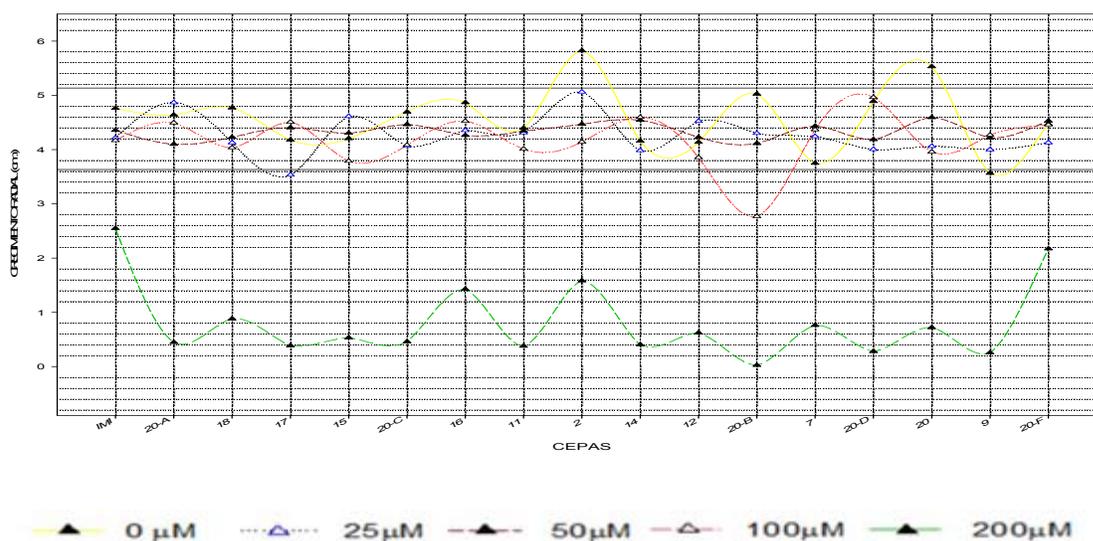


Figura 7.1 Curvas de crecimiento de 17 de las 20 cepas de *Trichoderma* aisladas del municipio de San Joaquín, Qro. México, bajo 25, 50, 100 y 200 µM de HgCl₂. Se graficaron los promedios de tres experimentos independientes, con mediciones cada 12 horas a lo largo de 11 días por triplicado.

Una vez seleccionadas y caracterizados sus niveles de resistencia a HgCl₂, las cepas se procedió con su identificación mediante su morfología macro y microscópica validando por análisis del ITS (transcrito de la región interna ribosomal). A continuación se describen cada una de las cepas seleccionadas, incluyendo la cepa de referencia *T. atroviride* cepa IMI 206040.

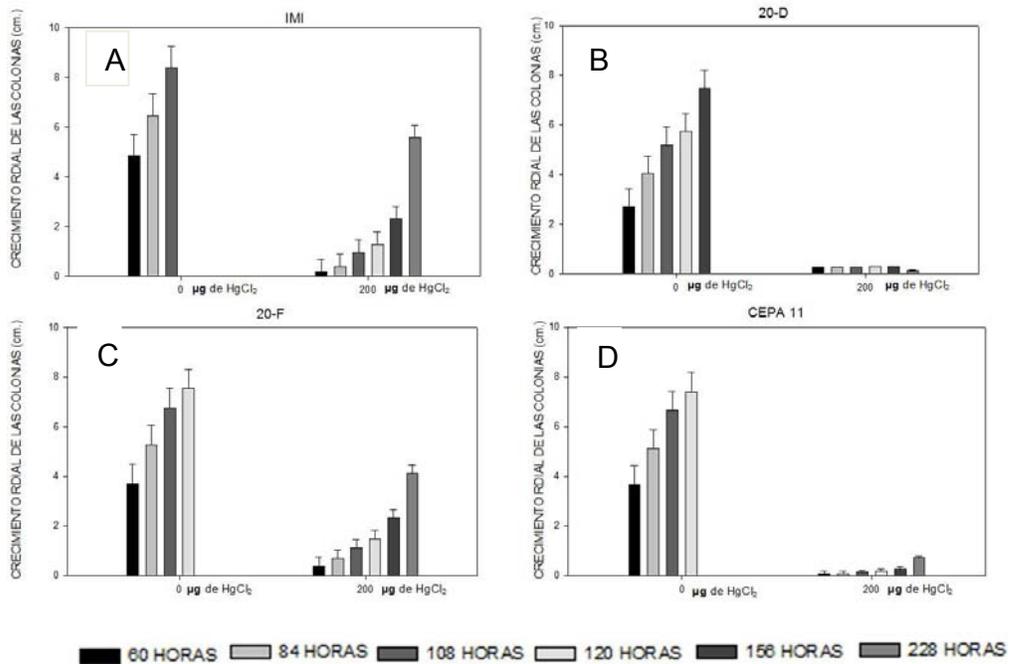


Figura 7.2 Comparación del crecimiento radial de *Trichoderma* cepas IMI (A), 20-D (B), 20-F (C) y 11 (D) en un medio sin HgCl₂ y con 200 µg/ml de HgCl₂ a lo largo de 10 días.

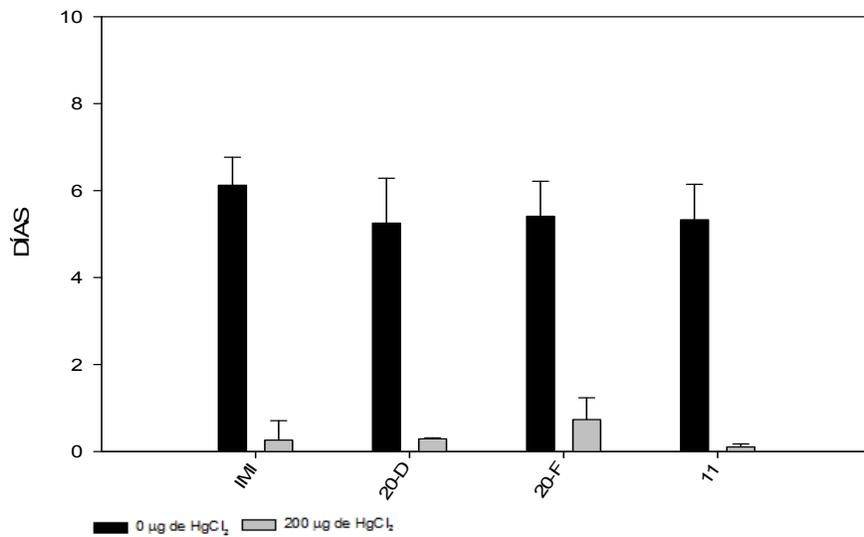


Figura 7.3 Comparativo del crecimiento radial de las distintas cepas de *Trichoderma* en bajo 200 µg/ml de HgCl₂ (barras grises) cuando éstas llenaron completamente el medio sin HgCl₂ (barras negras). Las barras verticales indican los errores estándar generados por un ANOVA ($P_{\alpha}=0.05$).

7.1.2 Identificación las cepas de *Trichoderma* seleccionadas a nivel de especie

Debido a la similitud en las características macroscópicas de las colonias de las cepas nativas *Trichoderma* (**Figura 7.4**) y que el crecimiento de cada una fue distinto bajo tratamiento con HgCl_2 , fue necesario identificar a nivel de especie. Para esto se evaluaron sus estructuras microscópicas tales como conidióforos (**Figura 7.5 A**), fiálides (**Figura 7.5 B**), micelio, color y forma de las conidias (**Figura 7.5 C**). También se consideraron sus características macroscópicas como el patrón de crecimiento, presencia y color de pústulas, olor y difusión de pigmentos al medio de cultivo.

Todas las cepas aisladas difundieron pigmentos al medio de cultivo de color amarillo verdoso, mientras que la cepa IMI no difundió pigmentos. Otra diferencia es que en las cepas aisladas tampoco se detectó un olor característico como sucedió con la cepa IMI. Las cepas aisladas presentaron morfología microscópica similar pero diferente a la observada en la cepa IMI

Como resultado se obtuvieron las especies posibles que fueron *T. crassum* o *T. virens* al seguir las claves de Gams *et al.*, (1998). Estos resultados se validaron mediante el análisis de la secuencia del transcrito interno ribosomal (ITS) que se compararon con secuencias de genBank mediante un análisis BLAST y se generó un árbol filogenético que se muestra en la **Figura 7.6**, el cual confirmó que las tres cepas aisladas de los suelos contaminados con Hg^{2+} son *Trichoderma virens*.

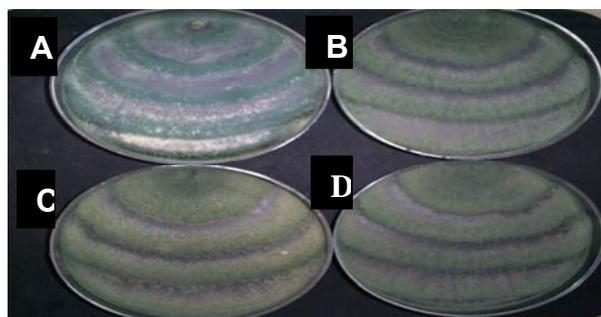


Figura 7.4 Características macroscópicas de las cepas de *Trichoderma* empleadas durante el presente trabajo creciendo en PDA. (A) cepa de referencia *T. atroviride* cepa IMI 206040, (B) sp. cepa 20-D (C) *Trichoderma* sp. cepa 20-F y en (D) *Trichoderma* sp. cepa 11. Nótese la similitud en la coloración de los anillos concéntricos donde se encuentran las conidias.

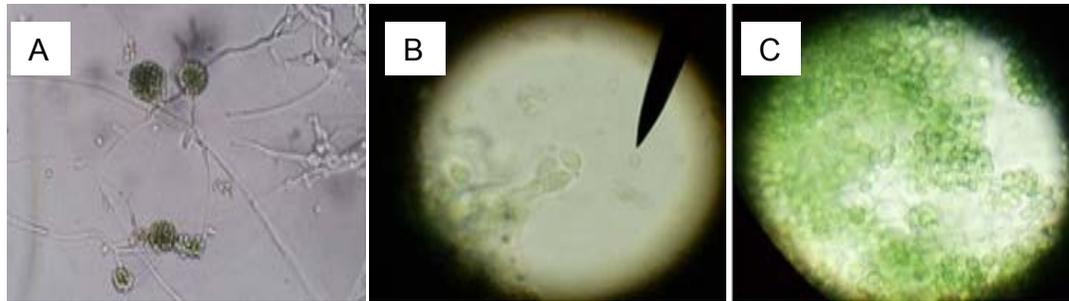


Figura 7.5 Estructuras microscópicas de *Trichoderma* spp., conidióforos (A), fiáldes (B) y conidias (C)

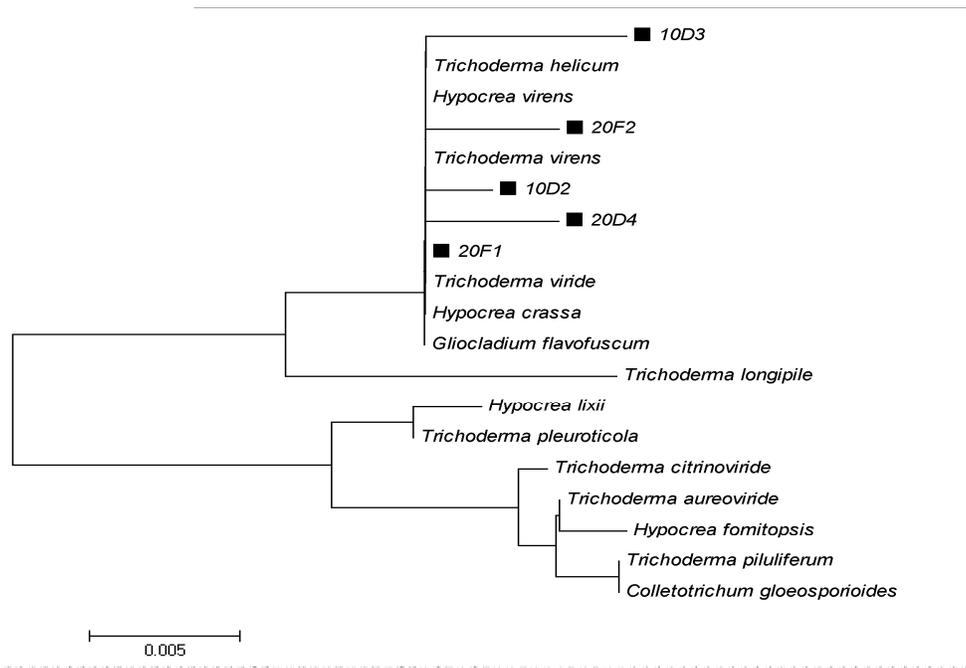


Figura 7.6 Identificación de especies de las cepas nativas de *Trichoderma* mediante el análisis del ITS. En el árbol filogenético la cepas aisladas se identifican con cuadros negros con distintas leyendas, que a continuación se mencionan: **Cepa 20-D=** 20D4; **Cepa 20-F=** 20F1, 20-F2; **Cepa 11=** 10D2, 10D3.

7.2 caracterización de cepas

7.2.1 Producción de compuestos indólicos

En condiciones de invernadero las plantas de *A. thaliana* inoculadas con *Trichoderma* spp. registraron un incremento en el diámetro de sus rosetas, lo que hizo suponer que estas estimulan el crecimiento vegetal. Como una primera aproximación para determinar las moléculas inductoras del crecimiento, se midió la producción de

compuestos indólicos en *Trichoderma* spp. y se incluyó a *B. thurigiensis* como control (Salas-Marina, *et al.*, 2011). Las distintas cepas de *Trichoderma* produjeron indoles a concentraciones bajas al ser comparadas con el control positivo (*B. thurigiensis*), aún cuando estas crecen en un medio con triptófano como precursor para la producción de estos compuestos (**Figura 7.7**).

En relación a la producción de compuestos indólicos, todas las cepas de *Trichoderma* produjeron estos compuestos de manera diferencial. Se obtuvo que las cepas IMI y 11 produjeron compuestos indólicos en presencia y ausencia de triptófano, mientras que las cepas 20-F y 20-D requirieron de triptófano para incrementar la producción de éstos compuestos (**Figura 7.7**). En comparación con las cepas IMI y 20-D, las cepas 20-F y 11 produjeron menor concentración de compuestos indólicos en presencia de triptófano. Además se encontró que las cepas IMI y 20-D produjeron niveles similares de compuestos indólicos. Otro aspecto importante es que la cepa IMI es indiferente a la presencia de triptófano en el medio para producir éstos compuestos.

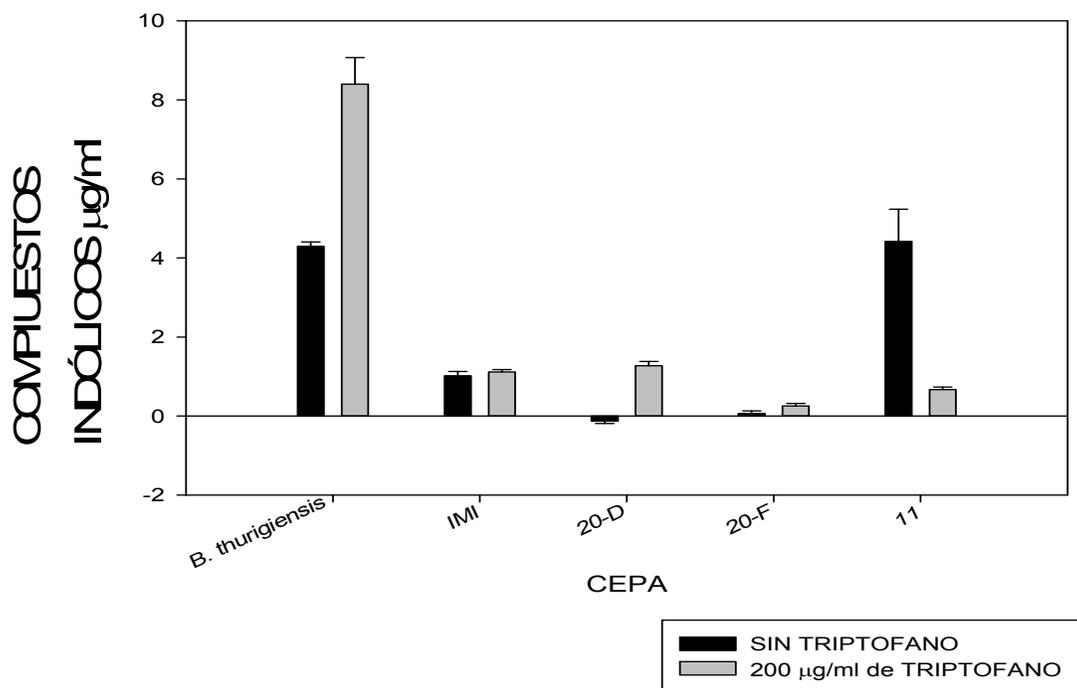


Figura 7.7. Producción de compuestos indólicos por las distintas cepas de *Trichoderma* spp., en ausencia de triptófano (barras negras) y en presencia de 200µg de triptófano (barras grises). Como control positivo se incluyó *Bacillus thurigiensis*. Las barras verticales corresponden al error estándar, los datos se analizaron mediante un ANOVA ($P\alpha < 0.005$).

7.1.2 Capacidad de las cepas de *Trichoderma* para colonizar *Arabidopsis thaliana*

Otro aspecto importante para la caracterización de las cepas de *Trichoderma* fue determinar su capacidad de colonizar los tejidos vegetales. El resultado que se obtuvo fue que todas las cepas de *Trichoderma virens* incluso la IMI presentaron la capacidad de colonizar las plantas, tanto la parte aérea como las raíces (**Figura 7.8**). Sin embargo la mayor incidencia de colonización ocurrió en la parte aérea (**Tabla 7.2**). Además las cepas mostraron diferentes porcentajes de colonización siguiendo el siguiente orden IMI > 20-D > 20-F > 11. También se encontró que las cepas resistentes a HgCl₂ presentaron una mayor tasa de colonización en comparación con las cepas hipersensibles.

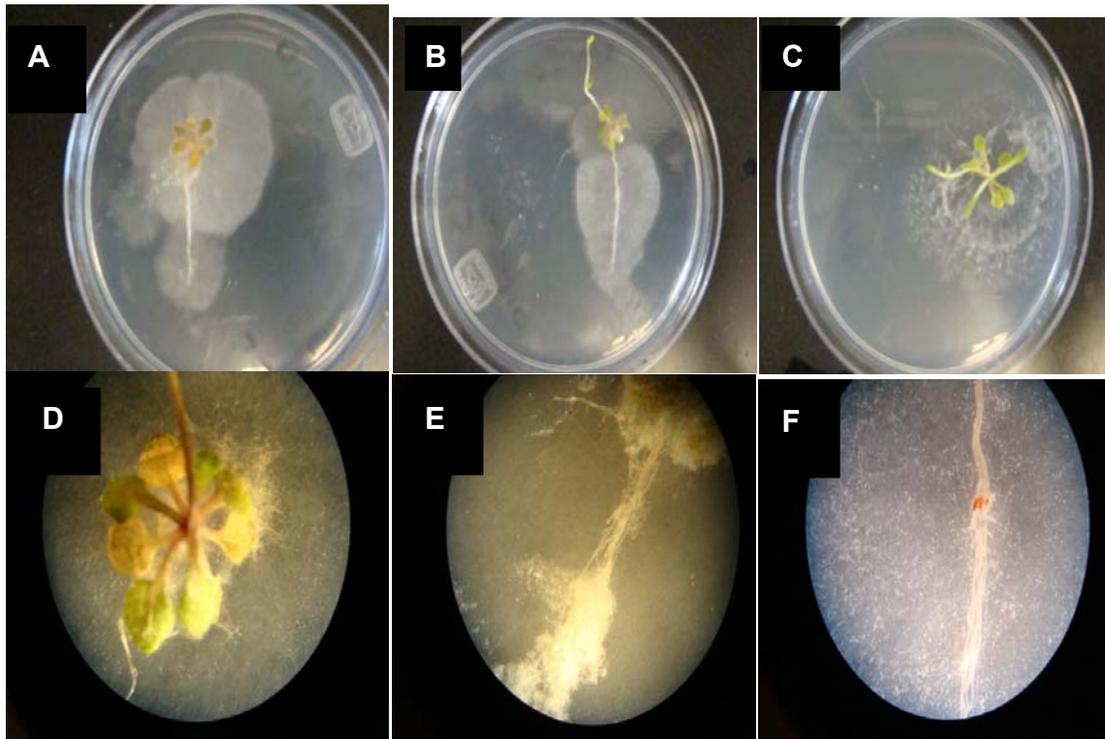


Figura 7.8 Colonización de los tejidos de *A. thaliana* por *Trichoderma* spp. (A) Muestra el crecimiento del hongo en toda la planta; en (B) notese que el crecimiento emerge principalmente en la raíz y en (C) que emerge de los tejidos de la parte aérea. En (D) se observa un acercamiento de la planta que mostró crecimiento de *Trichoderma* en su parte aérea. En (E y F) se observa un acercamiento de las plantas que mostraron crecimiento fúngico en sus raíces. En A, B, D y E se muestran plantas de *A. thaliana* colonizadas por la cepa 20-D, mientras que en C y F se muestran plantas colonizadas por la cepa IMI.

Tabla 7.2 Porcentajes de colonización de *Arabidopsis thaliana* por *Trichoderma* spp.

CEPA	CRECIMIENTO PARTE AÉREA	EN CRECIMIENTO RAICES	EN
Plantas sin inoculo	0%	0%	
<i>T. atroviride</i> cepa IMI	60%	40%	
20-D	50%	25%	
20-F	50%	17.5%	
cepa 11	33%	5%	

7.1.3 Capacidad volatilización de Hg⁰

Debido que el hongo filamentoso *Gliocladium roseum* presenta la capacidad de metilar compuestos inorgánicos de As generando su volatilización y se encuentra relacionado filogenéticamente con el género *Trichoderma* spp. Posiblemente los hongos del género *Trichoderma* volatilicen el mercurio. Por tal motivo se generaron análisis para determinar la capacidad de *Trichoderma* spp. de generar mercurio volátil.

Los resultados obtenidos de pruebas cualitativas (**Tabla 7.3**) indicaron que las cepas de *Trichoderma* volatilizaron el Hg presente en el medio. Por tal motivo se efectuó un análisis y cuantitativo (**Tabla 7.4**). Estos resultados arrojaron que la cepa IMI generó mayor Hg volátil (\bar{x} 254.54 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en comparación con las cepas de *Trichoderma virens* (\bar{x} 152.85 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Se encontró que no todas las cepas de *T. virens* presentaron la misma capacidad para volatilizar el Hg⁰, la cepa 20-D fue la única que generó los niveles más altos de Hg volátil (\bar{x} 110.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en comparación con las cepas 20-F (\bar{x} 5.08 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) y cepa 11 (\bar{x} 1.15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). La capacidad de volatilización de las cepas 20-F y 11 no es significativa en comparación con la capacidad observada en las cepas IMI y 20-D.

En todos los caso se observó que los niveles de Hg volátil incrementó gradualmente mostrando su pico máximo a las 6 horas posteriores a la aplicación del HgCl₂ (**Tabla 7.4**)

De ensayos previos se cuantificaron los niveles de Hg en la biomasa de las distintas cepas de *Trichoderma* para determinar la concentración de Hg que es acumulada. Estos resultados se correlacionaron con la capacidad de generar Hg volátil (**Tabla 7.5**). debido que la cepa IMI fue la que más volatilizó Hg pero también la cepa que menos acumulo en su biomasa (\bar{x} 254.54 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0.0136 mg/g^{-1}) mientras que la cepa 11 de *T. virens* fue la que menos Hg⁰ volatilizó pero la que más Hg²⁺ acumulo en su biomasa (1.15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0.02 mg/g^{-1}) (**Tabla 7.4**).

Tabla 7.3 Prueba cualitativa de volatilización de Hg en las distintas cepas de *Trichoderma* a 24 horas de exposición.

CEPA	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2	60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de HgCl_2
IMI	+	++	++	+++	+++
20-D	-	-	++	+++	+++
20-F	-	++	++	+++	+++
11	-	-	++	+++	+++

*Nota +++ alta capacidad de volatilizar Hg, ++ capacidad media para volatilizar Hg, + escasa capacidad para volatilizar Hg y - capacidad nula para volatilizar Hg.

Tabla 7.4 Prueba cuantitativa volatilización de Hg por *Trichoderma* spp en distintos tiempos

Cepa	Tratamiento	Hg Total ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)			
		0 min	5 min	3 Hrs.	6 Hrs.
Medio PDB	0 μg HgCl_2			<1.28ppb	
				<1.28ppb	
IMI	100 μg HgCl_2		53.01	236.18	513.52
20-D		<1.28	48.61	129.65	213.04
20-F			<1.28	3.9	
11			4.61	<1.28	<1.28

*Nota Todas las concentraciones de Hg en las muestras de los hongos a las cuales no se les añadió HgCl_2 fueron <1.28 $\mu\text{g}/\text{L}$ (3.41 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). El límite de detección del equipo es de <1.28 $\mu\text{g}/\text{L}$. Por tanto <1.28 $\mu\text{g}/\text{L}$ = 0.0 mg/m^{-3}

Tabla 7.5 Concentraciones de Hg²⁺ acumulado en la biomasa de *Trichoderma* spp

Cepa	Hg Total (mg/g ⁻¹)	
	Crecimiento en HgCl ₂ *	Crecimiento sin HgCl ₂
IMI	0.0136	
20-D	0.0185	0.0
20-F	0.0175	
11	0.0200	

***Nota** las distintas cepas de *Trichoderma* se crecieron en un medio con 75 µg/ml de HgCl₂. Para convertir a µg/g⁻¹ basta con multiplicar el valor por 1000

7.2 Interacción *Trichoderma*-*Arabidopsis* y los efectos tóxicos del mercurio

7.2.1 Crecimiento de *A. thaliana* inoculadas con *Trichoderma* spp.,

Se ha reportado que los metales pesados retardan o inhiben el crecimiento vegetal y la germinación de las semillas (Xu *et al*, 2010 a;b), por lo cual se decidió determinar las concentraciones de HgCl₂ que causan efectos tóxicos sobre *A. thaliana* en condiciones *in vitro*. Se determinó que la presencia de HgCl₂, afectó la germinación (**ANEXO C4, Figura C.4.1**), el crecimiento y la sobrevivencia de las plántulas (**Figura C.4.2**).

En función de los resultados *in vitro* se procedió a determinar los efectos tóxicos del HgCl₂ sobre *A. thaliana* bajo condiciones de invernadero. Se determinó que los tratamientos de 5 y 10 µM HgCl₂ fueron estadísticamente diferentes (P<0.05), encontrándose que a partir de la concentración de 10 µM de HgCl₂ los efectos tóxicos de éste incrementaron, afectando significativamente al disminuir el crecimiento vegetal, además no se encontraron diferencias significativas sobre el crecimiento vegetal entre los tratamientos con 10, 20 y 40 µM HgCl₂ (P> 0.05) (**Figura 7.9 A** y **Figura 7.10**). También se observó que las plantas acumularon pigmentos tomando una coloración cianótica (acumulación de antocianinas), condición que se observa normalmente en situaciones de estrés por su actividad antioxidante y reducir las ROS

generadas por el Hg (**Anexo C5, Figura C.5.1**). Sin embargo, presente investigación se enfocó a los efectos del HgCl₂ sobre el crecimiento vegetal.

Una vez identificados los efectos tóxicos bajo distintas dosis de HgCl₂, bajo un modelo de interacción planta-microorganismo se evaluó la respuesta que *Trichoderma* activa en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés por Hg. Antes de someter el estrés con HgCl₂, se encontró que las distintas cepas de *Trichoderma* sp. no indujeron un incremento significativo del crecimiento vegetal ($P>0.05$), debido que en promedio los diámetros en las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp., fueron de 37.7 mm mientras que en las plantas no inoculadas fueron de 37.4 mm.

Al generar estrés con HgCl₂ en la plantas inoculadas con *Trichoderma* spp., se encontró que el mercurio afectó el 47.7% del crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, mientras que la interacción con las distintas cepas de *Trichoderma* spp. sólo afectó el 40% del crecimiento vegetal (**Figura 7.10**). Aunque hay una diferencia de 7.7 % entre los grupos de plantas inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* sp., las distintas cepas de *Trichoderma* disminuyeron significativamente los efectos tóxicos de en *A. thaliana* bajo las concentraciones de 10, 20 y 40 µM de HgCl₂ al ser comparados con las plantas no inoculadas con de *Trichoderma* spp. ($P<0.05$).

La cepa IMI mostró mayor efecto sobre el crecimiento de *A. thaliana* en presencia de Hg al inducir el 13.5%, seguida por las cepas 20-D y 20-F que indujeron el 3.98 % y el 3.15 % respectivamente, en el crecimiento vegetal (**Figura 7.9 A**). Estos resultados sugieren que la cepa IMI confiere resistencia a Hg²⁺ en las plantas al inducir un incremento del crecimiento en comparación con las plantas sin la interacción. Como ya se indicó, el HgCl₂ afectó el crecimiento al registrarse diámetros de 12.98 mm, lo cual equivale al 0% de la inducción del crecimiento en *A. thaliana*, de igual manera se encontró que la cepa 11 tampoco indujo el crecimiento vegetal (10.92 mm).

También se determinaron los porcentajes de sobrevivencia tanto en las plantas no inoculadas como inoculadas con *Trichoderma* spp. Con los resultados previos se determinó que la concentración de 40 µM de HgCl₂ fue la dosis letal, en cambio bajo la concentración de 20 µM de HgCl₂ se presentó una sobrevivencia del 16%. Sin

embargo, en las plantas inoculadas con *Trichoderma* la sobrevivencia incrementó casi el doble (31.5 %), determinando que de las 4 cepas de *Trichoderma* evaluadas, la cepa IMI fue la que incremento considerablemente la sobrevivencia en *A. thaliana* (37 %) en comparación con las plantas inoculadas con las cepas distintas cepas de 20-D (29.1 %), 20-F (30.43 %) y cepa 11 (30.43 %) de *Trichoderma virens* (**Figura 7.9 B**).

Con todos estos resultados se determinó que el crecimiento de *A. thaliana* comenzó a ser afectado a partir de la concentración de 10 μM de HgCl_2 sin afectar la sobrevivencia de las plantas. Sin embargo, a partir de la concentración de 20 μM de HgCl_2 la sobrevivencia empezó a disminuir.

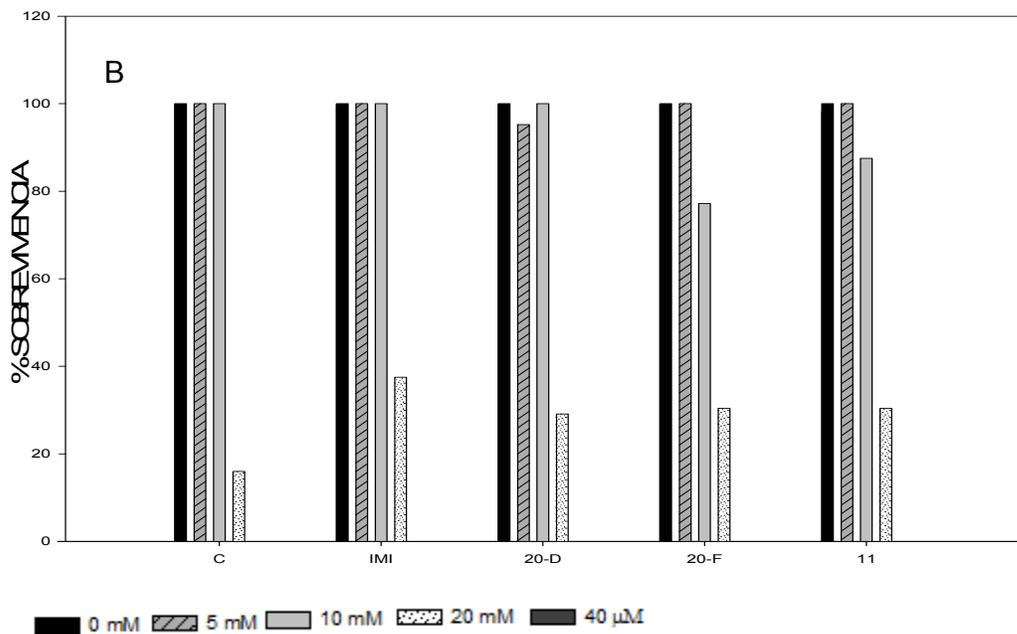
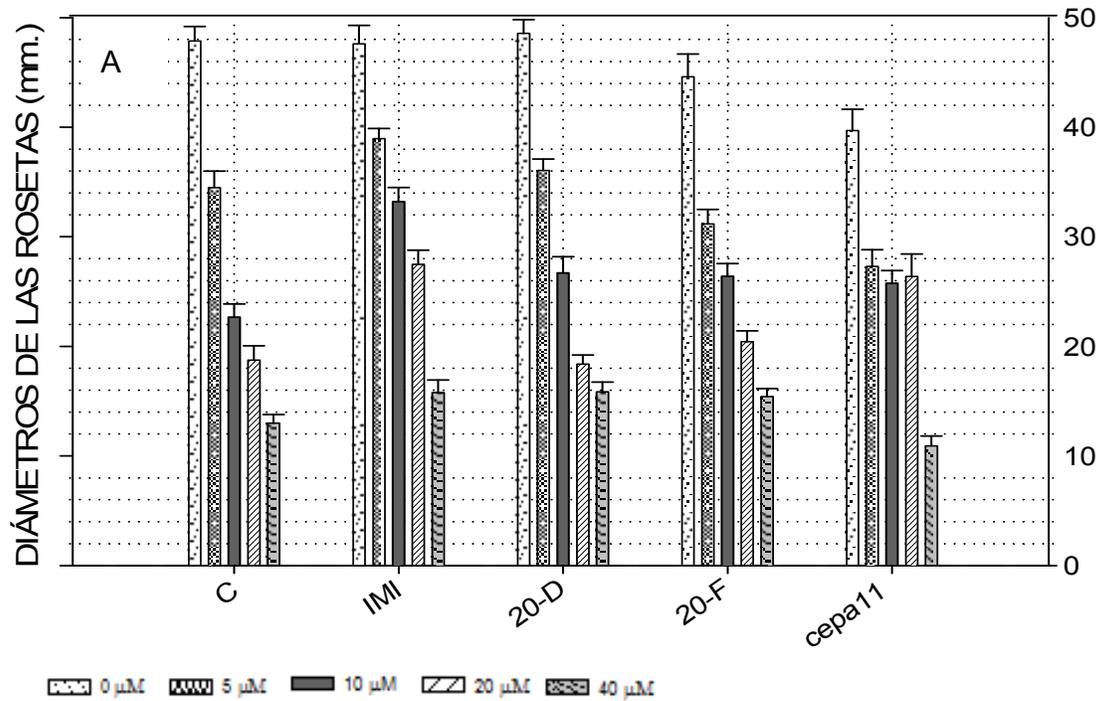


Figura 7.9 Colonización de plantas de *Arabidopsis* por *Trichoderma* spp. **(A)** Se comparan los diámetros de las rosetas de *Arabidopsis thaliana* a los 14 días posteriores de la aplicación de los tratamientos con $HgCl_2$. Notesé la diferencia del tamaño de las rosetas de las plantas entre las barras blancas punteadas (controles) con las barras grises ($40 \mu M$ de $HgCl_2$). Las barras verticales indican el error estándar de un ANOVA $P_{\alpha}=0.05$. **(B)** Porcentajes de sobrevivencia, donde las barras negras son el control para cada grupo. Se grafican las medias de dos experimentos independientes.

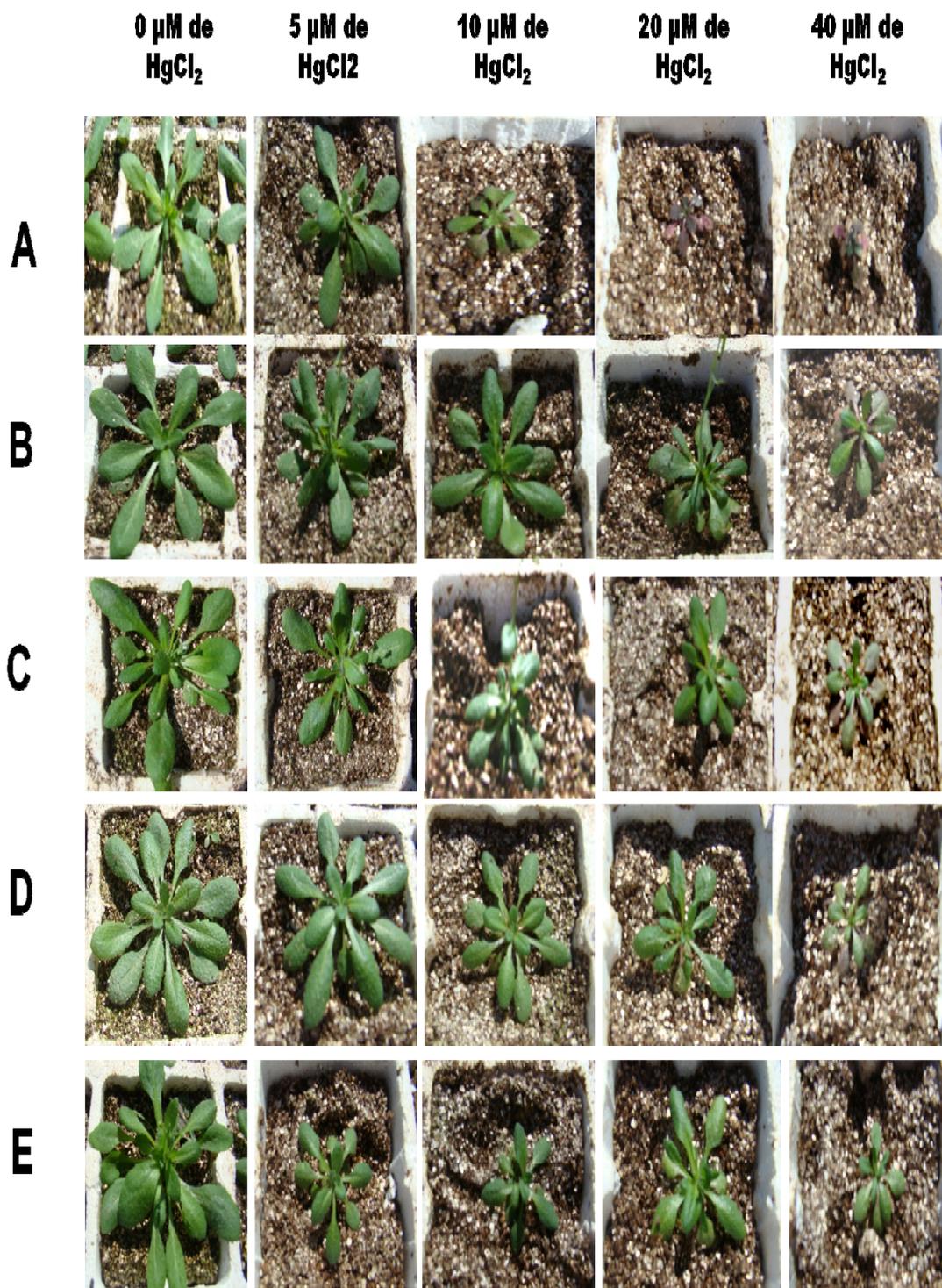


Figura 7.10 Imagen comparativa a 14 días de haber aplicado distintos tratamientos de HgCl_2 en *A. thaliana* tratadas con *Trichoderma* spp. Cada fila corresponde a la interacción con las distintas cepas de *Trichoderma* spp., **A**= sin interacción; **B**= *Trichoderma atroviride* cepa IMI 206040; **C**= *Trichoderma virens* cepa 20-D; **D**= *T. virens* cepa 20F y **E**= *T. virens* cepa 11. Cada columna corresponde a una concentración diferente de HgCl_2 .

7.2.2 *Trichoderma* spp. afecta positivamente el desarrollo de *A. thaliana* a pesar del estrés por $HgCl_2$.

Al continuar con las observaciones de las plantas de *Arabidopsis thaliana* en el invernadero, se encontró que en condiciones normales las plantas produjeron el 62.7 % de inflorescencias. Sin embargo, las plantas inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma* incrementaron significativamente la producción de inflorescencias en comparación con las plantas no inoculadas ($P < 0.05$). Las cepas que incrementaron considerablemente la producción de inflorescencias en *A. thaliana* fueron la cepa IMI (95 %), la cepa 20-D (92 %) y la cepa 20-F (70 %), mientras que en las plantas inoculadas con la cepa 11 la producción fue menor (56.3 %) en comparación con las plantas no inoculadas (**Figura 7.11**).

Cuando se aplicaron los distintos tratamientos de $HgCl_2$, se encontró que el Hg disminuyó considerablemente el porcentaje de inflorescencias. Bajo la concentración de 10 μM de $HgCl_2$ el porcentaje de inflorescencias fue del 43%, en la concentración de 20 μM de $HgCl_2$ fue del 5.3 % y bajo el tratamiento con 40 μM de $HgCl_2$ no se registró producción de inflorescencias (**Figura 7.11**). Las plantas bajo influencia de $HgCl_2$ disminuyeron la producción de inflorescencias, pero las plantas inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma* incrementaron la producción de inflorescencias. Sin embargo, el efecto de las cepas varió dependiendo de la concentración de $HgCl_2$, encontrando que bajo el tratamiento de 10 μM de $HgCl_2$ las cepas incrementaron las inflorescencias en el siguiente orden 20-D >IMI>20-F>cepa 11, pero en la concentración de 20 μM de $HgCl_2$ el orden cambio 20-F>IMI>20-D >cepa 11.

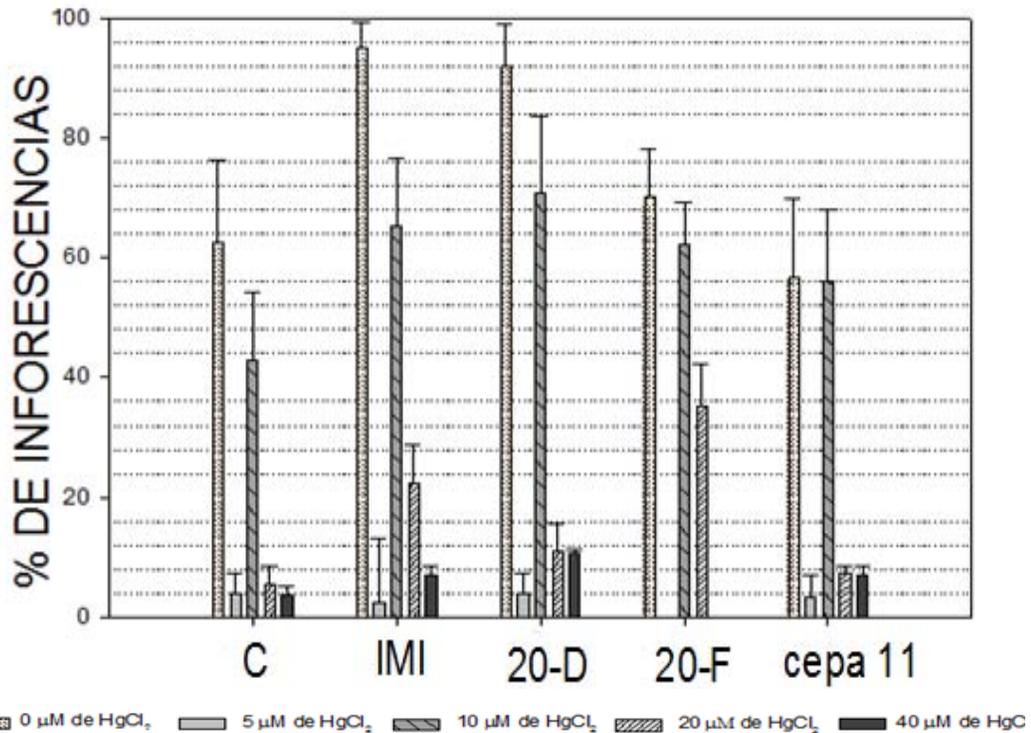


Figura 7.11 La producción de inflorescencias en *A. thaliana* aumenta al inocular *Trichoderma* spp., incrementándose cuando la planta es estresada por HgCl₂. En la gráfica se muestra una comparación entre las plantas de *A. thaliana* inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* spp., bajo distintas concentraciones de HgCl₂. Las barras verticales corresponden al error estándar, los datos se analizaron mediante un ANOVA ($P\alpha < 0.005$). Se grafican las medidas de dos experimentos independientes. El grupo marcado con la letra C se refiere al grupo de plantas no inoculadas con *Trichoderma*.

6.2.3 Niveles de mercurio en tejido vegetal

Los niveles de Hg²⁺ en las raíces y en los tejidos de las partes aéreas, se cuantificaron para determinar si la interacción con *Trichoderma* spp., incrementa o disminuye en los niveles de Hg²⁺ en las plantas y para comparar el efecto de *Trichoderma* spp. sobre los efectos tóxicos del Hg²⁺ en *A. thaliana*. También permitió comparar el efecto de cepas de *Trichoderma* que presentaron diferentes niveles de resistencia a Hg con distintos niveles de Hg²⁺ en su biomasa relacionada con su capacidad de volatilizar el Hg.

El análisis mostró que las plantas a las cuales no se les aplicaron los tratamientos con HgCl₂, presentaron niveles relativamente altos de Hg⁰ en sus tejidos (ver **Anexo C6**), pero no les causó ningún daño debido que continuaron creciendo y son las plantas

que se muestran en la primera columna de la **Figura 7.10**. Los niveles de Hg^{2+} en plantas de *A. thaliana* a las cuales les fue aplicado el tratamiento con HgCl_2 , se encontraron incrementados, de manera significativa ($P < 0.05$) en las partes aéreas (0.050 mg/g^{-1}) a diferencia de las raíces (0.048 mg/g^{-1}). Estos resultados no son congruentes con otros estudios, que indican que las raíces son los tejidos en los cuales se acumulan los metales pesados (**Tabla 7.6**).

Al comparar los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales de las plantas de las plantas no inoculadas con *Trichoderma* spp. y las plantas inoculadas con las distintas cepas de *Trichoderma* spp., se obtuvo que la interacción con *Trichoderma* spp. disminuyó significativamente los niveles de Hg^{2+} en *A. thaliana* ($\bar{x}41.17\%$) en comparación con las plantas sin la interacción ($\bar{x}1.0\%$) ($P < 0.05$). Como resultado se determinó que las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp., acumularon en promedio un 58.3% de Hg^{2+} en sus tejidos (partes aéreas y raíces), mientras que sin la interacción con *Trichoderma* spp. se registró una acumulación del 99% de Hg^{2+} en los tejidos vegetales. De igual manera, se encontraron incrementados los niveles de Hg^{2+} en la raíces de las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp.

También se encontró que las distintas cepas de *Trichoderma* disminuyeron los niveles de Hg^{2+} en *A. thaliana* en concordancia con **1)** los niveles de resistencia a Hg^{2+} , **2)** la capacidad de volatilizar Hg^{2+} , **3)** acumular Hg^{2+} en el micelio y **4)** frecuencia de colonización de los tejidos vegetales.

Es decir, la cepa IMI encabeza el orden al generar en las *A. thaliana* los niveles más bajos de Hg^{2+} en sus todos sus tejidos (44.18%). Se determinaron los porcentajes de Hg^{2+} en las plantas de *A. thaliana* teniendo que la cepa IMI disminuyó el 48.98 %, la cepa 20-D disminuyó el 48.16 %, la cepa disminuyó el 20-F 52.68 % y la cepa 11 disminuyó el 14.86 %, en comparación con el 99% encontrado en los tejidos de *A. thaliana* no inoculadas. Estos datos sugieren que las cepas que presentan incrementada su capacidad de volatilizar Hg y que colonicen preferentemente las hojas, liberan el Hg de las plantas volatilizándolo a través de los estomas disminuyendo de esta manera los niveles de Hg^{2+} en las plantas.

Tabla 7.6 Niveles de mercurio en tejido vegetal determinados por EAA

CEPAS	Hg ⁰ mg/g ⁻¹ de peso seco de hoja	Hg ⁰ mg/g ⁻¹ de peso seco de raiz
Plantas sin inocular	0.05097	0.04888
IMI	0.04260	0.01210
Cepa 20-D	0.04142	0.01427
Cepa 20-F	0.02299	0.02569
Cepa 11	0.07570	0.01618

7.3 Inducción de genes en Arabidopsis thaliana bajo la interacción de Trichoderma spp.

Para entender la respuesta de *A. thaliana* observada en invernadero y encontrar una posible explicación del por qué las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* reducen los efectos tóxicos del HgCl₂ en *A. thaliana*, se procedió a evaluar la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo (*GSH1* y *GSH2*) y de las vías de la resistencia sistémica adquirida (RSA) e inducida (RSI), bajo la concentración de 30µM de HgCl₂. La concentración de HgCl₂ se determinó en función a los resultados observados en el presente trabajo (**Anexos C.4 y C.5**) y en consideración de los trabajos de Heidenreich *et al.*, (2001) y Venkatachalam *et al.*, (2009).

7.3.1 Efecto del mercurio sobre la expresión de los genes de la vía de síntesis del glutatión (GSH1 y GSH2) y de genes marcadores en la síntesis de jasmonatos (PDF1.2) y salicilatos (PR-1a) en A. thaliana inoculadas con Trichoderma spp.

7.3.1.1 Trichoderma spp. induce la expresión de los genes de la vía del glutatión (GSH1 y GSH2)

En ausencia de HgCl₂ la expresión de los genes *GSH1* y *GSH2* incrementó en los tejidos de las partes aéreas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con *Trichoderma spp.*,

en comparación con las plantas del grupo control (**Figura 7.12 y Figura 7.13**). Cuando se aplicó el tratamiento con HgCl_2 la expresión de *GSH1* y *GSH2* disminuyó respecto al control, pero en las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. la expresión de éstos genes incrementó.

La mayor expresión de *GSH1* y *GSH2* se observó en los tejidos de las partes aéreas de *A. thaliana* bajo estrés por HgCl_2 e inoculadas con las cepas de *Trichoderma virens* (20-D, 20-F y cepa 11) en comparación con la cepa IMI de *Trichoderma atroviride*. En las plantas inoculadas con la cepa 20-D de *Trichoderma virens*, se observó que la expresión de *GSH1* y *GSH2* incrementó a las 12 y 36 horas posteriores a la aplicación del tratamiento con HgCl_2 , en comparación con las plantas inoculadas con las otras cepas de *Trichoderma* y con las plantas no inoculadas.

Estos datos indican que las cepas aisladas de suelos contaminados con Hg incrementaron la expresión de los genes implicados en la vía de síntesis del glutatión en los tejidos de las partes aéreas de *A. thaliana*.

Respecto a la expresión de los genes implicados en la vía de síntesis de glutatión en las raíces de *A. thaliana*, se observó que la expresión de *GSH1* incrementó en las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens* en comparación con las plantas del grupo control y en las plantas inoculadas con la cepa IMI (**Figura 7.12 Figura 7.13**). Mientras tanto, en las plantas inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* spp. no se observaron cambios en la expresión de *GSH2*, debido que la expresión se observó similar en todos los grupos. Es decir, que *Trichoderma* spp., generó un efecto positivo sobre la expresión de *GSH1* pero no sobre la expresión de *GSH2*.

El mercurio también afectó la expresión de *GSH1* y *GSH2* en las raíces, debido que la expresión de éstos genes se observó a las 24 y 36 horas después de la aplicación de HgCl_2 en comparación con la expresión que se observó en el grupo control (**Figura 7.12 Figura 7.13**). Además, las cepas de *T. virens* incrementaron la expresión de *GSH1* en las raíces de *A. thaliana* en comparación con el grupo control y con las plantas inoculadas con la cepa IMI. Asimismo la expresión de *GSH2* se observó sin cambios al comparar los grupos de plantas inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* spp.

En otras palabras, *Trichoderma* spp. incrementaron la expresión de *GSH1* y *GSH2* en los tejidos de las partes aéreas, mientras que en las raíces solo se observó un incremento en la expresión de *GSH1* (**Figura 7.12**). Sin embargo, el tratamiento con HgCl_2 afectó la expresión de *GSH1* y *GSH2*, solamente en los tejidos de las partes aéreas de las plantas inoculadas con *Trichoderma* spp., se observó un incremento en la expresión de éstos genes en comparación con el control. Pero *Trichoderma* también generó un incremento de la expresión de *GSH1* en las raíces de las plantas de *A. thaliana* estresadas por HgCl_2 . Además, en los tejidos de las partes aéreas de las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens*, en particular con la cepa 20-D, se observó un incremento de la expresión al comparar la expresión observada en el grupo control y en las plantas inoculadas con las cepas 20-F, 11 e IMI.

Ahora bien, en el siguiente apartado se describirá la expresión de los genes involucrados con la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y Adquirida (RSA), *PDF1.2* y *PR-1a* respectivamente.

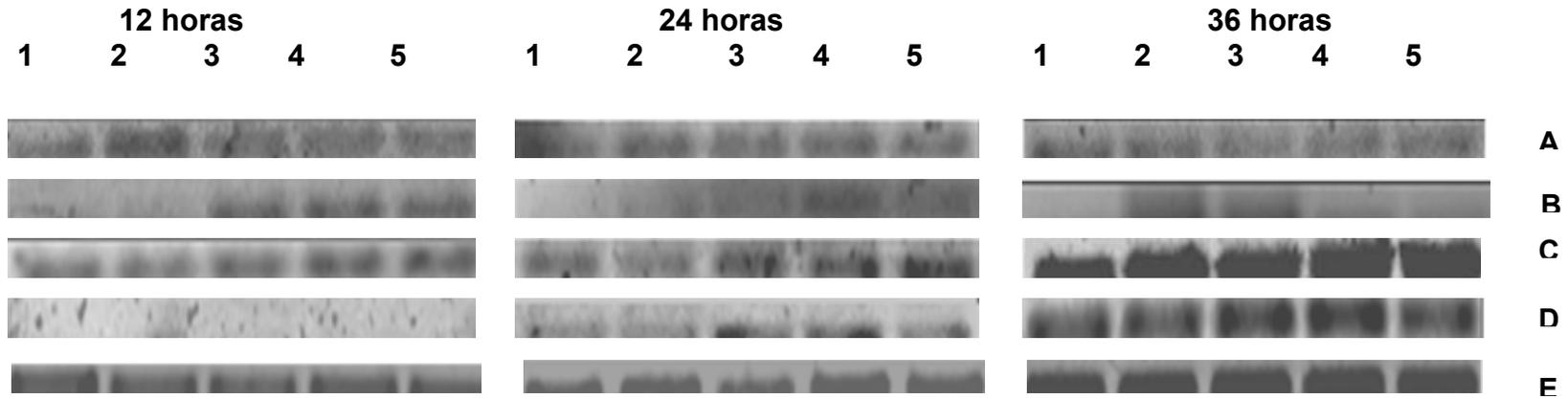


Figura 7.12 RT-PCR de la expresión a 12, 24 y 36 horas del gen *GSH1* en distintos tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana* bajo la interacción con distintas cepas de *Trichoderma* sp. y en presencia de 30 μ M HgCl₂. **A**= partes aéreas sin HgCl₂; **B**=partes aéreas con HgCl₂; **C**= raíces sin HgCl₂; **D**= raíces con HgCl₂; **1**= sin interacción; **2**= interacción con *Trichoderma atroviride* cepa IMI; **3**= *Trichoderma virens* cepa 20-D; **4**= *T. virens* cepa 20-F; **5**= *T. virens* cepa 11

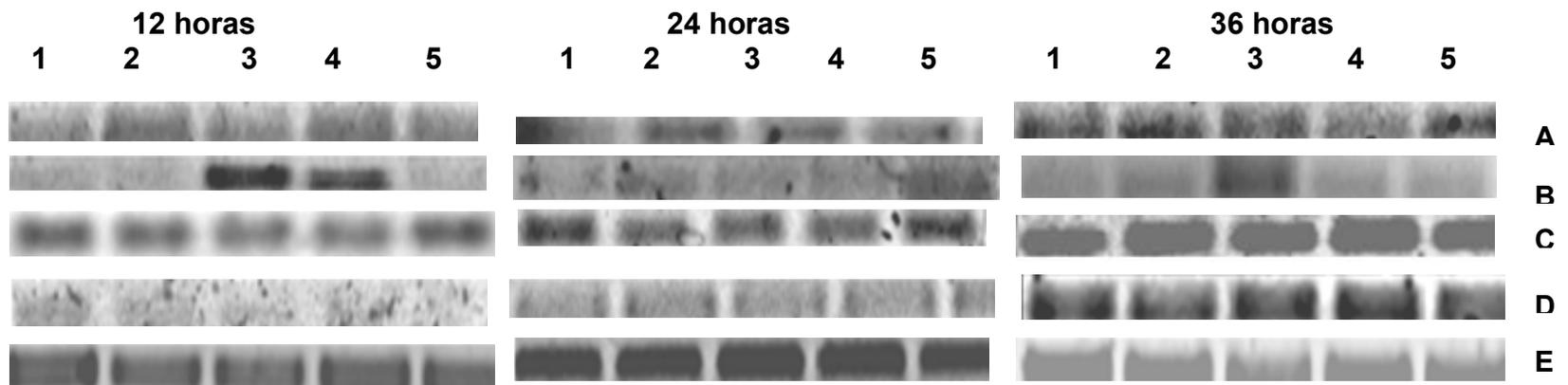


Figura 7.13 RT-PCR de la expresión a 12, 24 y 36 horas del gen *GSH2* en distintos tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana* bajo la interacción con distintas cepas de *Trichoderma* sp. y en presencia de 30 μ M HgCl₂. **A**= partes aéreas sin HgCl₂; **B**=partes aéreas con HgCl₂; **C**= raíces sin HgCl₂; **D**= raíces con HgCl₂; **1**= sin interacción; **2**= interacción con *Trichoderma atroviride* cepa IMI; **3**= *Trichoderma virens* cepa 20-D; **4**= *T. virens* cepa 20-F; **5**= *T. virens* cepa 11

7.3.1.2 *Trichoderma* spp. inducen la expresión de los genes de las vías RSI (*PDF1.2*) y RSA (*PR-1a*).

Se observó que la expresión del gen *PDF1.2* incrementó en los tejidos de las partes aéreas de las plantas de *A. thaliana* inoculadas con las cepas 20-D y 11 de *T. virens* en comparación con las plantas del grupo control e inoculadas con las cepas IMI y 20-F (tiempos de 24 y 36 horas **Figura 7.14**). En tanto, la expresión del gen *PR-1a* también incrementó en los tejidos de las partes aéreas de las plantas inoculadas con las distintas cepas de *T. virens* en comparación con la expresión que se observó en las plantas inoculadas con la cepa IMI y el grupo de plantas no inoculadas con *Trichoderma* (tiempo de 24 horas de la **Figura 7.15**).

A diferencia de la expresión de *GSH1* y *GSH2* (**Figura 7.12** y **Figura 7.13**), el HgCl_2 no afectó la expresión de los genes *PR-1a* y *PDF1.2* en los distintos tejidos de *A. thaliana* (**Figura 7.14** y **Figura 7.15**). Para las 24 y 36 horas posteriores a la aplicación del tratamiento con HgCl_2 , se observó que el Hg generó un aumento en la expresión del gen *PDF1.2* en los tejidos de las partes aéreas de *A. thaliana* en comparación con la expresión que se observó en las plantas que no fueron tratadas con HgCl_2 (tiempo de 12, 24 y 36 horas de la **Figura 7.14**). Sin embargo, la expresión de *PDF1.2* incrementó en las plantas inoculadas con las distintas cepas de *T. virens* (tiempo de 12 y 24 horas de la **Figura 7.14**), de manera particular en las plantas inoculadas con las cepas 20-D y 11, en comparación con las plantas no inoculadas e inoculadas con las cepas IMI y 20-F (tiempo de 36 horas de la **Figura 7.14**).

En relación a la expresión de *PR-1a* en los tejidos de las partes aéreas de *A. thaliana* bajo estrés por Hg, se observó un aumento de su expresión a partir de las 24 horas posteriores a la aplicación del tratamiento con HgCl_2 . Sin embargo, en los tejidos de las partes aéreas de las plantas inoculadas con la cepa 20-D se observó un incremento en la expresión de éste gen a las 12 y 36 horas posteriores a la aplicación del tratamiento en comparación con las plantas no inoculadas e inoculadas con las cepas 20-F, 11, IMI de *Trichoderma* (**Figura 7.15**). También en las plantas inoculadas con la cepa 20-F se observó que la expresión de *PR-1a* incrementó, a las 12 horas posteriores a la aplicación del tratamiento con HgCl_2 en comparación con las plantas

inoculadas con las cepas IMI y 11. Mientras que las plantas inoculadas con la cepa 11 también incrementó la expresión de éste gen pero a 36 horas después de que se aplicó el tratamiento con HgCl_2 , en comparación con las plantas inoculadas con las cepas 20-F e IMI.

En lo referente a la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a* en las raíces de *A. thaliana*, se encontró que las cepas IMI y 20-F incrementaron la expresión de éstos genes en comparación con las plantas no inoculadas e inoculadas con las cepas 20-D y 11 (tiempo de 36 horas de la **Figura 7.14** y **Figura 7.15**). Cuando se aplicó el tratamiento con HgCl_2 , se observó que el Hg no afectó la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a*, sin embargo la expresión de éstos incrementó en las plantas inoculadas con las distintas cepas de *T. virens* (tiempos 24 y 36 horas de la **Figura 7.14** y **Figura 7.15**) en comparación con las plantas no inoculadas e inoculadas con la cepa IMI. El incremento de la expresión de *PDF1.2* en las raíces de *A. thaliana* en respuesta a *T. virens* fue evidente a partir de las 24 horas después de que se aplicó el tratamiento con HgCl_2 , mientras que la expresión de *PR-1a* fue evidente a las 36 horas y principalmente en las plantas inoculadas con la cepa 20-D.

En otras palabras, la cepa 20-D presentó mayor efecto sobre la expresión de los genes *PDF1.2* y *PR-1a* en los tejidos de las partes aéreas, aún cuando a la planta se le aplicó el tratamiento con HgCl_2 , puesto que el Hg no afectó la expresión de éstos genes como se observó con la expresión de *GSH1* y *GSH2*.

Sin embargo, la cepa IMI y 20-F incrementaron la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a* en las raíces de *A. thaliana* en comparación con las plantas no inoculadas e inoculadas con las demás cepas de *Trichoderma*, pero cuando la plantas están bajo el tratamiento con HgCl_2 la cepa 20-D fue la que incrementó la expresión de *PR-1a*.

Además, la expresión de *PR-1a* se observó incrementada en comparación con la expresión de *PDF1.2* (**Figura 7.14** y **Figura 7.15**). Sin embargo, en presencia de HgCl_2 , el gen *PDF1.2* mostró mayor expresión en comparación con *PR-1a*.

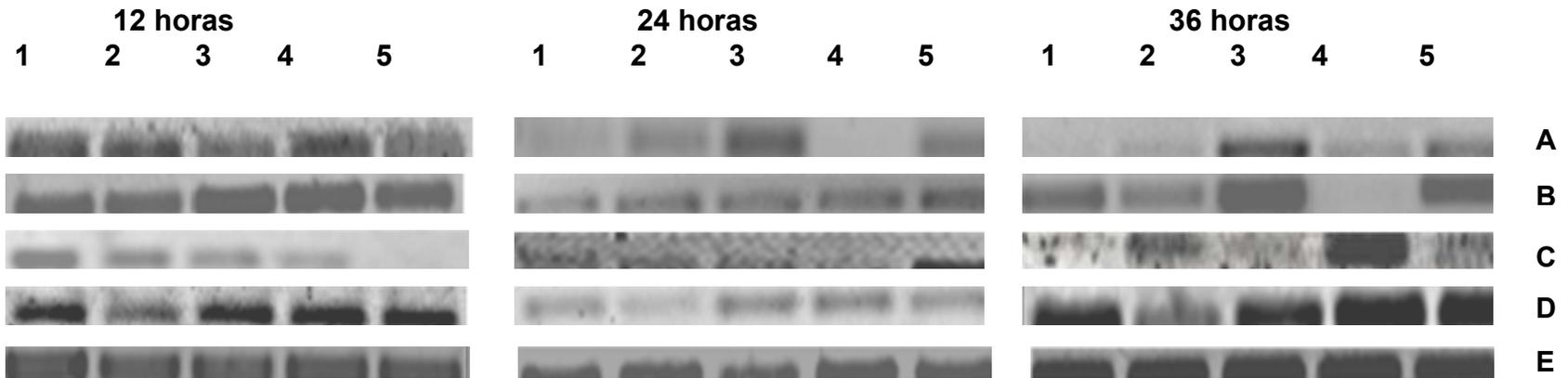


Figura 7.14 RT-PCR de la expresión a 12, 24 y 36 horas del gen *PDF1.2* en distintos tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana* bajo la interacción con distintas cepas de *Trichoderma* sp. y en presencia de 30 μ M HgCl₂. **A**= partes aéreas sin HgCl₂; **B**=partes aéreas con HgCl₂; **C**= raíces sin HgCl₂; **D**= raíces con HgCl₂; **1**= sin interacción; **2**= interacción con *Trichoderma atroviride* cepa IMI; **3**= *Trichoderma virens* cepa 20-D; **4**=*T. virens* cepa 20-F; **5**= *T. virens* cepa 11

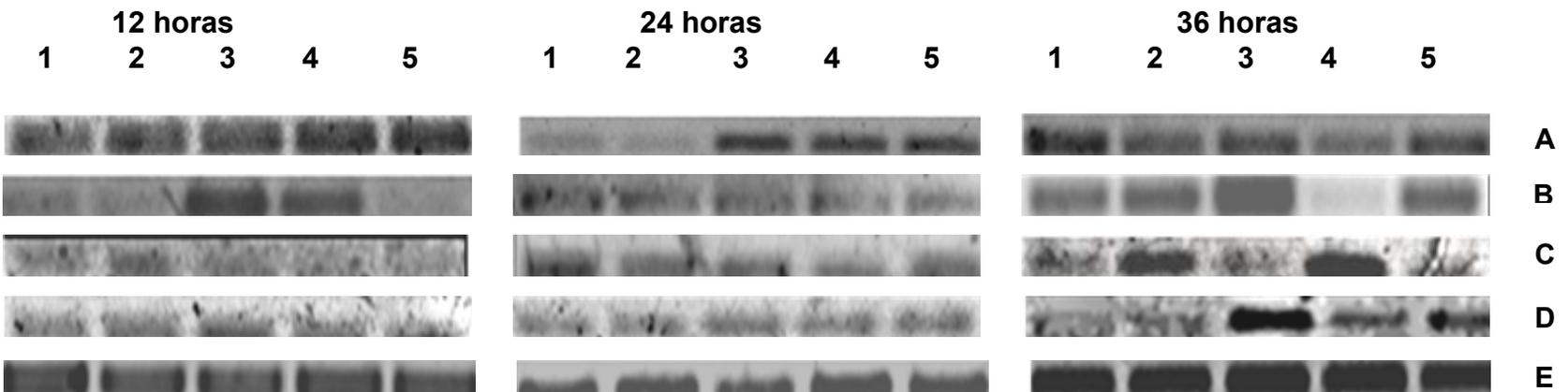


Figura 7.15 RT-PCR de la expresión a 12, 24 y 36 horas del gen *PR-1a* en distintos tejidos vegetales de *Arabidopsis thaliana* bajo la interacción con distintas cepas de *Trichoderma* sp. y en presencia de 30 μ M HgCl₂. **A**= partes aéreas sin HgCl₂; **B**=partes aéreas con HgCl₂; **C**= raíces sin HgCl₂; **D**= raíces con HgCl₂; **1**= sin interacción; **2**= interacción con *Trichoderma atroviride* cepa IMI; **3**= *Trichoderma virens* cepa 20-D; **4**=*T. virens* cepa 20-F; **5**= *T. virens* cepa 11

VIII. DISCUSIÓN

8.1 La interacción de *Trichoderma* spp., disminuye la toxicidad del Hg en *A. thaliana*

Se ha descrito el papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el etileno y los jasmonatos en respuesta de estrés, inclusive por metales pesados (Soresh *et al.*, 2005; Maksymiec *et al.*, 2007; DalCorso *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no se ha reportado que los microorganismos generen resistencia o disminuyan los efectos tóxicos de los metales pesados en las plantas, a pesar de que los microorganismos induzcan la síntesis de estas moléculas.

El haber empleado *A. thaliana* como modelo para evaluar el efecto de metales pesados bajo la interacción con *Trichoderma* spp., fue adecuado debido que es una planta sensible a metales pesados porque no es hiperacumuladora de metales como lo es *Arabidopsis halleri* (Huai *et al.*, 2006). Por lo tanto los resultados obtenidos, indican que *Trichoderma* spp., generan resistencia a Hg^{2+} en *Arabidopsis thaliana*.

Lo anterior debido que durante la interacción con *Trichoderma* spp, las plantas presentaron mayor porcentaje de sobrevivencia (\bar{x} 31.9%) en comparación con las plantas a las que únicamente les fue aplicado el tratamiento con $HgCl_2$ (16%). Por lo tanto esta respuesta podría asociarse a que *Trichoderma* spp., induzca la expresión del gen que participa en la síntesis de jasmonatos (*LOX-1*), y estos a su vez activen la expresión de *PDF1.2* (Soresh *et al.*, 2005; DalCorso *et al.*, 2010).

Por lo tanto, *Trichoderma* spp., al inducir e incrementar la expresión de *PDF1.2*, pudo haberse generado un aumento de los niveles de jasmonatos relacionándose con los procesos fisiológicos para disminuir los efectos tóxicos del $HgCl_2$ (Maksymiec *et al.*, 2007) que se observaron en *A. thaliana* bajo condiciones de invernadero, posiblemente por un incremento en los niveles de glutatión (GSH), relacionado con los niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2*, pero esto se retomará más adelante.

Los niveles de jasmonatos inducidos por *Trichoderma* spp., no fueron cuantificados en los tejidos vegetales, sin embargo, los distintos niveles de expresión de *PDF1.2* observados en los RT-PCR, podrían indicar que los niveles de jasmonatos estén

incrementados o disminuidos en *A. thaliana*. Debido que este gen se empleo como marcador de la producción de jasmonatos (Koorneeff *et al.*, 2008).

De haber diferencias en los niveles de jasmonatos inducidos por *Trichoderma* spp., el desarrollo de la resistencia y/o disminución de los efectos tóxicos del Hg^{2+} en *A. thaliana* estarían relacionados con los niveles de jasmonatos que influirían positivamente sobre los niveles de GSH en las células. Lo anterior surge porque en los RT-PCR de las plantas bajo la interacción con las cepas de *Trichoderma virens* (aisladas de suelos contaminados con Hg^0) se observó un incremento de la expresión de *PDF1.2*, *GSH1* y *GSH2* en comparación con la expresión de éstos en las plantas bajo la interacción con la cepa IMI (empleada como cepa de referencia).

Lo anterior se sustenta porque Xiang y Oliver (1998) al incrementar la concentración de ácido jasmónico encontraron un incremento en los niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2*. No obstante, para trabajos futuros será necesario cuantificar también los niveles de GSH en los tejidos vegetales y ver si hay alguna relación con la expresión observada de *GSH1* y *GSH2*.

Además se encontró que los genes *PR-1a*, *GSH1* y *GSH2*, también fueron inducidos por *Trichoderma* spp., en todos los tejidos de *A. thaliana*. Sin embargo, la expresión de *GSH1* y *GSH2* se pudo deber indirectamente por la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a*, por razones que se explicaran en breve.

Xiang y Oliver reportaron (1998) que la aplicación de tratamientos con ácido salicílico se induce la expresión de *GSH1* y *GSH2*, pero la expresión de éstos es más sensible al ácido jasmónico. En este estudio no aplicó ácido salicílico, se empleo *Trichoderma* spp., que induce la síntesis de salicilato (Harman *et al.*, 2004). Los niveles de salicilatos en los tejidos vegetales no se cuantificaron, sin embargo su producción fue determinada empleando la expresión del gen *PR-1a* como gen marcador de la producción de salicilatos.

La expresión de *GSH1* y *GSH2* fue mayor en las raíces, posiblemente porque **1)** es el tejido que está en contacto directo con el $HgCl_2$ y el que acumula los metales (Millán *et al.*, 2007), **2)** porque el GSH es un antioxidante y **3)** precursor de péptidos

quelantes (fitoquelatinas) de metales (Cobbett, 2000). Mientras que *PDF1.2* y *PR-1a* se expresaron de manera similar en todos los tejidos.

8.2 El $HgCl_2$ induce los genes implicados en la RSA-RSI pero no los genes de la vía de síntesis del glutati3n en *A. thaliana*.

Hasta el momento no se han reportado genes relacionados con la RSI que se induzcan por Hg (Heindereich *et al.*, 2001; Venkatachalam *et al.*, 2009). Sin embargo, se encontr3 que la expresi3n de *PDF1.2* fue inducida por $HgCl_2$ en los tejidos de *A. thaliana*, lo que hace suponer que el $HgCl_2$:**1**) induce la expresi3n de ACC sintasa para generar etileno e incrementar la actividad lipooxigenasa o **2**) que induzca la expresi3n de *LOX-1* y aumente la actividad lipooxigenasa, debido que algunos metales pesados inducen la expresi3n de *LOX-1* (DalCorso *et al.*, 2010) y ACC sintasa (Mart3nez, *et al.*, 2001; Soresh *et al.*, 2005; Avni *et al.*, 1994; Waldemar, 2007; Le3n *et al.*, (2010). Sin embargo, de cualquiera de esas dos posibilidades, el resultado final es la s3ntesis de jasmonatos para inducir la s3ntesis de GSH.

No obstante, no se ha reportado la posibilidad de que el $HgCl_2$ induzca la expresi3n de *LOX-1* y ACC sintasa en *A. thaliana* (Heindereich *et al.*, 2001) o en otras plantas (Venkatachalam, *et al.*, (2009) y se ha indicado que el $HgCl_2$ no incrementa la actividad lipooxigenasa (Sk3rzyńska, 2007). Sin embargo, la inducci3n (Venkatachalam *et al.*, (2009) y niveles de expresi3n (Xiang y Oliver, 1998) de los genes son influenciados por diferentes metales y distintas concentraciones. As3 que es posible que *LOX-1* y ACC sintasa se est3n expresando en *A. thaliana* por efectos del $HgCl_2$.

Quiz3 los niveles de jasmonatos inducidos por $HgCl_2$ sean bajos en comparaci3n con los niveles inducidos por *Trichoderma* spp. Esto se sugiere porque la expresi3n de *PDF1.2* se observ3 disminuida en el grupo de plantas de *A. thaliana* bajo el tratamiento de $HgCl_2$ en comparaci3n con las plantas bajo la interacci3n con *Trichoderma* spp. No obstante, *Trichoderma* spp. inducen la expresi3n de *LOX-1* y ACC sintasa (Soresh *et al* 2005) y cuando se aplica el tratamiento con $HgCl_2$ la expresi3n de *PDF1.2* se intensifica reflej3ndose en la expresi3n de *GSH1* y *GSH2*.

También se observó que el HgCl_2 indujo la expresión de *PR-1a*, lo cual coincide con lo reportado por Heindereich et al., (2001) y Venkatachalam y colaboradores (2009) quienes encontraron que *PR-5a* y *PR-2* son inducibles por HgCl_2 , ambos están implicados en la RSA, al igual que *PR-1a*.

Además, los genes *GSH1* y *GSH2*, implicados en la vía de síntesis del glutatión, no fueron inducidos e incluso el HgCl_2 afectó sus expresiones disminuyéndoles, esto al comparar la expresión de ambos genes con la expresión en las plantas a las cuales no se les aplicó el tratamiento con HgCl_2 . Estos resultados sobre la expresión de *GSH1* y *GSH2* también son acordes a lo reportado por Heindereich y colaboradores (2001) y Venkatachalam et al., (2009), ya que no reportaron la inducción de *GSH1* y *GSH2* por HgCl_2 .

La expresión que se observó de *GSH1* y *GSH2* en los RT-PCR de *A. thaliana* bajo el tratamiento con HgCl_2 corresponde a la expresión basal, por lo que es importante que quede claro que *GSH1* y *GSH2* no son inducidos por Hg. El GSH es sintetizado normalmente en las células para aliviar el estrés oxidativo (Xiang y Oliver, 2002; Vivancos et al, 2010; Noctor y Foyer, 2011), por esa razón se observa la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* y sirve como punto de referencia para comparar su expresión en **a)** condiciones de estrés por HgCl_2 y **b)** bajo la interacción con *Trichoderma* spp., en *A. thaliana*.

Los genes *GSH1* y *GSH2* inducen su expresión por metales pesados, incrementando su expresión con Cd y Cu en un rango de concentraciones entre 25-100 μM (Xiang y Oliver, 1998), no obstante el Hg resulta ser altamente tóxico que no son inducidos bajo la concentración de 30 μM de HgCl_2 , con esto queda claro que la concentración es un factor decisivo que determina la inducción, incremento de la expresión o represión génica.

Por lo anterior, se conocen los genes inducibles por HgCl_2 (Heindereich et al., 2001; Venkatachalam et al., 2009) pero podrían expresarse otros genes distintos al interactuar con microorganismos, por ejemplo *Trichoderma* sp. Sin embargo, al no haber trabajos que indiquen los genes que se inducen en las plantas durante la interacción con *Trichoderma* y bajo condiciones de estrés por metales pesados, no se

sabe qué genes se estén induciendo. Por tal motivo los resultados obtenidos en este trabajo no pueden ser comparados con otros estudios ya que es la primera investigación que trata de explicar el efecto de *Trichoderma* en *A. thaliana* bajo estrés por metales pesados para su posible aplicación en la fitorremediación.

8.3 *Trichoderma* pudiera modificar los niveles de Hg en el suelo relacionándose con la inducción y niveles de expresión génica.

Trichoderma spp., pudiera estar modificando la concentración final de HgCl_2 en el sustrato, ya que los resultados indican que **1)** la biomasa de *Trichoderma* acumula Hg^{2+} , además **2)** las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp., presentaron los niveles más bajos de Hg^{2+} en sus tejidos vegetales. Por lo tanto, las plantas del grupo *A. thaliana-Trichoderma* spp. con el tratamiento de HgCl_2 , pudieran absorber niveles bajos de Hg^{2+} , y tal vez presentándose una inducción y niveles de expresión génica completamente distintos, como los reportados en *A. thaliana* (Heindereich *et al.*, 2001) y en *Sesbania drummondii* bajo distintas concentraciones de HgCl_2 (Venkatachalam, *et al.*, (2009).

Si las concentraciones de HgCl_2 disminuyeran por efecto de *Trichoderma* spp., pudiera encontrarse la expresión de otros genes en *A. thaliana*, que en concentraciones relativamente elevadas de HgCl_2 estén inhibidos o muestren niveles de expresión bajos que no sean perceptibles en un RT-PCR semicuantitativo, por ese motivo se recomienda efectuar RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión génica debido a la sensibilidad de esta técnica.

El que *Trichoderma* spp. modifiquen los niveles de Hg^{2+} es importante, porque la concentración de metales en las plantas modula los niveles de expresión génica, Xiang y Oliver (1998) reportaron que la expresión de *GSH1*, *GSH2* y glutatión reductasa (*GR1*) presentan mayor sensibilidad a Cd que a Cu, indicando que al aumentar la concentración de Cd la expresión de éstos disminuye, más no así en el tratamiento con Cu. Con esto se trata de decir que el Cd es más tóxico que el Cu y por ello la expresión disminuye. Si se toma como referencia el grado de toxicidad por metales reportado para *Trichoderma harzianum* $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Zn}$ (Krantz *et al.*, 1995), entonces se esperaría que dosis altas de HgCl_2 tengan un efecto negativo sobre la

inducción y expresión de los genes en *A. thaliana*, en particular de *GSH1* y *GSH2*, debido que en los RT-PCR de la expresión de *GSH1* y *GSH2* se observó que son sensibles a Hg^{2+} : El gen *GSH1* mostró mayor sensibilidad a Hg que *GSH2*.

Entonces, si *Trichoderma* modifica los niveles de $HgCl_2$ disminuyéndolos en el sustrato, entonces la planta absorbe menos Hg^{2+} , y posiblemente por esta razón se observen niveles de expresión más altos de *PDF1.2*, *PR-1a*, *GSH1* y *GSH2* en las plantas de los grupos de *A. thaliana-T. virens* bajo el tratamiento con $HgCl_2$ que en las plantas bajo el tratamiento con $HgCl_2$, inclusive en las plantas bajo la interacción con la cepa IMI.

8.4 La expresión de GSH1 y GSH2 continua afectada por Hg en A. thaliana a pesar de la interacción con Trichoderma spp.

Como se había mencionado, la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* fue afectada por el $HgCl_2$, pero esto ocurre aún bajo la interacción con *Trichoderma* spp. Posiblemente porque los niveles de ROS que el Hg^{2+} generó en *A. thaliana*, continúan disminuyendo la expresión de *GSH1* y *GSH2* y por lo tanto el efecto de los jasmonatos, inducidos por *Trichoderma* spp., sobre su expresión también se vean reducidos (Xiang y Oliver, 1998) influyendo sobre los niveles de GSH.

Probablemente los niveles de ROS sean la razón por la cual su expresión en los tejidos vegetales se observe inhibida y disminuida a las 12 y 24 horas, respectivamente posteriores a la aplicación de $HgCl_2$, observándolo tanto en los grupos con y sin la interacción. Lo cual indica que el GSH se regenera normal y paulatinamente a partir de las 24 horas para disminuir los niveles de ROS en *A. thaliana* y permitir la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 2001) para que aumenten los niveles de GSH.

Los niveles de GSH disminuyen ante situaciones de estrés oxidativo oxidándose a disulfuro de glutatión (GSSG) disminuyendo así los efectos tóxicos de las ROS generadas por los metales pesados. No obstante, las células regeneran sus niveles de GSH mediante la enzima glutatión reductasa (GR), reduciendo el GSSG a GSH, de este modo el GSH continua con su actividad antioxidante (Xiang y Oliver, 2001; Sarry *et al.*, 2006 *in* Hernández *et al.*, 2012)

Ahora bien, en las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp., los resultados sobre la expresión de *GSH1* y *GSH2*, sugieren que los niveles de ROS disminuyen de manera acelerada a partir de las 24 horas posteriores de haber aplicado el tratamiento con HgCl_2 , lo cual pudiera estar relacionado con los niveles normales de GSH en la célula (Vivancos *et al.*, 2010) y un efecto aditivo de **1**) la expresión de *PR-1a*, indicando la presencia de ácido salicílico, para reducir los niveles de ROS (Zhou *et al.*, 2009) aunado **2**) con la capacidad de *Trichoderma* spp., para disminuir la concentración de Hg^{2+} en el sustrato, reflejándose en los bajos niveles de Hg^{2+} encontrados en los tejidos vegetales. Entonces al haber menos Hg^{2+} disponible para su absorción, los niveles de ROS en *A. thaliana* son bajos y su efecto negativo disminuye rápidamente. De este modo la expresión de *GSH1* y *GSH2* vuelve a ser estimulada por los jasmonatos inducidos por *Trichoderma* para incrementar los niveles de GSH.

Lo anterior se sustenta debido que la expresión de *GSH1* y *GSH2* se observó incrementada en las plantas bajo la interacción con las cepas de *T. virens* en comparación con las plantas sin la interacción.

No obstante, las plantas bajo el tratamiento con HgCl_2 y el grupo de plantas bajo la interacción con la cepa IMI, mostraron un nivel de expresión similar, indicativo que **1**) los niveles de ROS fueron similares en ambos grupos y que **2**) la cepa IMI presenta disminuida su capacidad para disminuir la concentración de Hg^{2+} en el sustrato, posiblemente relacionada por su capacidad de bioacumular Hg^{2+} en su biomasa ($6.82 \times 10^6 \text{ mg/Kg}^{-1}$) en comparación con los niveles de Hg^{2+} encontrados en la biomasa de *T. virens* ($\bar{x} 9.3 \times 10^7 \text{ mg/Kg}^{-1}$).

Además, de estos resultados se deduce que el mecanismo por el cual *Trichoderma* spp., disminuye **1**) la disponibilidad de Hg^{2+} en el sustrato y por tanto **2**) los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales, es por la bioacumulación y no por su volatilización. Debido que la cepa IMI presentó una alta capacidad para generar Hg volátil (la cual se describe más adelante), no obstante este puede absorberse vía estomática (Crane *et al.*, 2011), entonces *A. thaliana* estaría absorbiendo Hg^{2+} por las raíces y reabsorbiéndolo por las hojas. Por lo tanto los niveles de ROS en las plantas aumentan y disminuyen lentamente, es decir como si no estuviera presente la cepa

IMI. Mientras que *T. virens*, al acumular el Hg^{2+} en su biomasa y presentar baja capacidad de volatilizarlo, disminuye el Hg^{2+} disponible en el sustrato y por eso los niveles de ROS en las plantas bajan rápidamente en las células para permitir la expresión de *GSH1*, *GSH2* y el efecto de los jasmonatos sobre la expresión de éstos.

8.5 La expresión de *GSH2* y *GSH1* ocurre primero en las partes aéreas

Debido que *Trichoderma* spp., **1**) presentaron la capacidad de volatilizar Hg (la cual se discute líneas abajo) y que **2**) la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* bajo el tratamiento con HgCl_2 se hayan observado primero en las partes aéreas que en las raíces. Podría explicar la causa de haber encontrado la expresión de *GSH1* y *GSH2* en las partes aéreas a 12 horas de aplicado el HgCl_2 y no se haya observado expresión de *GSH1* en las raíces.

Se puede deber a que los bajos niveles de Hg volátil emitido por *T. virens* sean absorbidos por los estomas (Selin, 2009; Crane *et al.*, 2011) pero no en niveles que incrementen los niveles de ROS, los cuales pudieran disminuir por efecto de los salicilatos (Zhou *et al.*, 2009) inducidos por *Trichoderma*, de manera que los jasmonatos inducidos por *T. virens* induzcan la expresión de *GSH1* y *GSH2*. En cambio, la cepa IMI emite una mayor concentración de Hg volátil (**Tabla 7.4**), por lo que la concentración de Hg absorbido por los estomas pudiera ser mayor, incrementando los niveles de ROS que posiblemente el efecto de los salicilatos sea menor y no reduzcan rápidamente los niveles de ROS, reprimiendo la expresión de *GSH1* y *GSH2* hasta que los niveles de ROS disminuyan.

Esta puede ser una explicación adecuada, puesto que las raíces son los tejidos cercanos al lugar donde se aplicó el HgCl_2 , por lo tanto el estrés es mayor y los niveles de ROS se incrementan bloqueando la expresión de *GSH1* y *GSH2*, según lo reportado por Xiang y Oliver (1998)

No obstante estas son hipótesis que deberán ser comprobadas, sin embargo el haber encontrado que *Trichoderma* volatiliza el Hg y que los salicilatos disminuyen las ROS, ayudo a entender y explicar el porqué la expresión de *GSH1* y *GSH2* sucede de manera diferencial en los tejidos vegetales.

En tanto que en las plantas sin la interacción con *Trichoderma* los niveles de ROS pudieran estar incrementados en todos los tejidos y la expresión de *GSH1* y *GSH2* queda reprimida hasta que los niveles de ROS disminuyan de manera normal.

En otras palabras, *Trichoderma* spp., volatilizan el Hg y posiblemente la planta lo reabsorbe mediante los estomas, sin embargo los ROS producidos por Hg disminuyen por efecto de los salicilatos de manera rápida permitiendo la expresión de *GSH1* y *GSH2*.

Otra posibilidad de que la expresión ocurra primero en las partes aéreas, pudiera deberse a que en las hojas se efectúa la síntesis de GSH y además son los tejidos donde se acumula el GSH (Wachter, *et al.*, 2005). Por tal motivo, cuando la planta se estresa con Hg los niveles de GSH disminuyen en los todos los tejidos y los niveles requieren aumentar para disminuir los efectos tóxicos de las ROS, por tal motivo pudiera observarse la expresión de *GSH2* y *GSH1* en las partes aéreas a 12 horas de aplicado el tratamiento.

Una vez que se sintetiza el GSH en las partes aéreas, es transportado a las raíces (Xiang y Oliver, 2001; Wachter, *et al.*, 2005; Ben Ammar *et al.*, 2008). Una vez en las raíces pudiera ser ocupado para la síntesis de fitoquelatinas o simplemente actuar como antioxidante para reducir los efectos tóxicos de las ROS disminuyéndolos para que puedan expresarse los genes, por tal motivo la expresión de *GSH1* y *GSH2* en las raíces podría haber ocurrido hasta 24 horas después de la aplicación del tratamiento con Hg.

8.6 La expresión de *GSH1* es sensible a Hg en comparación con *GSH2*

La expresión de *GSH1* y *GSH2* ocurrió primero en sitios distantes de la aplicación del tratamiento en las plantas bajo la interacción con *Trichoderma*, no obstante la expresión de *GSH1* en las raíces se observó tiempo después en comparación con la expresión de *GSH2*. Esto indica que la expresión de *GSH1* es afectada por Hg en comparación con *GSH2*.

El que el Hg no afecte la expresión de *GSH2* en las raíces, pudiera deberse a que codifica la enzima cuyo producto final es el GSH. El GSH es sintetizado en las células aún en condiciones normales para aliviar el estrés oxidativo. Entonces después de haber aplicado el HgCl₂, la expresión de *GSH2* no se reprime y la síntesis de GSH continua para reducir los efectos tóxicos de los ROS mientras tanto la expresión de *GSH1* se mantiene reprimida.

Se sugiere lo anterior, porque los niveles de γ -glutamil cisteína (el cual es precursor de GSH) son elevados en las raíces y en su síntesis participa *GSH1* (Xiang y Oliver, 2001), no obstante el HgCl₂ reprimió su expresión. Entonces las reservas de γ -glutamil cisteína de las raíces serían ocupadas por la enzima GSH sintetasa (codificada por *GSH2*) para producir GSH y aliviar el estrés oxidativo para disminuir los niveles de ROS y permitir posteriormente la expresión de *GSH1* y generar más γ -glutamil cisteína.

8.7 La expresión de GSH1 y GSH2 se asocia a la expresión de PDF1.2

Como se ha venido diciendo los jasmonatos inducen la expresión de *GSH1* y *GSH2*, sin embargo cuando hay estrés por metales pesados los niveles de jasmonatos aumentan pero también las ROS. Sin embargo, las ROS disminuyen el efecto de los jasmonatos, puesto que la expresión de *GSH1* y *GSH2* están reprimidos, principalmente en las raíces, pero conforme pasa el tiempo se observa su expresión y como aumenta paulatinamente, sobre todo en las plantas bajo la interacción con las cepas de *Trichoderma* en las cuales se observa un incremento en la expresión de *PDF1.2*.

Para entender lo anterior, es necesario saber que las ROS provienen de la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares, no obstante, para la síntesis de jasmonatos se efectúa una peroxidación de las membranas de los cloroplastos. No obstante, se conocen dos tipos de peroxidación, **1)** la enzimática y la **2)** no enzimática. Ambos tipos de peroxidación son desencadenados por metales pesados (Maksymiec *et al.*, 2007). En el primer tipo de peroxidación, interviene *Trichoderma*, y probablemente el HgCl₂, induciendo la expresión de *LOX-1* e incrementando la

actividad lipooxigenasa (Soresh, 2005; DalCorso *et al*, 2010) desencadenando en la síntesis de jasmonatos y disminuyendo los efectos citotóxicos de ROS mediante la actividad antioxidante de GSH (Xiang y Oliver, 2001; Cobbett y Goldsbrough, 2002) reflejándose en resultados observados en el invernadero.

En cambio en la peroxidación no enzimática, el Hg^{2+} incrementa considerablemente los niveles de ROS mediante la reacción de Fenton (Heidenreich *et al.*, 2001; Venkatachalam *et al.*, 2009), dañando todas las membranas celulares y en base a lo observado en los RT-PCR afecta considerablemente la expresión de *GSH1* y *GSH2* reprimiéndola por 12 horas.

Así que la síntesis de jasmonatos inducida por *Trichoderma* sp., va acompañada de la producción de ROS pero que permiten la expresión de *GSH1* y *GSH2*, al menos es lo que se puede deducir de los resultados obtenidos. No obstante, si la planta se estresa con Hg los niveles de ROS aumentan y reprimiendo y disminuyendo la expresión de *GSH1* y *GSH2*, hasta que los niveles de ROS disminuyan.

8.8 *Trichoderma* induce la expresión de *GSH1* y *GSH2*

Por otro lado se había mencionado que la interacción de *Trichoderma* causó el incremento de la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* bajo estrés por $HgCl_2$, justificándose en el supuesto que los niveles de jasmonatos estuvieran correlacionados con la expresión de *PDF1.2*. Además induce la síntesis de salicilatos los cuales reducen los niveles de ROS (Zhou *et al.*, 2009), y que se discutirá más adelante.

Hay que recordar que los jasmonatos inducen incrementando la expresión de *GSH1* y *GSH2*, mientras que los metales solamente inducen su expresión (Xiang y Oliver, 1998). Es decir, que en situaciones de estrés por metales la planta responde expresando *GSH1* y *GSH2*. Pero en este estudio se reporta que los microorganismos que inducen la síntesis de jasmonatos incrementan la expresión de *GSH1* y *GSH2*.

Debido que se ha reportado que las plantas transgénicas con genes de la vía del glutatión generan resistencia a metales pesados (Sarowar *et al.*, 2005; Yadav, 2010), los resultados observados en el invernadero y con los niveles de expresión de *GSH1* y

GSH2 observados en las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp., indican que *Trichoderma* genera resistencia a metales pesados. Únicamente debe considerarse que el Hg es altamente tóxico (Hussein *et al.*, 2007; Bradl, 2005; Zahir *et al.*, 2005) así que el efecto con otros metales como Cd o Cu podría ser mayor al que se observó con Hg.

El incremento de la expresión de *GSH1* y *GSH2* en las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp. bajo el tratamiento con HgCl₂, podría relacionarse con un aumento de los niveles de GSH. El posible incremento de los niveles de GSH se justifica por la disminución de los efectos tóxicos del HgCl₂, el incremento del crecimiento vegetal y en la producción de inflorescencias (Ogawa, *et al.*, (2004; Vivancos *et al.*, (2010; Yadav, 2010; Wójcik y Tukiendorf, 2011; Rugh, 2001; Rouhier *et al.*, 2008) observados en el invernadero.

8.9 *Trichoderma*; buen candidato como agente bioremediador

A continuación se deja a un lado el aspecto molecular generado durante la interacción de *Trichoderma* spp. en *A. thaliana* bajo estrés por HgCl₂ para discutir las características de *Trichoderma* asociadas a disminuir los niveles de Hg en los tejidos y sus efectos tóxicos en *A. thaliana* que se observaron bajo condiciones de invernadero.

Primeramente, se encontró que las cepas de *Trichoderma* spp. empleadas en el presente trabajo **producen compuestos indólicos**, los cuales estén estimulando el crecimiento de *A. thaliana* bajo situaciones de estrés por HgCl₂. Entre los efectos tóxicos del Hg se encuentra el inhibir el crecimiento vegetal al aumentar la actividad de la enzima (IAA oxidasa) para degradar las hormonas (auxinas derivadas de indoles) que estimulan el crecimiento vegetal (Munzuroğlu, 2008; Rai y Tripanthi, 2008 ;Xu, *et al.*, 2010).

Entonces, el crecimiento de *A. thaliana* observado en invernadero y bajo el tratamiento de 40µM de HgCl₂ (**Figura 7.9, 7.10**) posiblemente esté relacionado con *Trichoderma* spp. y no solo por los efectos del GSH, debido que **1)** reducen el estrés por Hg²⁺ y **2)** sus niveles en los tejidos vegetales. Entonces *Trichoderma* spp estarían brindando a *A. thaliana* los compuestos indólicos para estimular el crecimiento, y al

estar disminuidos los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales la actividad de la IAA oxidasa disminuye.

Además del incremento del crecimiento, el aumento de la floración observado en invernadero pudo estar influenciada por efectos del GSH y jasmonatos inducidos por *Trichoderma* (Ogawa, *et al.*, (2004; Rouhier *et al.*, 2008; Wasternack, 2006; Foyer y Noctor, 2011), como se ha venido diciendo la interacción con *Trichoderma* incrementó la expresión de *PDF1.2*, *PR-1a* y posiblemente los niveles de GSH, reflejándose en un incremento del crecimiento y producción de inflorescencias observadas en invernadero.

Otra característica importante de *Trichoderma* spp., es que **son endófitos** al haberse aislado en todos los tejidos vegetales de *A. thaliana*. La mayor incidencia ocurrió en las partes aéreas, esto **1)** ayuda a entender el porqué los niveles de Hg se encuentran disminuidos relacionándose con la capacidad de *Trichoderma* de volatilizar el Hg. Además, la frecuencia de colonización también **2)** sugiere una explicación del porqué sucedió la expresión de *GSH1* y *GSH2* primero en los tejidos de las partes aéreas y luego en las raíces, debido que se ha indicado que la expresión de genes en las plantas es alterada durante la colonización por *Trichoderma* sp. (Bailey *et al.*, 2006).

Se ha reportado que la colonización de varias especies de *Trichoderma* en plantas de cacao (*Theobroma cacao*) inducen la expresión de genes relacionados con el estrés, tales como *GST* (glutación-S- transferasa) y la familia de genes relacionados con la acuaporinas (Bailey *et al.*, 2006).

Esta referencia es importante, ya que la expresión de *GST* genera resistencia a Cd, al menos es lo que se ha reportado en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* con el gen de la *gst* de *Trichoderma virens* (Dixit *et al.*, 2011), mientras que las acuaporinas permiten que la planta absorba agua (Patra y Sharma, 2000).

Lo anterior indica el papel que tiene *Trichoderma* en la inducción de la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana*, debido que solamente se había reportado la expresión de éstos al aplicar tratamientos con ácido jasmónico y ácido salicílico (Xiang y Oliver, 1998). Pero al observar que *Trichoderma* **1)** disminuye los efectos tóxicos del Hg, **2)** induce la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a* generando un sinergismo de las vías RSI y

RSA (Spoel *et al.*, 2003), **3**) el ser endófito y que modifique la expresión génica en las plantas (Bailey *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2008), **4**) el haber reportes de plantas transgénicas con genes de *T. virens* (Dixit *et al.*, 2011), y **5**) que las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* disminuyan los niveles de Hg^{2+} en sus tejidos en comparación con las plantas sin la interacción (\bar{x} $4.88 \times 10^8 \text{ mg/Kg}^{-1}$ vs. $9.9 \times 10^8 \text{ mg/Kg}^{-1}$). Confirman que *Trichoderma* es un microorganismo capaz de generar resistencia a metales pesados y que su empleo como agente de biorremediación podría ser eficaz.

Un aspecto novedoso e importante que surgió de este trabajo es que por primera vez que se reporta que *Trichoderma* spp., volatiliza el Hg, por lo que sería interesante ampliar las investigaciones y buscar los genes implicados en este mecanismo. Este mecanismo ha sido ampliamente reportado en procariotas y en levaduras (Gadd, 2001; Tabak *et al.*, 2005). No obstante ha reportado que algunos hongos filamentosos transforman y volatilizan compuestos inorgánicos de As, Te y Se (Gadd, 2001; Sing, 2006).

Entre los hongos filamentosos que metilan compuestos de As generando vapores, se encuentra *Gliocladium roseum* (Sing, 2006), el cual se encuentra filogenéticamente relacionado con *Trichoderma* (Kubicek *et al.*, 1998), por lo tanto posiblemente *Trichoderma* metile el Hg generando su volatilización.

Por otra parte, estos resultados determinaron que *Trichoderma* spp., presentan una resistencia natural al Hg, esto **1**) al comparar el crecimiento radial de la cepa IMI y *T. virens* bajo distintas concentraciones de HgCl_2 y **2**) posiblemente relacionándose a que la cepa IMI generó mayor concentración de vapores de Hg que las cepas de *T. virens*.

Además, los resultados obtenidos del Hg volátil por *Trichoderma* spp. son acordes a las concentraciones de Hg^{2+} registradas en su biomasa, debido que las cepas de *T. virens* generaron menor concentración de vapores de Hg (\bar{x} $213.04 \mu\text{g/m}^{-3}$) y acumularon mayor Hg^{2+} en su biomasa (\bar{x} $9.3 \times 10^6 \text{ mg/Kg}^{-1}$), mientras que en la cepa IMI sucedió lo contrario ($513.52 \mu\text{g/m}^{-3}$ y $6.82 \times 10^6 \text{ mg/Kg}^{-1}$).

No se tiene la certeza si los niveles de Hg^{2+} registrados en su biomasa se deban a la bioacumulación o la biosorción, ya que se han reportado ambos mecanismos en *Trichoderma* spp. (Krantz y Schnürer, 1993; Raspanti *et al.*, 2009).

No obstante, los resultados sugieren que *Trichoderma* spp., presentan distintos mecanismos de resistencia a Hg (**Figura 8.1**), y que éstos son característicos para cada especie. Posiblemente las cepas de *T. virens* presenten la bioacumulación o biosorción como mecanismo principal de resistencia a Hg, mientras que en la cepa IMI pudiera ser la biotransformación (volatilización).

Estas características son esenciales para que *Trichoderma* subsista en sitios contaminados con metales pesados, xenobióticos, hidrocarburos, etc (Argumedo *et al.*, 2009).

Lo anterior es importante, debido que se encontró que los niveles de resistencia de *Trichoderma* se correlacionan con los niveles de Hg^{2+} en los tejidos de *A. thaliana* (ver **Tabla 7.1** y **Tabla 7.5**). Las plantas bajo la interacción con la cepa IMI, que fue caracterizada como resistente a Hg, a pesar de no haber sido aislada de suelos contaminados con Hg, disminuyó considerablemente los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales (3.99×10^8 mg/Kg⁻¹). En comparación con los tejidos vegetales de las plantas bajo la interacción con las cepas de *T. virens* (\bar{x} 5.18×10^8 mg/Kg⁻¹), que fueron caracterizadas como medianamente resistentes, sensibles e hipersensibles a Hg, a pesar de haber sido aisladas de suelos contaminados con mercurio.

Las posibles explicaciones a los bajos niveles de Hg^{2+} en *A. thaliana* serian porque **1)** el micelio de *Trichoderma* spp., presente en el sustrato volatilice (cepa IMI) y/o acumule (*T. virens*) el Hg, disminuyendo su concentración en el sustrato, de este modo la planta absorbe menos cantidad de Hg, y/o **2)** debido que las cepas de *Trichoderma* evaluadas son endófitas y generan Hg volátil, unas más que otras, podría ser que *A. thaliana* emita estos vapores a través de los estomas (Selin, 2009; Crane, 2011).

En otras palabras, *Trichoderma* spp. disminuyen los niveles de Hg de manera exógena (en el sustrato) y/o endógena (al ser endófitos volatilizándolo).

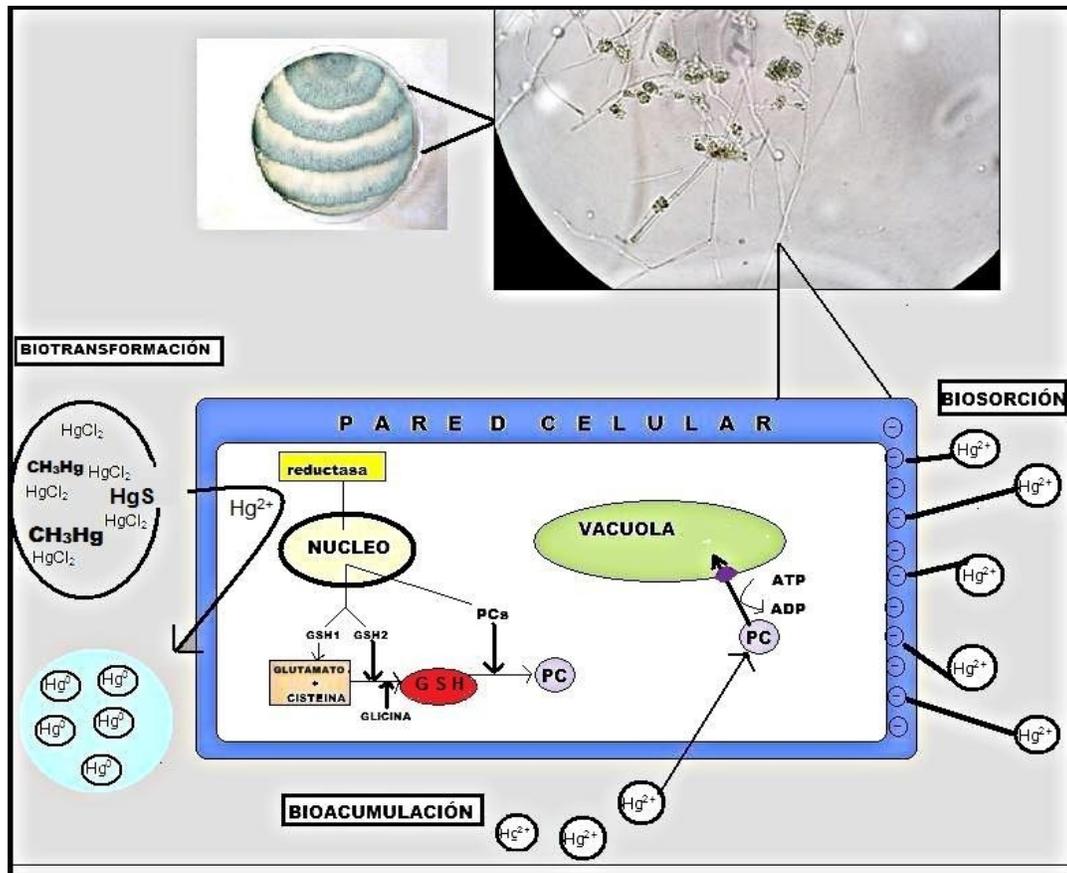


Figura 8.1 Procesos por los cuales *Trichoderma* spp. posiblemente han generado resistencia a metales pesados. En la imagen superior izquierda se observa *Trichoderma* spp. en medio de cultivo sin HgCl_2 y en la imagen superior derecha una fotografía bajo el microscopio en 100X. En la imagen inferior se esquematizan los procesos de 1) volatilización de Hg, sin embargo al ser el primer reporte de que *Trichoderma* causa su volatilización aún se desconoce si cambia el estado de oxidación o lo transforma, 2) bioacumulación las fitoquelatinas (PC) quelan el Hg^{2+} formando un complejo PC- Hg^{2+} que es transportado a la vacuola mediante proteínas transportadoras ABC (esquematizado con un círculo morado en la vacuola) y 3) biosorción en la cual existe atracción electrostática de las cargas de la pared celular (-) con las cargas de los metales (+) (Bernal, 2011).

Es importante mencionar que las diferencias entre cepas de *Trichoderma* spp. sobre los niveles de Hg en los tejidos vegetales no fueron significativas ($P > 0.05$). Así que el empleo de *Trichoderma* spp., sea nativa de sitios contaminados o no, son viables como agentes de biorremediación 1) debido que no promueve que las plantas acumulen el Hg y 2) disminuyen sus efectos tóxicos y generan el crecimiento vegetal ante el estrés por Hg. Solo faltaría cuantificar los niveles de Hg en el sustrato.

No obstante, se sugiere seguir investigando el papel de la cepa IMI y las cepas 20-D y 20-F de *T. virens* por los efectos que estas produjeron en *A. thaliana* bajo condiciones de invernadero.

En contraste los niveles de Hg^{2+} en las plantas sin la interacción con *Trichoderma* se encontraron incrementados en las raíces, coincidiendo con lo reportado en: **1)** plantas tolerantes a mercurio nativas de la región de Almadén, España donde también existen problemas de contaminación por Hg^{2+} debido a la explotación del cinabrio (Millán *et al.*, 2007) y en **2)** plantas transgénicas de *N. tabacum* con los genes *merB* y *merA*, las cuales incrementaron la acumulación de Hg^{2+} en sus raíces de las plantas (Hussein *et al.*, 2007). Además estas plantas presentaron **a)** mayor daño por Hg, **b)** menor crecimiento y baja sobrevivencia y **c)** la expresión de *GSH1* y *GSH2* están disminuidas.

Por lo tanto, *Trichoderma* además de inducir los genes *GSH1* y *GSH2*, disminuir los niveles de Hg^{2+} en los tejidos vegetales, reducir los efectos tóxicos del Hg, además el ser cosmopolita, ser fácil de aislar y no requerir de condiciones específicas para su crecimiento son características adecuadas que hacen a *Trichoderma* como candidato a agente de biorremediación (Mrozik y Piotrowska-Segel, 2009 in Zawiercha y Malina, 2011; Vullo, 2003) que pudiera potenciar la fitorremediación.

Nuevamente, retomando el aspecto molecular, es necesario recordar que la cepa IMI muestra resistencia a Hg disminuyendo los niveles de éste en los tejidos vegetales. Sin embargo, el que la cepa IMI no sea haya aislado de suelos contaminados con Hg, pudo influir en la inducción de la expresión de *PDF1.2*, *PR-1a* y estos a su vez en la expresión de *GSH1* y *GSH2* observados en los tejidos de *A. thaliana*, debido que las cepas de *T. virens* son nativas de sitios contaminados con Hg e incrementaron la expresión de estos genes.

La posible respuesta del por qué *T. virens* induzcan un incremento en la expresión de *GSH1* y *GSH2* en comparación con la cepa IMI, podría estar relacionada con la intensidad con la cual se induce el sinergismo de las vías del salicílico (RSA) y jasmónico (RSI) en *A. thaliana*. Tanto la cepa IMI como las cepas de *T. virens* inducen

la RSI y la RSA, observándose una expresión simultánea de *PDF1.2* y *PR-1a* en los tejidos de *A. thaliana*.

Se ha reportado que la RSA y la RSI son vías mutuamente antagónicas, sin embargo *Trichoderma* spp. es capaz de inducir las al mismo tiempo (Spoel *et al.*, 2003; Koornneff *et al.*, 2008). Por lo tanto el sinergismo entre ambas podría tener un efecto directo en *A. thaliana* induciendo los mecanismos de detoxificación y generando una resistencia a Hg en las plantas.

En otras palabras, podría ser que las cepas de *Trichoderma* aisladas de sitios contaminados con Hg induzcan de manera eficaz el sinergismo de los jasmonatos y salicilatos, induciendo que los niveles de GSH aumenten por las razones anteriormente expuestas. Así que el sinergismo entre RSA y RSI podría deberse al Hg²⁺ y los niveles de GSH modulen las vías de señalización de RSI y RSA (Mhamdi *et al.*, (2010 *in* Noctor y Foyer, 2011).

Este trabajo, es el primero que indica una posible relación entre el efecto en conjunto de los salicilatos y jasmonatos sobre la resistencia a Hg. Además, propone que el Hg podría potenciar la RSI (vía de los jasmonatos) inducida por *Trichoderma* para incrementar la expresión de *GSH1* y *GSH2* y disminuir los efectos tóxicos del Hg en *A. thaliana*. No obstante el papel de los salicilatos aún es poco claro, ya que aunque disminuyen los niveles de ROS (Zhou *et al.*, 2009), no incrementan la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998).

La mayor relevancia del presente trabajo es que *Trichoderma* spp., incrementan la expresión de *GSH1* y *GSH2* generando disminución de los efectos tóxicos del Hg. Hasta el momento la resistencia a metales pesados había sido evaluada en plantas transgénicas con *GSH1*, *GSH2* y genes involucrados con la RSA (quitinasas de *Trichoderma*), las cuales desarrollan resistencia a Hg en niveles que resultan letales en las plantas con genotipo silvestre (Dana *et al.*, 2006; Sarowar *et al.*, 2005; Yadav, 2010).

En base a lo que se ha discutido, surge el modelo que se describe a continuación.

8.10 Probable efecto sinérgico de *Trichoderma* y Hg^{2+} incrementa los niveles endógenos de jasmonatos generando la resistencia a Hg^{2+} .

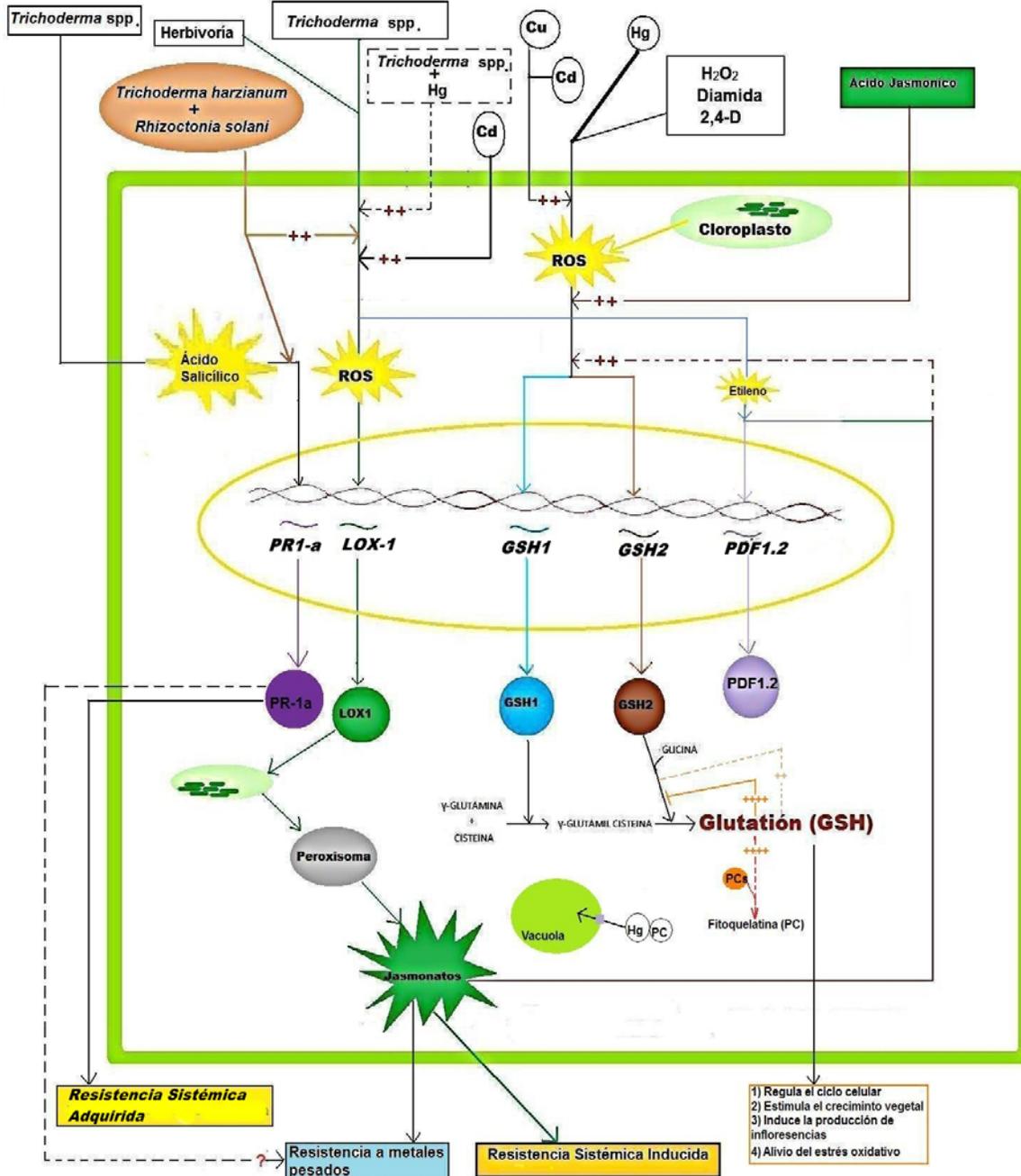


Figura 8.2 Modelo que sugiere que *Trichoderma* spp. sensibiliza (priming) a *A. thaliana* a un posible estrés por Hg^{2+} , además sugiere un efecto sinérgico *Trichoderma*- Hg^{2+} que probablemente incremente la expresión de *lox1* intensificando los niveles de jasmonatos que a su vez estarían induciendo un aumento de los niveles de GSH generando resistencia a Hg^{2+} . Queda en duda el papel del ácido salicílico en la generación de resistencia a Hg^{2+} . Las líneas punteadas esquematizan las vías de señalización hipotéticas que surgen de los resultados obtenidos, mientras que las líneas continuas hacen referencia a las vías de señalización reportadas por otros autores (Bernal, 2011).

Se ha reportado que *Trichoderma* spp. inducen la síntesis de etileno y la expresión de *LOX-1* (Soresh *et al.*, 2005) activando la síntesis de jasmonatos. El gen *LOX-1* codifica la enzima LOX-1 que actúa sobre los lípidos de la membrana de los cloroplastos (Tamás *et al.*, 2009), induciendo la síntesis de jasmonatos (Soresh *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2001), durante su síntesis se generan niveles normales de ROS (Skórzyńska, 2007).

No obstante, todos los metales generan estrés oxidativo al incrementar los niveles de ROS (Maksymiec, 2007; Tamás *et al.*, (2009), sin embargo sus niveles dependen del metal que genere el estrés. Se ha reportado que el Pb, Zn, Fe, Cu y Cd inducen la síntesis de etileno (DalCorso *et al.*, (2010) e incrementan la actividad enzimática de LOX-1 generando un incremento en los niveles endógenos de jasmonatos (Martínez *et al.*, 2001; Maksymiec, 2007; Skórzyńska, 2007; Tamás *et al.*, (2009; DalCorso *et al.*, 2010), reflejándose en la inducción de la expresión de *GSH1* y *GSH2*, por tal motivo se esquematiza con líneas sólidas y con el signo “+”.

En cambio, el HgCl₂ es altamente tóxico y no se ha reportado que induzca la actividad de LOX-1 (Skórzyńska, 2007), sin embargo genera la peroxidación lipídica de todas las membranas celulares, dañándolas y elevando considerablemente los niveles de H₂O₂, el cual es altamente tóxico para las células (Mishra y Choudhri, 1999; Maksymiec, 2007; Tamás *et al.*, (2009).

Por su parte, el GSH disminuye la toxicidad del H₂O₂ mediante su actividad antioxidante. Sin embargo, el incremento de los niveles de H₂O₂, entre otros agentes oxidantes (diamida, 2-4-D) afectan disminuyendo ó reprimiendo la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998). Por consecuencia los niveles de GSH (Yoshida *et al.*, (2009; Zhou *et al.*, 2009) y su actividad antioxidante (Tamás *et al.*, 2009) son reducidos.

En otros estudios se ha indicado que la aplicación de Cu y Cd, así como de jasmonatos incrementa la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998), sugiriendo que los jasmonatos son importantes para aliviar el estrés celular generado

por metales pesados (Maksymiec *et al.*, 2007), probablemente por un aumento en los niveles de GSH (Yoshida *et al.*, 2009).

Considerando estos antecedentes y después de analizar los resultados de los RT-PCR semicuantitativos de todos los genes, se planteo un modelo esquematizado en la **Figura 8.2**. En el modelo se indica con líneas punteadas las vías que surgen de los resultados del presente trabajo, indicando un efecto sinérgico *Trichoderma*-Hg²⁺, en similitud a lo reportado por Gallou *et al.*, (2009), con plantas inoculadas con *T. harzianum* y *Rhizoctonia solani*, las cuales incrementaron la expresión de *LOX-1*.

Debido que el HgCl₂ no induce y además afecta la expresión de *GSH1* y *GSH2*, el modelo indica que el Hg²⁺ no induce a *LOX-1*, solamente lo induce cuando *Trichoderma* sp., está presente en *A. thaliana* generando un incremento en la síntesis de jasmonatos y en la expresión de *PDF1.2*. Lo anterior se sustenta en lo observado en el RT-PCR de la expresión de *PDF1.2*.

Al incrementarse los niveles de jasmonatos, se induce fuertemente un incremento en la expresión de *GSH1* y *GSH2* (esquematizado con líneas punteas y el signo “+”), generando un incremento en los niveles de GSH (Yoshida *et al.*, (2009). Entonces el GSH actúa como antioxidante, disminuyendo los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno generadas por el Hg²⁺, y de manera secundaria se estimula el crecimiento vegetal (**Figura 7.9**, **7.10**) y la producción de inflorescencias (**Figura 7.11**) (Ogawa *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009), entre otras respuestas fisiológicas relacionadas a GSH (Vivancos *et al.*, 2010).

Sin embargo, debido que los niveles máximos de GSH bloquean su síntesis (Xiang y Oliver, 2001), el exceso de GSH es ocupado para la síntesis de fitoquelatinas (PC) (Cobbett y Goldsbrough, 2002), las cuales forman un complejo con el Hg²⁺ que es transportado al interior de las vacuolas mediante transportadores transmembranales ABC (Harman *et al.*, 2004; Huai *et al.*, 2006; Ruocco *et al.*, 2009). La síntesis de PC posiblemente disminuya los niveles de GSH, de tal manera que desaparezca el efecto del GSH sobre *GSH2*, continuando con la síntesis de GSH.

Por lo tanto, en el modelo se propone que *Trichoderma* está sensibilizando (“priming”) a la planta, aumentando la síntesis de jasmonatos y de GSH. De manera que si en el

ambiente no hubiera algún factor que induzca estrés, entonces el GSH quedaría como una fuente de reserva de cisteína, grupos sulfhidrilo y azufre en su forma reducida en la células (Parisy *et al.*, 2006; Ben Ammar *et al.*, 2008; Rouhier *et al.*, 2008; Wójcik M. y Tukiendorf, 2011) y la síntesis de GSH quedaría bloqueada.

Sin embargo, si la planta se encontrará en condiciones de estrés, el Hg^{2+} intensifica la expresión de *LOX-1* previamente inducida por *Trichoderma*, incrementando los niveles de jasmonatos. Mientras tanto, el GSH que se encuentra a manera de reserva, sería ocupado inmediatamente para aliviar el estrés disminuyendo los efectos tóxicos del $HgCl_2$: **1)** reduciendo los niveles de ROS producidos por Hg^{2+} y **2)** sintetizando fitoquelatinas, provocando que la síntesis de GSH sea continua e incremente la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998). Un aspecto que no hay que descuidar, es que *Trichoderma* induce la síntesis de salicilatos, el cual también disminuye los niveles de ROS (Zhou *et al.*, 2009).

El efecto sinérgico *Trichoderma*-Hg se detalla a continuación:

La expresión simultánea de *PR-1a* y *PDF1.2* genera un sinergismo de las vías de RSA y RSI. En tanto en el sinergismo propuesto por *Trichoderma*-Hg, surge porque se observó inducción e incremento de la expresión de *PDF1.2* y *PR-1a* en las plantas del grupo *A. thaliana*-*Trichoderma* spp.+ $HgCl_2$, plantas en las cuales también incrementaron la expresión de *GSH1* y *GSH2* en comparación con las plantas de los grupos de *A. thaliana*-*Trichoderma* spp. y *A. thaliana*+ $HgCl_2$. El incremento de la expresión de *GSH1* y *GSH2* se puede deber al efecto sinérgico entre *Trichoderma* y el Hg^{2+} porque **1)** bajo el supuesto que el Hg^{2+} induce *LOX-1* y que *Trichoderma* spp. también lo induce en *A. thaliana*, la expresión de *LOX-1* se incrementaría aumentando los niveles de jasmonatos, los cuales potencian la expresión de *PDF1.2*, *GSH1* y *GSH2*. **2)** Además el aumento de la expresión de *GSH1* y *GSH2* es posible ya que los salicilatos, cuya síntesis es inducida por *Trichoderma* spp., disminuyen los niveles de ROS producidas por el Hg. Además, Mhamdi *et al.*, (2010 in Noctor y Foyer, 2011) indican que el GSH juega un papel importante en la señalización de la RSI y RSA, así que al aumentarse los niveles de GSH por efecto de *Trichoderma*, podría generarse el sinergismo de ambas vías.

Es decir, *Trichoderma* spp., son capaces de sinergizar las vías RSI y RSA, sin embargo, la presencia de Hg^{2+} en el medio, podría intensificar el sinergismo de ambas vías.

En contraste, las plantas sin la interacción con *Trichoderma* spp. y que se encuentren ante una situaciones de estrés, el Hg^{2+} aumenta los niveles de ROS **1)** disminuyendo la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1999) e **2)** independientemente de la expresión de éstos, la célula aminora el daño de las ROS al disminuir los niveles de GSH al ser oxidado a GSSG (Sarry *et al.*, 2006 *in* Hernández *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto de ROS sobre la expresión de ambos genes disminuye paulatinamente, debido a la enzima glutatión reductasa (GR) regenera el GSH, de este modo continua la actividad antioxidante del GSH (Xiang y Oliver, 2001). Por esta razón, la respuesta de las plantas es lenta frente a dosis no letales de $HgCl_2$.

Es decir, el presente modelo indica que el efecto sinérgico *Trichoderma*- Hg^{2+} incrementa los niveles de GSH, de tal modo que sus niveles no disminuyan por efecto del Hg^{2+} manteniendo activa la expresión de *GSH1*, *GSH2* y disminuidos los niveles de ROS al haber suficiente GSH para aliviar el estrés oxidativo. En cambio, las plantas bajo estrés por Hg^{2+} agotan el GSH (Hernández *et al.*, 2012) hasta que la célula lo regenere, además la expresión de *GSH1* y *GSH2* se ve reducida.

El modelo aún debe ser evaluado, determinando los niveles de jasmonatos y analizar si se correlacionan de manera positiva con los niveles de expresión de *PDF1.2*, *GSH1* y *GSH2*.

IX. CONSIDERACIONES FINALES

Este trabajo es el primero en su tipo, porque aporta conocimiento nuevo sobre la interacción planta-microorganismo en la generación de resistencia a mercurio y disminución de efectos tóxicos del Hg en *A. thaliana* que es sensible a mercurio, al no ser hiperacumuladora de metales pesados (Huai *et al.*, 2006; Venkatachalam *et al.*, 2009). Se había reportado el papel de *Trichoderma* en una gran variedad de xenobióticos, hidrocarburos e incluso su interacción de plantas de trigo o chícharo para degradar cianuro (Argumedo *et al.*, 2009), no obstante no se conocía su efecto en situaciones de estrés por mercurio, mucho menos en un esquema de interacción planta-microorganismo.

Además, *Trichoderma* tiene la ventaja de que no es específico de una planta en particular, es cosmopolita y fácilmente adaptable a cualquier ambiente. Estas características lo hacen un buen candidato para formular productos como agente bioremediador (Zawiercha y Malina, 2011), tomando en cuenta que actualmente en el mercado existen numerosos productos para mejorar el crecimiento vegetal (biofertilizantes) o combatir fitopatógenos en cultivos de interés comercial, debido que es un buen agente de control biológico.

La bibliografía indica que el Cd y Cu incrementan la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998), no obstante se encontró que el Hg^{2+} es uno de los metales pesados más tóxicos debido que afecta la transcripción de ambos genes disminuyendo sus niveles de expresión en *A. thaliana*, y posiblemente esté relacionado con la disminución de la síntesis de GSH (Yoshida *et al.*, 2009), el cual es importante para aliviar el estrés oxidativo generado por metales pesados.

Los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado en *S. drummondii* (Venkatachalam *et al.*, 2009) y *A. thaliana* (Heindereich *et al.*, 2001), debido que se ha encontrado que el $HgCl_2$ induce una gran variedad de genes, pero no los implicados en la síntesis de GSH.

Sin embargo, posiblemente la concentración de $HgCl_2$ empleada para el desarrollo del presente trabajo fue demasiado alta y comprometió la expresión de *GSH1* y *GSH2*

disminuyendo su transcripción. Se plantea esta hipótesis en justificación a lo reportado por Xiang y Oliver (1998) quienes al incrementar la concentración de CdCl_2 , los niveles de expresión de estos genes disminuyeron.

Análisis de adsorción de metales pesados por las paredes celulares de *Trichoderma* sp., (Krantz y Schnürer, 1993; Krantz *et al.*, 1995) así como la cuantificación de Hg^{2+} en organelos intracelulares (Raspanti *et al.*, 2009) ayudarán a dilucidar los mecanismos utilizados por los hongos para contrarrestar los efectos tóxicos del metal y si estos efectos tóxicos afectan la actividad de sus enzimas hidrolíticas (Kredics *et al.*, 2001) comprometiendo su capacidad micoparasítica y de colonización en las plantas.

No obstante, la resistencia de *Trichoderma* a Hg^{2+} también pudiera deberse a que la expresión de los genes implicados en la síntesis de GSH es menos afectada por la aplicación de Hg^{2+} en comparación con los genes de la misma vía en las plantas. Se ha reportado que el HgCl_2 afecta la expresión de *GST* en *S. drummondii* (Venkatachalam *et al.*, 2009), y al sobreexpresar el gen *gst* de *T. virens* en *N. tabacum*, las plantas muestran resistencia a Cd (Dixit *et al.*, 2011).

Además, esta investigación es el primer estudio que reporta que *Trichoderma* spp. volatilizan el Hg^{2+} , razón por la cual el mecanismo aún es desconocido, lo que sugiere que este proceso sería en parte responsable de conferir resistencia a este metal.

Durante esta investigación se evaluaron 3 cepas de *T. virens*, todas aisladas de suelos contaminados con Hg^0 , las cuales colonizan preferentemente los tejidos de las partes aéreas de *A. thaliana*, como cepa de referencia se empleo la cepa IMI. Bajo condiciones de invernadero, las distintas cepas de *Trichoderma*, fueron capaces de disminuir los efectos tóxicos del Hg^{2+} en *A. thaliana* e incrementar el diámetro de las rosetas. Además, *Trichoderma* spp. aumentaron el porcentaje de inflorescencias en comparación con las plantas no inoculadas con *Trichoderma* spp., lo que demuestra un efecto positivo en el desarrollo de la planta promovido por *Trichoderma* spp.

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre cepas al comparar el efecto de *Trichoderma* sobre *A. thaliana* bajo estrés por HgCl_2 en condiciones de invernadero.

También, se encontró que las cepas de *T. virens* incrementan la expresión de *GSH1* en *A. thaliana*, en comparación con las plantas inoculadas con la cepa IMI. Por otro lado, la capacidad que presentan *Trichoderma* spp. de colonizar los tejidos vegetales pudiera estar induciendo de manera significativa la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Bailey *et al.*, 2006, 2008), entre otros genes. La capacidad de colonización podría evaluarse mediante PCR en tiempo real para determinar el número de copias de genes de *Trichoderma* spp., y relacionarlo con el número de copias de *GSH1* y *GSH2* inducidas por la interacción con *Trichoderma* spp.

No obstante, las plantas inoculadas con la cepa IMI presentaron mayor porcentaje de sobrevivencia y bajos niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2* en comparación con las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens*. La diferencia en los niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2* podría deberse a que *Trichoderma* spp. presenta diferentes tasas de colonización, siguiendo el orden IMI > 20-D > 20-F > 11.

La disminución de los efectos tóxicos del Hg^{2+} podría estar relacionada con un incremento de los niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* que pudieran estar aumentando los niveles de GSH (Yoshida *et al.*, 2009). Lo cual se refleja al aliviar el estrés oxidativo, disminuyendo los efectos tóxicos del Hg^{2+} , y el probable aumento de los niveles de GSH podría justificar el crecimiento observado en las plantas bajo estrés por Hg^{2+} , a pesar que el Hg^{2+} inhibe el crecimiento vegetal (Patra y Sharma, 2000; Xu *et al.*, 2010a), debido que el GSH estimula el crecimiento (Yadav, 2010).

Por otro lado, el posible incremento de los niveles de GSH también pudieran justificar el incremento de inflorescencias entre plantas inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* bajo el tratamiento o sin el tratamiento con HgCl_2 , debido que el GSH induce la floración (Ogawa *et al.*, 2004; Yadav, 2010).

En este trabajo también se confirmó que la vía de síntesis de jasmonatos está involucrada en la resistencia a metales pesados. Se ha reportado que el Cd y Cu aumentan la actividad de lipooxigenasas incrementando la acumulación de ROS, pero también los niveles de jasmonatos (Maksymiec, 2007; Tamás *et al.*, (2009; DalCorso *et al.*, (2010). Los jasmonatos aumentan la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oliver, 1998).

Por su parte, *Trichoderma* spp. activa la RSI en la cual está involucrado el ácido jasmónico induciendo la expresión de *PDF1.2* (Harman *et al.*, (2004), por ese motivo se empleo este gen como marcador de la síntesis de jasmonatos. El gen mostró inducción por *Trichoderma* spp. y por Hg^{2+} , sin embargo sus niveles de expresión incrementaron en las plantas inoculadas con las cepas de *T. virens* bajo el tratamiento con $HgCl_2$. Los resultados obtenidos, sugieren que *T. virens* presenta una mayor capacidad de transducción de señales que la cepa IMI para activar los sistemas de resistencia sistémica en *A. thaliana*. Esto pudiera deberse a que las cepas de *T. virens* son nativas de sitios donde las plantas requieren disminuir los efectos tóxicos del Hg y los hongos han desarrollado esa capacidad en comparación de la cepa IMI, que proviene de sitios no contaminados.

Por lo tanto surge la hipótesis que *T. virens* y el Hg^{2+} presentan un efecto sinérgico que incrementa los niveles endógenos de jasmonatos generando resistencia a Hg^{2+} , debido que el incremento de la expresión de *PDF1.2* coincide con un incremento en los niveles de expresión de *GSH1* y *GSH2* que también coincide con un incremento del diámetro de las rosetas de *A. thaliana* y el aumento de la producción de inflorescencias.

Entonces, *T. virens* al aumentar los niveles de jasmonatos podría intensificar la síntesis de GSH para disminuir los niveles de H_2O_2 generados por la peroxidación lipídica de las membranas celulares causada por el Hg^{2+} (Maksymiec, 2007; Skórzyńska-Polit, 2007). No obstante, también se midió la expresión de *PR-1a* como gen marcador de la producción de ácido salicílico, que también induce la expresión de *GSH1* y *GSH2* (Xiang y Oiver, 1998) y disminuye los niveles de ROS (Zhou *et al.*, 2009).

Finalmente se recomienda el uso de *Trichoderma* spp. para mejorar la fitorremediación de sitios contaminados por Hg^0 , debido que inducen genes que contrarrestan el estrés permitiendo que las plantas se establezcan en sitios contaminados, además *Trichoderma* spp. disminuyó la concentración de Hg^{2+} en los tejidos vegetales. La disminución de Hg^{2+} en los tejidos vegetales podría deberse a que *Trichoderma* spp. volatiliza el metal por biotransformación, siendo evidente en las concentraciones encontradas de Hg^{2+} en las plantas inoculadas con la cepa IMI (Tabla 7.4).

Por lo tanto, en base a los resultados se propone seguir con las investigaciones con *Trichoderma* para fines de biorremediación, debido que *Trichoderma* spp. no mostraron diferencias significativas en la disminución de efectos tóxicos por HgCl_2 en *A. thaliana*. Sin embargo, se aconseja ampliar las investigaciones con la cepa 20-D, debido que los niveles de expresión de *PDF1.2* y de los genes implicados en la síntesis de GSH se observan ligeramente incrementados en comparación con las demás cepas empleadas.

También, es necesario investigar a detalle el potencial que presentan los microorganismos en la resistencia a metales pesados, especialmente con hongos debido que no hay trabajos que indiquen los mecanismos de interacción con las plantas involucrados en la resistencia o tolerancia a éstos. Por otra parte, debido al poco conocimiento de los genes que generan la resistencia a Hg^0 en *Trichoderma* spp., prueba de ello es que se desconocía la capacidad de volatilizar el Hg^{2+} , sería interesante e importante encontrar los genes involucrados en la resistencia a metales pesados.

La importancia, se genera porque existen numerosos trabajos con genes bacterianos de resistencia a metales pesados y el éxito que estos tienen al ser expresados en plantas, las cuales se desarrollan en ambientes altamente contaminados donde las plantas silvestres normalmente no podrían crecer (Rug *et al.*, 1996; Bizily *et al.*, 1999; Patra y Sharrma, 2000; Meagher, 2000; Rugh, 2001; Meagher y Heaton, 2005; Tabak *et al* 2005; Hussein *et al.*, 2007).

X. CONCLUSIONES

1. Los hongos del género *Trichoderma* spp., se encuentran en suelos contaminados con mercurio y presentan una resistencia natural a este metal.
2. *Trichoderma atroviride* presenta mayor resistencia a HgCl_2 que *Trichoderma virens*, a pesar que estas fueron aisladas de suelos contaminados con mercurio.
3. El HgCl_2 afecta la velocidad de crecimiento de las cepas de *T. virens* en comparación con *T. atroviride*.
4. *Trichoderma atroviride* presenta incrementada la capacidad de volatilizar Hg en comparación con *Trichoderma virens*.
5. La volatilización de Hg por *Trichoderma* spp. se encuentra correlacionada con la capacidad de bioacumular este metal en la biomasa fúngica.
6. Los porcentajes de inhibición brindan datos importantes que deben ser evaluados en conjunto con los datos generados por las curvas de crecimiento para determinar los niveles de resistencia a cualquier metal o contaminante.
7. Algunas cepas de *T. virens* requieren de triptófano para producir compuestos indólicos
8. Al parecer el triptófano no es un factor importante que determine la producción de compuestos indólicos en *T. atroviride*.
9. El haber empleado como modelo la planta *A. thaliana* que es sensible a metales pesados, permitió conocer la capacidad de respuesta a *Trichoderma* spp. frente a condiciones de estrés por mercurio
10. El HgCl_2 afecta considerablemente el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis thaliana* al disminuir la germinación y el crecimiento vegetal,
11. En condiciones de invernadero, las dosis inferiores a 5 μM de HgCl_2 no incrementan los efectos tóxicos en las plantas de *A. thaliana* ni afectan su crecimiento,

mientras que en condiciones *in vitro* las dosis de 1 μM de HgCl_2 afectan considerablemente el crecimiento de las plantas.

12. Los tratamientos con HgCl_2 disminuyen la producción de inflorescencias, pero la interacción de *A. thaliana* con *Trichoderma* incremento la producción de inflorescencias.

13. Aunque *Trichoderma* spp., produjeron compuestos indólicos, las distintas cepas que se evaluaron no indujeron el crecimiento en *A. thaliana*.

14. La asociación *Arabidopsis-Trichoderma* resulta benéfica para las plantas, debido que *Trichoderma* spp., disminuye los efectos tóxicos del HgCl_2 e induce el crecimiento vegetal, aún cuando se ha reportado que el mercurio inhibe el crecimiento vegetal.

15. Las cepas de *Trichoderma* resistentes y medianamente resistentes a HgCl_2 incrementan el crecimiento vegetal, incrementan la producción de inflorescencias, disminuyen los niveles de Hg total en los tejidos vegetales y los efectos tóxicos del HgCl_2 en *A. thaliana*.

16. Las cepas de *Trichoderma* spp. incrementan la expresión de los genes involucrados en el estrés oxidativo asociándose con la expresión de los genes implicados en la Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y Adquirida (RSA) en las plantas de *A. thaliana*.

17. Las cepas de *Trichoderma virens* incrementan la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo.

18. La mejor cepa fue *T. virens* cepa 20-D, al incrementar los niveles de expresión de *GSH1*, *GSHS2*, *PDF1.2* y *PR1a* en comparación con las otras cepas y *T. atroviride*.

XI. PERSPECTIVAS

1. En base a los resultados obtenidos en la expresión de los genes, es conveniente investigar los niveles de glutatión (GSH) para identificar si el incremento de la expresión de los genes implicados en su síntesis inducido por *Trichoderma* spp., aumenta también los niveles de GSH y ver si se encuentra relacionado con un aumento de fitoquelatinas y comprobar si efectivamente la expresión de *GSH1* se encuentra ligada con la disminución de la cianosis en *A. thaliana*.
2. Debido que la expresión de algunos genes se vio afectada por el HgCl_2 , sería conveniente medir primero la expresión de los genes en concentraciones de 5 y 10 μM de HgCl_2 en base a lo observado en las plantas sin la interacción con *Trichoderma* spp. y posteriormente medir la expresión de los genes bajo la interacción con las cepas fúngicas.
3. También se recomienda efectuar ensayos *in vivo* con *A. thaliana* bajo tratamientos con otros metales pesados como Cd y Cu, debido que han sido ampliamente estudiados en la expresión de *GSH1* y *GSH2* en *A. thaliana* y otras especies vegetales y compararlos con los resultados obtenidos e el presente trabajo.
4. Se recomienda repetir los experimentos bajo condiciones de invernadero con la interacción de las cepas de *Trichoderma* evaluadas en el presente trabajo aplicando la misma dosis de HgCl_2 , pero esta vez incluir grupos de plantas a las cuales se les apliquen diferentes dosis de ácido jasmónico y ácido salicílico sin la presencia del hongo para comprobar que sean estos compuestos los que encienden la expresión de los genes *PDF1.2*, *pr-1a* y los de la vía de síntesis de glutatión.
5. .Debido que el Hg^{2+} y las cepas nativas de *Trichoderma* incrementaron los niveles de expresión de *PDF1.2* se sugiere un aumento en los niveles de jasmonatos en los tejidos vegetales. Por esa razón sería conveniente trabajar

con plantas mutantes en la ruta biosintética de los jasmonatos y que estas estuvieran bajo un esquema de interacción planta-microorganismo aplicándoles ácido jasmónico e inducirles estrés con algún metal.

6. En vista que las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp., al parecer, retrasan y disminuyen la acumulación de pigmentos en respuesta al estrés generado por el HgCl_2 , es conveniente analizar los niveles de antocianinas de las plantas bajo y sin la interacción con las cepas fúngicas en presencia de HgCl_2 .
7. También, debido que las cepas de *Trichoderma* presentaron diferentes niveles de resistencia a Hg^{2+} , efectuar ensayos *in vitro* de las cepas empleadas en el presente trabajo para determinar su actividad micoparasítica y analizar si la actividad enzimática relacionada con este proceso es o no afectada por metales pesados. Se propone lo anterior debido que Krantz *et al.*, (1995) reportaron que el metal que afecta en gran medida la actividad de enzimas relacionadas con el micoparasitismo es el mercurio, a pesar de bajas concentraciones.
8. Con fundamento en la prueba cualitativa de volatilización de mercurio, se determinó que *Trichoderma* volatiliza el Hg^0 desconociendo si lo reduce o transforma. Se propone cuantificar los niveles de Hg^0 que emite cada cepa de *Trichoderma* así como también determinar las especies de mercurio estos hongos pudieran estar generando.
9. Es conveniente plantear experimentos, esta vez separando las plantas bajo los tratamientos con el HgCl_2 inoculadas y no inoculadas con *Trichoderma* spp. para evitar que los vapores que se generen de Hg^0 contaminen a las plantas a las cuales no se les haya aplicado el HgCl_2 .
10. Determinar si el HgCl_2 induce *LOX-1* o ACC sintasa en *A. thaliana*, y de ser así, compararlo con los niveles de expresión en las plantas del grupo *A. thaliana-Trichoderma* spp., para explicar la expresión de *PDF1.2*.

11. Debido que no se conocen los genes inducidos por *Trichoderma* bajo condiciones de estrés por HgCl₂, se recomienda identificarlos mediante PCR de hibridación sustractiva (SSH) (Heindereich *et al.*, 2001; Venkatachalam, *et al.*, (2009), pero probando diferentes concentraciones, y que estas sean menores a 30µM de HgCl₂ por las siguientes razones: **1)** los resultados indican que la interacción con *Trichoderma* spp., disminuyó los niveles de HgCl₂ en *A. thaliana*, y como se menciona con anterioridad, posiblemente influyendo en la expresión de los genes inducidos durante la interacción, debido que **2)** la concentración de metales pesados es un factor importante que induce, inhibe o incrementa la expresión de los genes involucrados en la síntesis de la vía del glutatión, entre otros (Xiang y Oliver, 1998; Heindereich *et al.*, (2001; Venkatachalam, *et al.*, (2009).
12. Mediante SSH determinar los genes inducibles por HgCl₂, probando concentraciones inferiores a 30µM para buscar los genes que se sugiere están induciéndose; ACC sintasa y LOX-1. Estos inducen la RSI y hasta el momento se ha reportado que el HgCl₂ induce genes de la RSI.
13. , Comprobar si el nivel de expresión de *PDF1.2* se relaciona directamente con los niveles de jasmonatos, por tal motivo se sugiere que en trabajos posteriores se cuantifique la concentración de jasmonatos en los tejidos vegetales para tener mayor certeza de los niveles que inducen *Trichoderma* spp.
14. Debido que en los RT-PCR, se observó que la expresión de *PDF1.2* es inducida por HgCl₂ y *Trichoderma*, es recomendable cuantificar los niveles de etileno, medir la actividad lipooxigenasa y los niveles de expresión de LOX-1 y ACC sintasa, en grupos de plantas de *A. thaliana-Trichoderma*, *A. thaliana-Trichoderma*+HgCl₂ y *A. thaliana* bajo el tratamiento con HgCl₂. Para comprobar si el HgCl₂ o *Trichoderma* son los que inducen el incremento de la expresión de *PDF1.2* . Si los resultados indican que el HgCl₂ induce en menor medida *PDF1.2* entonces pudiera ser indicativo que la concentración de

HgCl₂ es un factor importante para la inducción o represión de *LOX-1* y ACC sintasa.

15. Se sugiere cuantificar los niveles de HgCl₂ en el sustrato para comprobar que *Trichoderma* modifica la concentración de HgCl₂.

16. Efectuar RT-PCR en tiempo real para validar los RT-PCR semicuantitativos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmad, F., Ahmad, I. y Khan, S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates for Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence tryptophan. Turk Journal Biology. 29:29-34.
2. Alexander, M. Biodegradation and bioremediation. 1999. 2 edition. Academic Press, San Diego, CA., U.S.A. Pp. 377-389.
3. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal Molecular Biology. 215: 403-410
4. Álvarez, A., Arias, Y., Luna, R. F., DiBernardo, M. L., García, M. Y., Yáñez., C., Mejias, R. & Rondon, C. 2008. Cuantificación de plomo y mercurio en productos naturales con fines terapéuticos comercializados en Venezuela. Revista de Toxicología en línea in <http://www.sertox.com.ar/retel/n15/004.pdf> revisado el 5 de enero del 2010.
5. Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, R. & Peña, J. J. 2009. Género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista internacional de Contaminación Ambiental. 25(4):257-269.
6. Ávila, G. A. Historia Socioeconómica de Querétaro. Secretaria de Educación de Gobierno del Estado de Veracruz. 2008. 1° Edición.. Pp. 25-26, 45-46, 108, 129, 132-133.
7. Avni, A., Bailey, B. A., Matto, A. U. & Anderson, J. D. 1994. Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-0-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. Plant Physiology. 106:1049-1055
8. Barnett, H. L. & Hunter, B.B. 1972. 4 ° edition. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS PRESS, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
9. Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B. T. & Holmes, K. A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biological Control. 46:24-35.
10. Bailey, B. A. m Bae, H., Strem, M., Roberts, D.P., Thomas, S. E., Crozier, J., Samuels, G. J., Choi, I. K. & Holmes. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization by endophytic of four *Trichoderma* species. Planta. 224:1449-1464.
11. Ben Ammar, W., Meniouni, B., Ghorbel, M. H. & Jemal, F. 2008. Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. Biologia Plantarum. 52(2): 314-320.
12. Benitez-Burracao, A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética en plantas. Reverte. Pp 119-120.
13. Bizily, S. P.M Rugh, C. L., Summers, A. O. & Meagher. 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. Ecology. 96: 6808-6813.

14. Bradl, H. B. 2005. Interface Science and Technology Vol. 6 : Heavy Metals in the Environment. Elsevier Academic Press. Chapter 2: Interaction of heavy metals, pp. 119-122.
15. Camarena-Gutiérrez, G. & de la Torre, R. 2007 Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 3(2):157-162.
16. Carta geológica-minera San Joaquín F14-c58, Qro., Esc. 1:50000, consultado el 14 de Enero de 2011 en http://portal.sgm.gob.mx/cartas_geoquim/metadatos/geol50/San%20Joaqu%C3%ADn%20F14-C58_Geol.html
17. Carrasquero, A. & Adams, M. 2002. Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes de El Callao, estado de Bolívar, Venezuela. Interciencia. 27: 191-194.
18. Cavazos, T. & Rodríguez, O. 1992. Manual de prácticas de física suelos. Ed. Trillas.
19. Cobbett, C. & Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review Plant and Biology. 53: 159-182.
20. Cobbett, C. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiology. 123:825-832.
21. Rugh, C. L. 2001. Mercury detoxification with transgenic plants and other biotechnological breakthroughs for phytoremediation. In Vitro Cellular & Developmental Biology plant.. 37:321-325
22. Crane, S. 2011. Mercury effects of axenically grown fungal isolates and on *Pinus rigida* and its ectomycorrhizal community. University of New Jersey. Ph. D Ecology and Evolution Thesis.
23. Curran, B. & Bugeja, V. 2005. Fungal Genetics: a post perspective Chapter 3 Pp 78 in Fungi biology and applications edited by Kavanaga, K. John Wiley & Sons, Ltd.
24. DalCorso, G., Farinati, S & Furini, A. 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. Plants signaling & Behavior. 5(6):663-667
25. Dana, Ma. De las M., Pintor, J. A. & Cubero, B. 2006. Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. Plant Physiology. 142: 722-730.
26. Diario Oficial de la Federación. 2009. Tomo DCLXXI, No. 21. México, D.F., 28 de agosto de 2009.
27. Enciclopedia de los municipios de México, Querétaro San Joaquín. Consultado el 7 de Enero de 2011 en <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/queretaro/municipios/22015a.htm>.
28. Dixit, P., Mukherjee, P. K., Ramachandran, V. & Eapen, S. 2011. Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in *Nicotiana tabacum*. PlosOne. 6(1):1-15
29. Ezzouhri, L., Castro, E., Moya, M., Espinola, F & Lairini, K. 2009. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology. 3(2):35-48.
30. Farmacopea Argentina. 2003. Boletín Oficial de la República Argentina. pp. 67.
31. Figueroa, A. Capítulo 11: Mercurio y Metilmercurio. 1986. Programa de Contaminación Ambiental del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. México. Pp 183-204 en <http://www.cepis.org.pe/bvsacd/eco/016750/016750-mercurio.pdf> consultado el 26 de Agosto del 2009.
32. Fitter, A. & Hay, K.M. R. 2002. Environmental physiology of plants. 3 ed. Academic Press. P.p 269-275
33. Foyer, C. F. & Noctor, G. 2002. Chapter 3: The molecular biology and metabolism of glutathione in Significance of Glutathione to plant adaptation to the environment. Edited by Grill, D., Tausz, M. & De Kok, L. J. Kluwer Academic Publishers. Pp: 27-56
34. Gadd, G.M. Fungi in bioremediation. 2001. Cambridge University Press. 1 ed. Pp.370-372; 453
35. Gadd, G. M., Ramsay, L., Crawford, J. W. & Ritz, K. 2001. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals. Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters. 204:311-316.

36. Gallou, A., Cranenbrouck, S. & Declerck, S. 2009. *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology. 124:219-230.
37. García, M. Y., DiBernardo, M. L., Vit, P., Rondón, C., González, I., Saavedra, A. R., Zago, K. & Uzcategui, N. A. 2007. Estandarización y determinación de mercurio (Hg) en polen apícola de *Brassica napus* L. Revista de toxicología en línea. en http://www.sertox.com.ar/retel/n13/retel_n13_003.pdf revisado el 5 de enero del 2010.
38. Gams, W. & Bissett, J. 1998. Chapter 1 Morphology and identification of *Trichoderma*. in *Trichoderma & Gliocladium* Vol. 1 Basic biology, taxonomy and genetics edited by Kubicek, C & Harman, G. Taylor and Francis. Pp 8-13
39. Glickmann, E. & Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61:793-796.
40. Goellner, K. & Conrath, U. 2008. Priming: it's all the world to induced resistance. European Journal of Plant Pathology. 121: 233-242
41. Gutiérrez., G., Calo, L., Gros, F., Caissard, J. Gotor, C & Romero, L. C. 2005. A versatile promoter for expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants. Journal of Experimental Botany. 56(419):2487-2494.
42. Heldt, H, W. 2005. Plant Biochemistry. 3 ed. Elsevier Academic Press. Pp:395-401.
43. Harman, G.E., Howell, R. Ch., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology. 2:43-56.
44. Hefferon, K. L. 2010. Biopharmaceuticals in plants toward the next century of medicine. CRC Press Taylor & Francis Group. Chapter 3 Chloroplast engineering and production of biopharmaceuticals. Pp 57-74
45. Heindereich, B., Mayer, K., Sanderman, H. & Ernest., D. 2001. Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure. Plan Cell and Environment. 24:1227-1234.
46. Heiss, S. Wachter, A., Bogs, J., Cobbett, C. & Rausch, T. 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. Journal of Experimental Botany. 54(389):1833-1839.
47. Hernández, L. E., Ortega, C., Montero, M. B., Escobar, C. & Carpena, R. 2012. Metal toxicity in plants: perception, signaling and remediation in Heavy metal perception in a microscale environment: a model system using high doses of pollutants., Springer-Verlag. Pp: 23-39. Descargado en <http://www.springer.com/978-3-642-22080-7> en octubre de 2011.
48. Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1950. The water-culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Berkeley, Ca. Circular 347.
49. Höller, K, Löránt, K., Künster, A., Müller, M., Gullner, G., Fattin, M. & Zechmann, B. 2010. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur induced Resistance in *Tobacco mosaic virus*-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants. Molecular plant-microbe interactions. 23(11):1449-1459.
50. Huai-Chih, Ch., Jing-Chi, L. & Kuo-Chen, Y. 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. Environmental Science & Technology. 40:6792-6798.
51. Hussein, S., Ruiz, O. N., Terry, N. & Daniell, H. 2007. Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. Environmental Science & Technology. 41(24): 8439-8446.
52. Inouhe, M. Phytochelatin. 2005. Brazilian Journal of Plant Physiology. 17: 65-78.
53. Isaac, S. Fungal-plant interactions. 1992. 1 ed. Chapman & Hall. Pp. 131.

54. Jain, N, Ascough, G. D., Van Staden, J. 2008. A smoke-derived butenolide alleviates HgCl₂ and ZnCl₂ inhibition of water uptake during germination and subsequent growth of tomato-Possible involvement of aquaporins.. *Journal of Plant Physiology*.165:1422-1427.
55. Kato, M., Hayasakawa, Y., Hyodo, H., Ikoma, Y. & Yano, M. 2000. Wound induced ethylene synthesis and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiology*. 41(4):440-447.
56. Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Otter, F. C. D., Van Loon, L.C. & Pieterse, C. M. J. 2008. Kinetics of salicylate mediated of jasmonates signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology*. 147:1358-1368
57. Krantz, C. & Schnürer, J. 1993. Interactions between a soil fungus, *Trichoderma harzianum*, and II B metals adsorption to mycelium and production of complexing metabolites. *Biometals*. 6: 223-230.
58. Krantz, C., Frändberg, E. & Schnürer, J. 1995. Metal loading enzymatic degradation of fungal cells walls and chitin. *Biometals*. 8: 12-18.
59. Kredics, L., Manczinger, L. & Nagy, E. 2001. Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 112-116.
60. Kubicek, E. M. 1998. Chapter 5 "Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocladium*" in *Trichoderma & Gliocladium* Vol. 1 Basic biology, taxonomy and genetics edited by Kubicek, C & Harman, G. Taylor and Francis. Pp 100.
61. Leon-Reyes, A., Spoel, S. H., De Lange, E., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, Sh., Millenaar, F., Welschen, A. M., Ritsema, T., & Pieterse, C. M. J. 2009. Ethylene modulates the role of nonexpressor of pathogenesis-related genes1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant physiology*. 149:1797-1809.
62. Leon-Reyes, A., Du, Y., Koornneef, A., Proietti, S., Memelink, J., Pieterse, C. M. J. & Ritsema, T. 2010. Ethylene signaling renders the jasmonate responses of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 23(2):187-197.
63. Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. 2008. Diario oficial de la Federación publicada el 16 de mayo de 2008.
64. Lotan, T. & Fluhr, R. 1990. Xilanase, a novel elicitor of a pathogenesis related proteins in Tobacco uses a non ethylene pathway for induction. *Plant Physiology*. 93:811-817.
65. Lu, Y. P. Li, Z. Sh. & Rea, P. 1997. *AtMRP1* gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Plant Biology*. 94:8243-8248.
66. McKinney, M. L., Schoch, R. M., Yonavjack, L. 2007. Environmental Science systems and solutions. 4 edition. Jones and Bartlett Publishers. Pp. 361-525
67. Mantilla, M. E. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
68. Martinez, Ch., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard., O., Nicole, M. & Baccou, J. C. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in Melon cotyledons by active or heat-denatured cellulose from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiology*. (2001). 127:334-344.
69. Maksymiec, 2007. W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29:177-187
70. Maksymiec, W., Wójcik, M. & Krupa, Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*. 66 :421-427.
71. Meagher, B. R. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Plant Biotechnology*. 3:153-162.
72. Meagher, R. B. & Heaton, A. C. P. 2005. Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32:502-513

73. Mendioroz, S. Merurio. 2001. Instituto de Catális y Petroquímica del CSIC. Canto Blanco, Madrid *in* <http://www.icp.csic.es/cyted/Monografias/Monografias2001/C1-317.pdf> consultado el 26 de agosto del 2009.
74. Millán, R., Carpena, R.O., Schmid, T., Sierra, M.J., Moreno, E., Peñalosa, J., Gamarra, R. & Esteban, E. 2007. Rehabilitación de suelos contaminados con mercurio: estrategias aplicables en el área de Almadén. *Ecosistemas*. 16:56-66 *in* www.revistaecosistemas.net.
75. Mishra, A. & Choudhuri, M. A. 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxigenase in rice. *Biologia Plantarum*. 42(3):409-415.
76. Mukherjee, P.K., Nautiyal, C.S & Mukhopadhyay, A.N. 2008. Chapter 10 Molecular mechanism of biocontrol by *Trichoderma* spp. in *Molecular mechanism of plant and microbe coexistence*. Edited by Nautiyal, C.S. & Dion, P. 2008. Springer. Pp 243-262.
77. Munzuroğlu, Ö, Zenging, F. K. & Yahyagil, Z. 2008. The abscisic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Çakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg⁺⁺, Cd⁺⁺, Cu⁺⁺) stress. *Journal of Science*. 21:1-7.
78. Muñoz, J. 2011. La minería en México. Bosquejo histórico. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultado el 14 de Enero de 2011 en <http://revistas.ucm.es/ghi/02116111/articulos/QUCE8686220145A.PDF>. Pp. 145-156
79. Munzuroglu, O. & Geckil, H. 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyle growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43: 203-213.
80. Murray R., Capitulo 60 Eritrocitos y leucocitos. Pp. 863, en Murray, R., K., Mayes, A. P., Granner, D. K. y Rodwell, W. V. *Bioquímica de Harper*. 2005. 14° edición. Manual Moderno.
81. Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiyama, H. & Yagi, O. 1990. Organomercurial-volatilizing bacteria in Mercury - polluted sediment of Minimata Bay, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(1):304-305.
82. Navarro, J. P, Alonso, I. & López, J. R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. 16(2); 10-25 *in* www.revistaecosistemas.net.
83. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Diario oficial de la Federación publicada el 31 de diciembre de 2002.
84. Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario oficial de la Federación publicada el 2 de marzo de 2007.
85. Norma Oficial Mexicana NOM-AA-132-SCFI-2006.
86. Oliviera, E. 2003. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 14:174-182.
87. Ogawa, K., Hatano-Iwasaki, A., Yanagida, M. & Iwabuchi, M. 2004. Level of glutathione is regulated by ATP-dependent ligation of glutamate and cysteine through photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: mechanism of strong interaction of light intensity with flowering. *The Plant Cell*. 45:1-8.
88. Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L. Buchala, A., Glazebrook, J.M. & Mauch, F. 2006. Identification of *PAD2* as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *The plant Journal*. 49:159-172
89. Patra, M. & Sharma, A. 2000. Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review*. 66(3): 379-422.
90. Pérez-Bueno, J de J., González-Montoya, J. L., Cano-Canchola, C., Cervantes Jáuregui, J., Reyes-Zamudio, V. & Álvarez-Vargas, A. 2008. Identificación Molecular de Hongos presentes en patrimonio cultural existente en cantera para el modelaje teórico de su deterioro. *Revista Ciencia*. UAQ.1: 4-19.
91. Pieterse, C. M. J. & Koornneef, A. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*. 146:839-844.
92. Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C. & Campos, A. 2006. Contaminación por metales pesados en el suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*. 5: 149-155.
93. Quig, D. 1988. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Alternative Medicine Review*. 3(4):262-270.

94. Rai, P. & Tripanthi, B. D. 2009. Comparative assessment of *Azolla pinnata* *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Pant Sagar of Singrauli industrial region, India. *Environmental Monitoring and Assessment*. 148: 75-84.
95. Rangel- Sánchez, G., Castro-Mercado, E., Beltrán- Peña, E., Reyes de La Cruz, H. & García-Pineda, E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en las plantas. *Biológicas*. 12(2):90-95
96. Raspanti, E., Cacciola, S. O., Gotor, C., Romero, C. L. & Garcia, I. 2009. Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere*. 76: 48-54
97. Rauser, W. E. 2002. Chapter 6 The role of glutathione in plant reaction and adaptation to excess metals. *in* Significance of Glutathione to plant adaptation to the environment. Edited by Grill, D., Tausz, M. & De Kok, L. J. Kluwer Academic Publishers. Pp. 123-154.
98. Reader, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1:17-20
99. Rebolledo, V., Aparicio, A. & Cruz, H. 2006. Estudio preliminar para la propagación *in vitro* de dos especies de pinos. *Foresta Veacruzana*. 8(2):27-32.
100. Reyes, R. E. 1999. Las metalotioneínas como biomarcadores moleculares de la contaminación por metales pesados en organismos acuáticos. *Interciencia*. 24(6): 366-371.
101. Rouhier, N., Lemaire, S. T. & Jacquot, J. P. 2008. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *The Annual Review of Plant Biology*. 59:143-166.
102. Rugh, C. L., Wilde, D. H., Stack, M. N., Thompson, M. D., Summers, A & Meagher, R. B. 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:3182-3187.
103. Ruocco, M., Lanzuise, S., Vinale, F., Marra, R., Turra, D., Lois Woo, S. & Lorito, M. 2009. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic-fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 22(3):291-301.
104. Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Cervantes-Badillo, M. G., Rosales-Saavedra, M. T., Islas-Osuna, M. A & Casas-Flores, J.S. 2011. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyles pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21(7):686-696.
105. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1987. *Molecular Cloning a laboratory manual*. Second edition. CSHL Press. Pp 1.25-1.37.
106. Samuels, G. J. Chaverri, P., Farr, D.F. & McCray, E.B. 2011. *Trichoderma* Online, systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, United States Department of Agriculture Agriculture Research Service. Consultado em Octubre-Noviembre de 2011 en <http://nt.ars-grin.gov/taxadescrptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
107. Sanger, F., Nickelen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 1977. 74(12):5463-5467
108. Franca, L. T. C., Carriho, E. & Kist, T. B. 2002. A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 35(2): 169-200.
109. Sarwar, M. & Kremer, R.J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using method. *Letters in Applied Microbiology*. 20:282-285.
110. Schröder, P. 2002. Chapter 7 The role of glutathione and glutathione-S-transferase in plant reaction and adaptation to xenobiotics. *in* Significance of Glutathione to plant adaptation to the environment. Edited by Grill, D., Tausz, M. & De Kok, L. J. Kluwer Academic Publishers.
110. Sarkar, S., Satheshkumar, A., Jayanthi, R & Premkumar, R. 2010. Biosorption of Nickel by live biomass of *Trichoderma harzianum*. *Research Journal of Agriculture Sciences*. 1(2):69-74.

111. Sarowar, S., Y.J. Kim, E.N. Kim, K.D. Kim, B.K. Hwang, R. Islam, J.S. Shin. 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports*. 24, 216-224.
112. Secretaría de Economía. Panorama Minero del Estado de Querétaro. 2010. Consultado el 6 de enero de 2011 en www.sgm.gob.mx. Pp. 4, 14.
113. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca. Lo que usted debe saber sobre el mercurio y su situación en América del Norte. Serie No.1 Consultado el 5 de septiembre de 2010 in www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/download/93.pdf
114. Selin, N. E. 2009. Global Biochemical Cycling of Mercury: a Review. *Annual Review Environment and Resources*. 34:43-63
115. Shores, M., Yedidia, I. & Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*. 95(1):76-84.
116. Solis, S. 2010. Centro de Geociencias, UNAM.
117. Singh, H. 2006. Mycoremediation Fungal Bioremediation. Wiley Interscience. Pp 372
118. Skoog, D., West, D.M., Holler, J.F. & Crouch, S.R. 2000. Química Analítica. McGraw Hill. Pp: 614-650.
119. Skórzyńska-Polit, E. 2007. Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and challenges under heavy metal stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 76(1):49-54.
120. Spoel, S.H., Koomneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X. & Pieterse, C. M. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate- depend defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*. 15:760-770.
121. Tabak, H., Lens, P., van Hullenbusch, D. E. & Dejonghe, W. 2003. Developments in biorremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides. 3. Influence of chemical speciation and bioavailability on contaminants immobilization/mobilization bio-process. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 4:185-212.
122. Tabak, H., Lens, P., van Hullenbusch, D. E. & Dejonghe, W. 2005. Developments in biorremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides-1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 4:115-156.
123. Tamás, L., Dudíková, J., Ďurčková, K., Halušková, L., Huttová, J. & Mistrík, I. 2009. Effect of cadmium and temperature on the lipoxygenase activity in barley root tip. *Protoplasma*. 235:17-25
124. Trush, M. A. 2011. The science of environmental public health. Teaching environmental health to children An interdisciplinary approach Edited by Hursh, D. W & Martina, C. A. Springer. Pp 30-32
125. Turpeinen, R. 2002. Interactions between metals, microbes and plants-Bioremediation of arsenic and lead contaminated soils. Department of Ecological and Environmental Sciences, University of Helsinki.
126. Van der Ent, S, Van Wees, S. C.M. & Pieterse, C. M. J. 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance inducing beneficial microbes. *Phytochemistry*. 70:1581-1588.
127. Venkatachalam, P., Srivastava, A. K. Baghothama, K. G. & Sahi, S. V. 2009. Genes induced in response to Mercury ion exposure in heavy metal hyperaccumulator *Sesbania drummondii* *Environmental Science & Technology*. 43(3):843-850.
128. Vega, J. E. La minería de San Joaquín a través del tiempo. Consultado el 14 de Enero de 2011 en [/www.fiestaspatronalesqro.com.mx/revistas/siete/rev7art02.pdf](http://www.fiestaspatronalesqro.com.mx/revistas/siete/rev7art02.pdf). Pp. 4-11.
129. Verhage, A., van Wees, S & Pieterse, C. M. J. 2010. Plant immunity: it's the hormones talking but what do they say?. *Plant Physiology*. 154:536-540.
130. Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F. & Foyer, C. 2010. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle *Biochemical Journal*. 43:69-178.

131. Volke, T., Velasco, A. & de la Rosa, D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. SEMARNAT, INE. Pp. 57-115.
132. Vullo, D. L. 2009. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*. 2(3): 93-104.
133. Waldemar, M. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiology Plant*. 29:177-187.
134. Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. & Rausch, T. 2005. Differential targeting of *GSH1* and *GSH2* is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *The Plant Journal*. 41:15-30
135. Wasternack, C. 2006. Chapter 7 Oxylipins: biosynthesis, signal transduction and action. Pp 185-217 in *Plant hormone signaling* edited by Hedden, P & Stephen, G. T. 2006. Blackwell publishing.
136. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., New York
137. Wójcik M. & Tukiendorf, A. 2011. Glutathione in adaptation of *Arabidopsis thaliana* to cadmium stress. *Biologia Plantarum*. 55(1):125-132.
138. Xiang, Ch. & Oliver, D. J. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 10:1539-1550.
139. Xiang, Ch. & Oliver, D. J. 2001. Chapter 26: Multilevel regulation of glutathione homeostasis in higher plants. *Handbook of plant physiology and crop physiology* edited by Pessarakli, M. 2^o edition. Marcel Dekker, Inc. Pp 539-548.
140. Xu, J., Hengxia, Y., Liu, X. & Li, X. 2010 a. Salt affects plants Cd-stress responses modulating growth and Cd accumulation. *Planta*. 231:449-459.
141. Xu, J., Wang, W., Yin, H., Liu, X., Sun, H. & Mi, Q. 2010 b. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedling under cadmium stress. *Plant Soil*. Springer. 330:321-326.
142. Yadav, S. K. 2010. Heavy metal toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*. 76:167-179.
143. Yoshida, s., Tamaoki, M., Loki, M., Ogawa, D., Sato, Y., Aono, M., Kubo, A., Saji., S., Saji, H., Satoh, S. & Nakaj, N. 2009. Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*. 136:284-298.
144. Li, Y, Parkash, Dankher, O. P., Carreira, L., Smith, A.P. & Meagher, R. B. 2006. The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of the thiol-peptides to root conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology*. 141:288-298.
145. Zawiercha, I. & Malina, G. 2011. Chapter 8 Bioremediation of Contaminated soils: effects of bioaugmentation and biostimulation on enhancing biodegradating of oil hydrocarbons in *Soil Biology Vol. 28 Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol* edited by Singh, A., Parmar, N. & Kuhad, R. C. Springer. Pp 187-197
146. Zaidi, A., Oves, M., Ahmad, E & Khan, M. S. 2011. Chapter 21 Importance of free-living fungi in heavy metal remediation. Edited by Khan, M. S., Zaidi, A., Goel, R. & Musarrat, J. *Bio-management of metal-contaminated soils*. Springer. Pp. 480-494
147. Zalups, R. K. & Koropatnick, J. 2000. Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: relationship to content of mercury and metallothionein protein. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 295: 74-82.
148. Zhair, F. Rizwi, S. J., Haq, S. K. & Khan R. H. 2005. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20:351-360.
149. Zhou, S. Z., Guo, K., Elbaz, A. A. & Yang, Z. M. 2009. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental and experimental botany*. 65:27-34.

150. Zhu, Ch. 2005. Effects of abiotic stimuli and phytohormone ABA on the expression of the aquaporin gene family in maize roots. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Pp 78.

XIII. ABREVIATURAS, TÉRMINOS Y EQUIVALENCIAS

GSH glutatión (estado reducido de **GSSG**)

GSH1 γ -glutamil-cisteinil sintetasa*

GSH2 glutatión sintetasa*

GST glutatión-S-transferasa*

GSSG disulfuro de glutatión (estado oxidado de **GSH**)

GR glutatión reductasa*

PDF1.2 defensina*

PR-1a proteína relacionada a la patogénesis*

ACC ácido-1-amino ciclopropano carboxílico

LOX-1 lipoxigenasa*

AOS oxido aleno sintasa*

PCs fitoquelatín sintetasa*

PC fitoquelatinas

SA ácido salicílico

JA jasmonatos

ABC ATP binding cassette, transportador transmembranal

PAL fenil-amonio-liasa

ROS especies reactivas de oxígeno

RSI resistencia sistémica inducida

RSA resistencia sistémica adquirida

Trichoderma hongo filamentoso, estado asexual de hongos Ascomicetos del género *Hypocrea*

Arabidopsis thaliana planta perteneciente a la familia Brassicaceae

EAA espectrofotometría de absorción atómica

ICP espectroscopía de plasma acoplado inductivamente

PCR reacción en cadena de la polimerasa

oligonucleótido (primers) secuencia corta de DNA para amplificar un gen de interés por **PCR**

ATP trifosfato de adenosina

BLAST siglas en inglés de **Basic Local Alignment Sequence Tool**, herramienta de alineamiento para compara secuencias generando porcentajes de identidad de especies.

Biomagnificación proceso de bioacumulación de sustancias tóxicas en los productores primarios de la cadena trófica, que al ser consumidos por los herbívoros, la concentración de estas sustancias aumentan en éstos, incrementándose en los consumidores terciarios y así sucesivamente hasta llegar al hombre..

cDNA cadena complementaria del DNA (cadena complementaria del RNA)

DNA ácido desoxirribonucleico

RNA ácido ribonucleico

RT-PCR método semicuantitativo para medir la expresión de un gen de interés a partir de la cantidad de RNAm que se haya transcrito del gen de interés

sp. relativo a especie

spp. plural de sp.

M unidad química, concentración molar, expresa el número de moles de soluto por litro de disolución

mM concentración 10^{-3} molar

μ M concentración 10^{-6} molar

ppm mg/L, mg/Kg, μ g/g, ng/mg, pg/ μ g, μ g/ml, ng/ μ l = equivalente a 10^{-6}

ppb μ g/L, μ g/Kg, ng/g, pg/mg, ng/ml, pg/ μ l = equivalente a 10^{-9}

< menor que

> mayor que

\bar{x} media

***NOTA:** Para diferenciar entre gen y proteína, cuando se refiere al gen de plantas se hará escribiendo el nombre en mayúsculas y en cursivas, pero cuando sea de hongos se escribe en minúsculas y en cursivas. Cuando se hace referencia a la proteína de plantas se escribirá en mayúsculas no latinizadas, y de hongos se escribirá en minúsculas no latinizadas.

XIV. APÉNDICE

a. Anexo A Técnicas de Biología Molecular

1. Extracción de DNA de hongos

Buffer de extracción

Tris HCl	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0.5%

A 0.5 g de micelio molido se le añaden 500µl del buffer de extracción y se agita por inversión, posteriormente se añaden 500 µl de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se agita por 10 minutos. Luego se centrifuga a 13000 rpm por 30 min., se recupera la fase acuosa, la cual se extraerá nuevamente con fenol-cloroformo-álcool isoamílico y centrifugar a 13000 por 5 min. Recuperar la fase acuosa añadir 5µl de RNAsa dejando incubar por 30 min. Posteriormente se añaden dos volúmenes de isopropanol absoluto y centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Se decanta el sobrenadante y la pastilla obtenida se lava con etanol 70% y centrifugar a 13000 rpm por 5 min. Se deja secar la pastilla para luego resuspenderla en 50µl de agua miliQ estéril.

2. Mezcla de reacción de PCR y ligación en PGEM

Se amplificó el ITS del 18s, para ello se requirió de una reacción de 25µl que contiene

Mezcla de Reacción de PCR		Producto de PCR	1 µl
Taq polimerasa	0.5µl	Ligación del Producto de PCR	
Buffer para Taq	5 µl	PGEM	0.5 µl
dNTPs	0.5 µl	Ligasa	0.5µl
oligo ITS1	0.37 µl	Agua miliQ	3 µl
oligo ITS4	0.37 µl	Producto de PCR	5 µl
agua miliQ	17.2 µl		

La ligación se deja a 4°C toda la noche

3. Clonación del producto de PCR

LB carbenicilina/IPTG/Xgal		Carbenicilina	200 µl (stock
IPTG	20µl (stock	20µg/ml)	
100mg/ml)		LB	200
		ml	
Xgal	200 µl (stock		
1M)			

En 50µl de células Ca^{2+} -competentes se añaden 7µL de la ligación incubándolas en hielo por 15 min., se le da un choque térmico por un minuto a 42°C en termoblock y luego se pasan a hielo por 5 minutos. Posteriormente las células se pasan a 450µl de LB y se recuperan incubando a 37°C por 2 horas en agitación. Se centrifuga por 3 min., a 10000 rpm. La pastilla obtenida se siembra en LB con Xgal/IPTG/carbenicilina, se incuban 16 horas a 37°C.

Se pican las colonias blancas con un palillo estéril que se deposita en un tubo Falcon de 15 ml con 3000µl de LB con carbenicilina (1µl de carbenicilina por ml de medio)y se incuban en agitación toda la noche.

4. Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina (minipreps)

Solución Birboim 1

Tris HCl 25 mM pH 8.0
EDTA 10 mM pH 8.0
Glucosa 50 mM

Solución Birboim 3

Acetato de potasio 5M 60ml
Ácido acético glacial 11.5 ml
Agua miliQ estéril 28.5 ml

Solución Birboim 2

NaOH 0.2 N
SDS 1%
H₂O miliQ estéril

La solución resultante queda 3M respecto al potasio y 5M respecto al acetato.

Los cultivos se centrifugan a 12000 rpm por 30 segundos, recuperando y resuspendiendo las células en 200µl de la solución Birboim1 agitando en vortex y manteniendo los tubos en hielo, se le agrega 5µl de RNAsa y 400 µl de la solución Birboim2 mezclando lentamente por inversión e incubar 15 min., en hielo. Se añaden 300µl de la solución Birboim3 y se incuba por 15 min., en hielo.

Centrifugar a 12000 rpm por 15 min transfiriendo la fase acuosa a otro tubo, se repite este paso dos veces. Posteriormente se añade un volumen igual de isopropanol mezclando por inversión e incubar 15 min., a -20°C. Centrifugar a 12000 rpm por 15 min, decantar y lavar la pastilla con 500µl de etanol al 70% centrifugando a 12000 rpm por 2 min., este procedimiento se repite dos veces. La pastilla se deja secar y se resuspende en 50µl de agua miliQ estéril

5. Digestiones con *E co R1*

Para la digestión con esta enzima de restricción, se requiere de un volumen de 10 µl

<i>E co R1</i>	0.2 µl
Buffer <i>E co R1</i>	1 µl
Agua	6.8 µl
DNA	2 µl

6. Extracciones de RNA y síntesis de cDNA

A 0.5g de se le añaden 1000 µl de Trizol® homogenizando perfectamente y dejando incubar por 5 minutos horizontalmente, luego se añaden 200µl de cloroformo mezclando por inversión y dejando incubar por 3 minutos. Centrifugar a 12000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo añadiendo 500 µl de isopropanol e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. tirar el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 1000 µl de etanol al 75% centrifugando a 12000 por 5 min. La pastilla se deja secar y resuspende en 30-50µl de agua DPC estéril.

Checar la calidad del RNA por un gel desnaturalizante al 1% con formaldehído:

Soluciones empleadas:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1. Agua dietilpirocarbonato (DPC) | 0.1% |
| 2. MOPS | 10X |

Preparación de 500ml de MOPS 10X

- | | |
|---------------------|---|
| 1. MOPS | 20.93g |
| 2. Acetato de sodio | 2.05g |
| 3. EDTA | 1.5g (ajustar pH a 8.0 con NaOH preparado en agua DPC). |

Preparación del gel

- | | |
|-------------|------|
| 1. Agarosa | 1g |
| 2. MOPS 10X | 10ml |
| 3. Agua DPC | 84ml |

Disolver, al enfriar agregar 6ml de formaldehído al 37%.

Preparar el gel en una cámara de electroforesis con sus peines previamente tratada con Benzaldehído al 1% por 15 minutos.

En tubo de 600 μ l se añaden 5 μ l de RNA y 10 μ l del buffer de carga de Ambion® añadiendo 0.2 μ l de bromuro de etidio (por muestra). Las muestras se calientan por 15 minutos a 65°C y luego son cargadas en el gel. El buffer de corrida es MOPS 1X.

7. Síntesis de cDNA

Se empleó 1 μ g de RNA, para ello el RNA se cuantificó por espectrofotometría empleando el nanocrop. Se alicuotó el RNA y se trató con 1 μ l de DNAsa 10X, hasta un volumen final de 10 μ l y se incubó a 37°C por 30 minutos, posteriormente se desactivó con 2 μ l de EDTA 25mM a 72°C por 5 minutos. Luego se añadió 1 μ l de oligo DT y 1 μ l de dNTPs y calentar a 65°C por 5 minutos. Luego agregó 2 μ l de DTT 0.1M y 4 μ l de First Strand Buffer y calentó a 42°C por 20 minutos. Finalmente se añadió 0.5 μ l de SuperScript II y se llevó la reacción a un volumen final de 25 μ l con

agua DPC. Calentar a 42°C por 55 minutos dejando una extensión de 15 minutos a 70°C.

8. Programa de PCR en tiempo real

Mezcla de reacción

Se requiere de un volumen final de 20µl para cada reacción

Fast SYBR Green	10 µl
Oligos (forward y reverse)	(por estandarizar) µl
cDNA	(por estandarizar) µl

El programa especificado es de 20 segundos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos de desnaturalización y 60° C por 30 segundos de extensión.

b. Anexo B Medios de Cultivo

1.-Papa dextrrosa agar (PDA)

PDA(Bioxon®) 39g/L

O bien,

PDB(Difco®) 24g/L

Agar agar (Bioxon®) 16 g/L

2.-Medio LB

NaCl 5g

Extracto de levadura 5g

Triptona 10g

Agua 1 L

3.-Medio Murashige Skoog (MS)

MS 4.43g/L

Sacarosa 30g/L

Agar 16 g/L

Ajustar el pH a 5.7 con NaOH

4.- Medio para semihidroponia; Medio Hoagland

Para preparar un litro de la solución Hoagland 1X se requiere

SOLUCIÓN	REACTIVO	CANTIDAD
A	NH ₄ H ₂ PO ₄ 1M	1 ml
B	KNO ₃ 1M	6ml
C	Ca(NO ₃) ₂ 1M	4ml
D	MgSO ₄ 1M	2 ml
Solución de micronutrientes ¹		1 ml
Solución de hierro ²		0.25 ml

Solución de micronutrientes¹

H ₃ BO ₃	2.86 mg	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81 mg	H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0.02 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22 mg		

Solución de hierro²

Para un litro es necesario preparar dos soluciones, la primera consiste en disolver 19 g de KOH en 286 ml de agua destilada y agregar 26.1 g de EDTA. La segunda solución consiste en disolver FeSO₄·7H₂O en 500 ml de agua destilada, posteriormente ésta se añade lentamente a la solución de EDTA. Se afora a 1 litro y se deja en agitación toda la noche guardándola en frasco ámbar a 4°C.

c. Anexo C resultados no mostrados

1. Reactivo de Salkowski

FeCl₃ 5M

Ácido perclórico glacial

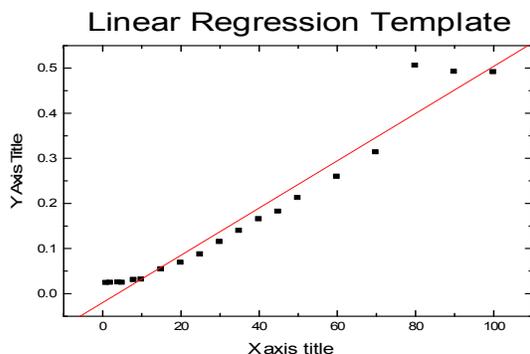
Para preparar 500ml del reactivo, añadir en una composición porcentual 2% de FeCl₃ 5M y 33% de ácido perclórico y el resto de agua destilada.

Los hongos se inocularan en matraces de 250 ml con 100 ml de caldo papa dextrosa (PDB, 24g/L) enriquecido con triptófano 0.5M, los cultivos se mantendrán en reposo por 7 días, posteriormente se decanta y el sobrenadante será utilizado para realizar la prueba tomando alícuotas de 2 ml a las cuales se les añadirán 3 ml del reactivo de Salkowski, se agitan moderadamente para homogenizar la muestra y se esperarán 30 minutos. Después de este plazo la prueba se considerará positiva si vira a un color rosa. Se añaden 2 gotas de ácido fosfórico el cual intensifica el color y la duración de éste, ya que genera un estado de oxidación aun mayor, motivo por el cual surge la coloración.

2.- Curva estándar

Dado que se desconoce cuánto IAA producen las distintas cepas de *Trichoderma*, se diseño una curva estándar de 19 puntos, que constaron de 1, 2, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/ml de IAA. Se partió de una solución stock de 500 µg/ml de IAA para efectuar las diluciones anteriores. Se añadieron 3ml del reactivo de Salkowski y 2ml de la dilución, por blanco se considero el reactivo de Salkowski. Las absorbancias se midieron a 530nm por triplicado.

La regresión lineal se efectuó en el programa Origin.



$$Y=A+B(x)$$

$$A=-0.0199$$

$$B=0.00524$$

3. Métodos de cualitativos y cuantitativos para determinar la producción de compuestos indólicos

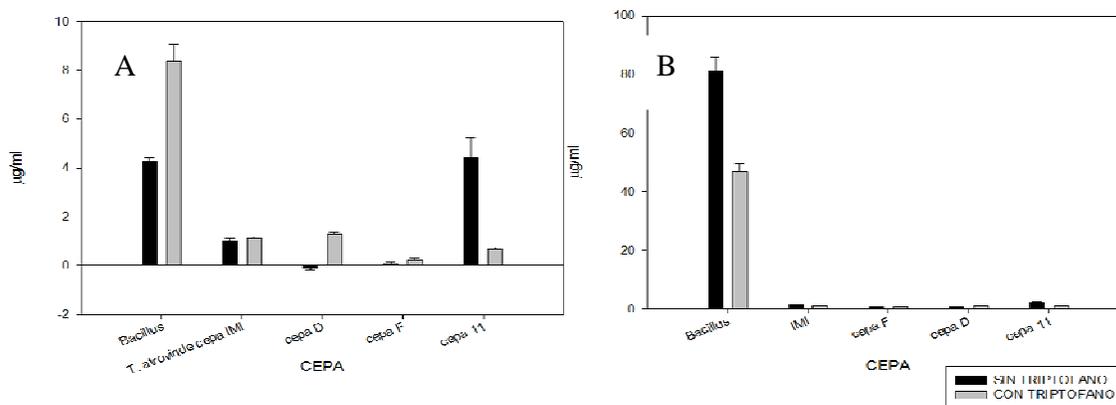


Figura C.3.1 Producción de compuestos indólicos por *Trichoderma* spp. En (A) adicionando 200µl de ácido ortofosfórico y en (B) se muestran los datos sin añadir dicho reactivo. La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce altos niveles de indoles, los cuales incrementan cuando se adiciona triptófano al medio. Nuestros resultados indican que al añadir el ácido ortofosfórico aumenta la sensibilidad de la prueba. Si comparamos los resultados vemos que cuando no se añade el ácido ortofosfórico la producción de IAA registrada en presencia de triptófano es baja, pero si a la reacción le añadimos el ácido ortofosfórico la producción registrada es mayor. Se grafican las medias de dos experimento independientes.

La prueba de Salkowski no es específica para detectar estos compuestos debido que resulta positiva para otros precursores como el indol-3-pirúvico, 5-hidroxi-indol-acético, indol-3-acetamida, indol acético, triptamina (Ahmad *et al.*, 2005; Mantilla, 2007), indol etanol, ácido indol propiónico, ácido indol butírico, ácido indol glioxílico e indol aldehído (Glickmann y Dessaux, 1995).

Hay dos formulaciones del reactivo de Salkowski, una con ácido perclórico y otra con ácido sulfúrico, ambos son agentes oxidantes provocando una transaminación sustituyendo el grupo amino por el cloro del cloruro férrico, sin embargo el poder oxidativo del ácido perclórico es mayor (Mantilla, 2007), pero la sensibilidad de la reacción depende del precursor de los compuestos indólicos que estén produciendo los microorganismos.

Se ha reportado que la sensibilidad del reactivo Salkowski elaborado con ácido sulfúrico para detectar compuestos indólicos en muestras de *Pseudomonas* enriquecidas con triptófano es menor o nula a la que reportan otros autores con el reactivo de Salkowski preparado con ácido perclórico, sugiriendo que la síntesis deriva de otro precursor y no del triptófano (Glickmann & Dessaux, 1995; Ahmad *et al.*, 2005).

Debido que la reacción mediada con ácido sulfúrico detecta compuestos indólicos derivados de indol etanol, indol aldehído e indol acético, es poco sensible a los derivados del indol etanolamina. Mientras que la formulación con ácido perclórico es sensible a derivados de indol etanolamina, ácido propiónico y ácido indol butírico (Glickmann y Dessaux, 1995).

También se observó que es necesaria la adición del ácido fosfórico, ya que este genera que la reacción sea más duradera debido que se incrementa la oxidación transaminación generando el aumento del color, lo cual permite una mejor lectura bajo 530 nm. En las primeras pruebas obteníamos que *B. thurigiensis* producía bajos niveles de compuestos indólicos en presencia de triptófano pero al agregar el ácido fosfórico las concentraciones aumentaban

4. Efecto del HgCl_2 sobre la germinación de *A. thaliana* bajo condiciones *in vitro*

Fue necesario conocer el efecto tóxico del Hg^{2+} en la germinación (**Figura C.4.1**) y en las plántulas (**Figura C.4.2**) bajo condiciones *in vitro* para saber la concentración de la cual se partiría para efectuar el ensayo bajo condiciones de invernadero y conocer los síntomas que el Hg^{2+} causa en *A. thaliana*. Una vez conocidos los síntomas y la concentración en la cual fueron más notorios, se procedió a efectuar otro ensayo pero inoculando *Trichoderma* spp. para ver los efectos que los hongos pudieran causar en las plantas.

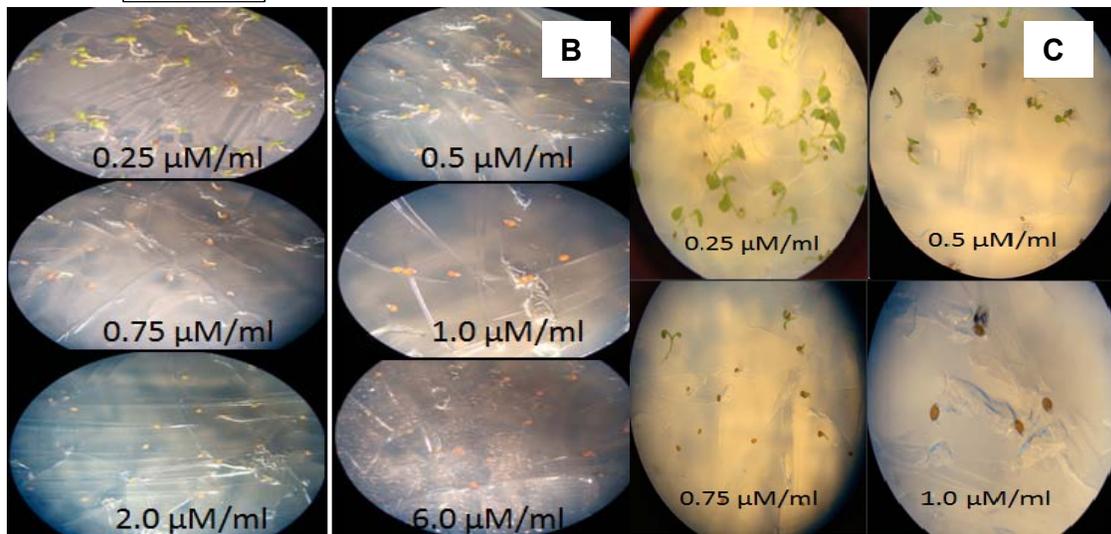
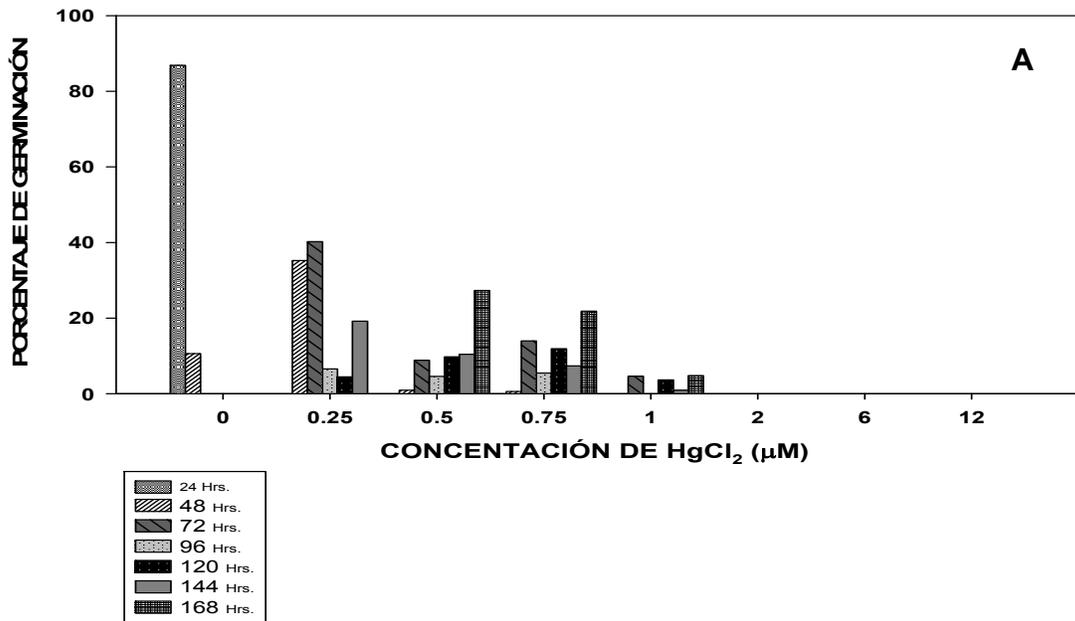


Figura C.4.1 Efectos tóxicos bajo distintas concentraciones de HgCl_2 , claramente se observa que la germinación de *A. thaliana* es afectada en dosis bajas ($0.25 \mu\text{M}$) y es inhibida completamente en concentraciones mayores a $2.0 \mu\text{M}$. Se observa que $0.25 \mu\text{M}$ de HgCl_2 retrasa la germinación 24 horas mientras que el doble de la concentración la retrasa 72 horas (A). En (B) se muestra la germinación bajo distintas concentraciones de HgCl_2 a 6 días y (C) a 13 días después de haber registrado el crecimiento en el medio sin HgCl_2 . Es notorio que *A. thaliana* supera el estrés causado por el Hg^{2+} , debido que después de 13 días se observaron plántulas de tamaño considerable bajo la concentración de $0.25 \mu\text{M}$ en comparación con las concentración de $0.5 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Por lo tanto La dosis mínima que permite la germinación de *A. thaliana* es $0.25 \mu\text{M}$ de HgCl_2 .

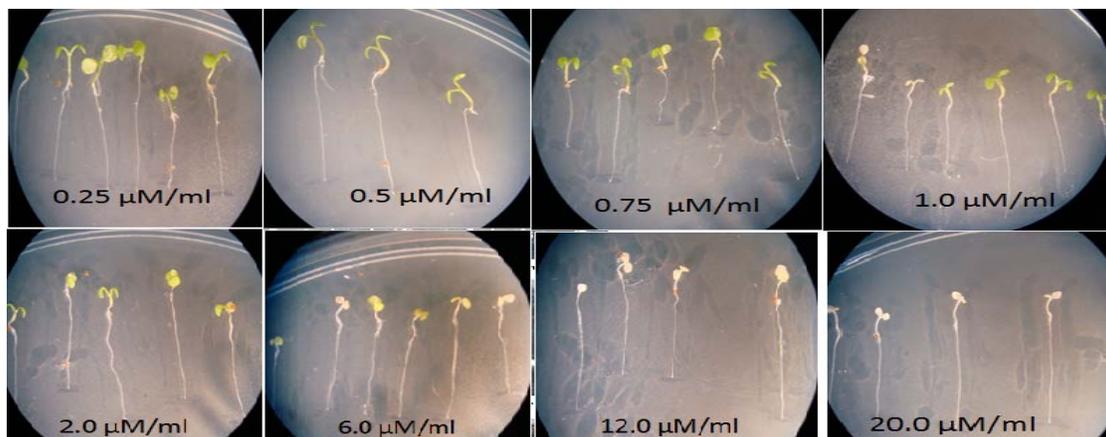


Figura C.4.2 Crecimiento de plántulas bajo condiciones *in vitro*, a los dos días de edad las plántulas fueron transferidas a medios bajo distintas concentraciones de HgCl_2 para ver el efecto tóxico del Hg^{2+} en *A. thaliana*. El efecto tóxico se observó a los 3 días de que estas fueron transferidas, claramente se observa que las plántulas logran sobrevivir bajo una concentración de $2.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 aunque no se registró crecimiento radicular, sin embargo en las concentraciones superiores a $2.0 \mu\text{M}$ las plantas se tornaron completamente cloróticas.

Bajo condiciones de invernadero se partió de la concentración de $2.0 \mu\text{M}$, teniendo los siguientes tratamientos 2.5 , 5.0 , 10 , 20 y $40 \mu\text{M}$ de HgCl_2 . Los tratamientos mencionados se aplicaron a las plantas de 7 días de edad. Se encontró que las plantas a 24 horas posteriores a la aplicación de los tratamientos de 2 , 2.5 y μM de HgCl_2 se encontraron vigorosas, presentando hojas verdes y tamaños similares a las plantas controles. Sin embargo a partir de la concentración de $10 \mu\text{M}$ de HgCl_2 en adelante, el crecimiento de las plantas se vio afectado y acumularon pigmentos tornándose de color pardo. En las plantas bajo la concentración de $20 \mu\text{M}$ de HgCl_2 se observaron algunas hojas quemadas, sin embargo la planta aun sobrevivía al presentarse rebrotes. Sin embargo bajo la concentración de $40 \mu\text{M}$ de HgCl_2 las hojas de todas las plantas estuvieron quemadas.

La acumulación de los pigmentos en las plantas bajo la concentración de $2.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 se observó 72 horas después de haber aplicado el tratamiento, mientras que las plantas bajo las concentraciones de 2.5 y $5.0 \mu\text{M}$ de HgCl_2 la acumulación de pigmentos se observó a las 36 horas.

Bajo condiciones de invernadero y al observar los efectos tóxicos del mercurio en distintas concentraciones, se procedió a inocular plantas con *Trichoderma* spp., bajo las mismas concentraciones para ver si los efectos tóxicos disminuían o no.

Las plantas inoculadas con la cepa IMI mostraron cianosis a los 6 días posteriores a la aplicación de 10µM/ml de mercurio. En tanto que las plantas inoculadas con la cepa 20-D y cepa 11, registraron la presencia de cianosis tres días después de haber aplicado el tratamiento. Mientras que aquellas plantas inoculadas con la cepa 20-F retrasaron la aparición de este síntoma, observándose 14 días después de la aplicación del tratamiento. También es importante señalar que la cepa 20-F es la que registra menor índice de cianosis, seguida por la 20-D y por último la IMI, todas bajo el tratamiento de 10µM/ml. Por otra parte tenemos aquellas plantas inoculadas con la cepa 11, las cuales presentaron el mayor porcentaje de cianosis

Sin embargo, en los tratamientos bajo la concentración de 20µM y 40µM, el número de plantas cianóticas incrementa y se manifiesta a partir de los tres días posteriores a la aplicación de los tratamientos, siendo mayor en el tratamiento de 40µM. Pero las plantas que se encuentran bajo el tratamiento con 20µM y con la interacción de *Trichoderma* spp., revierten la cianosis, sobre todo aquellas inoculadas con la cepa 20-F.

5. Comparación de plantas cianóticas a los 3, 6 y 14 días posteriores a la aplicación de diferentes concentraciones de $HgCl_2$. Estos datos solamente son preliminares y sugieren que se midan los niveles de antocianinas, debido que las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp. disminuyeron la acumulación de pigmentos y los rebrotes que emergían de estas plantas fueron de color verde en comparación de las plantas sin la interacción con *Trichoderma* spp., cuyos rebrotes presentaron color oscuro. **Es importante recordar que estos datos no son concluyentes y los niveles de antocianinas deben ser cuantificados, estos datos son cualitativos**

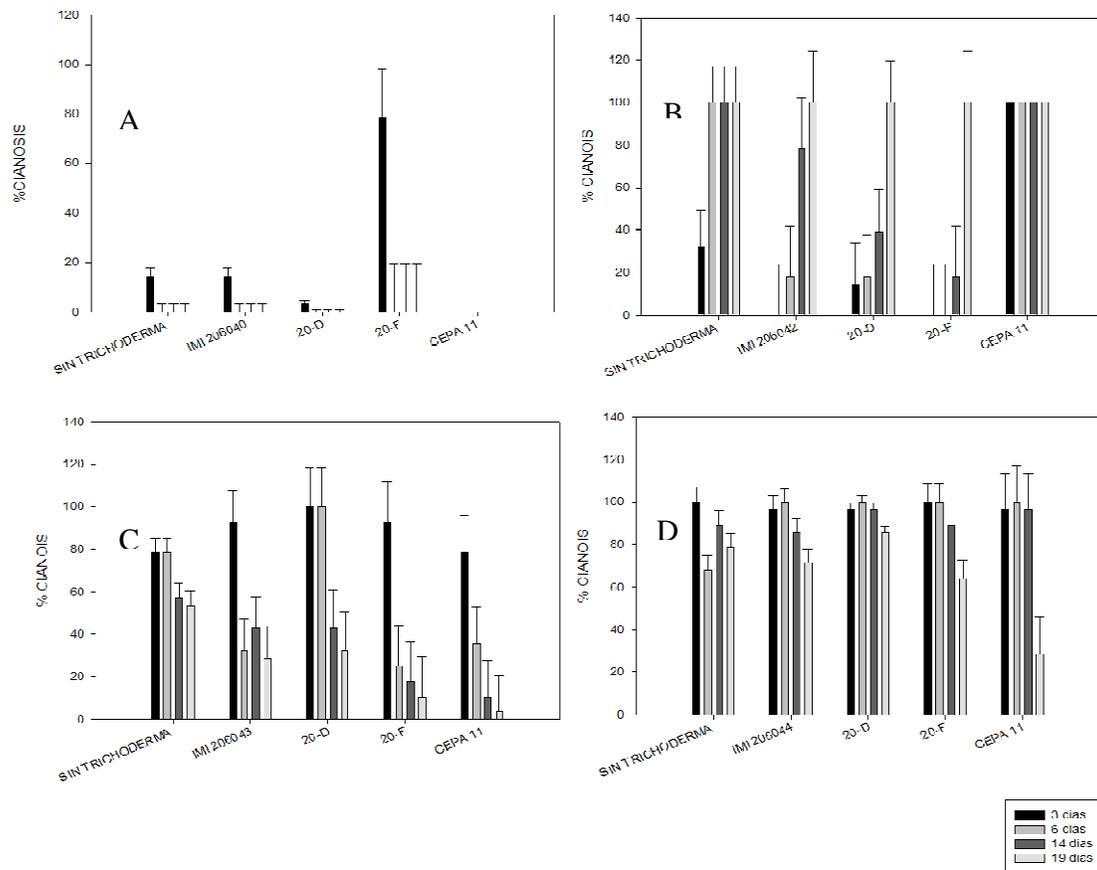


Figura C.5.1 La inoculación con las distintas cepas de *Trichoderma* disminuye la cianosis provocada por el $HgCl_2$ en *Arabidopsis thaliana*. Se muestran los porcentajes de cianosis a los 3, 6 y 14 días después de haber aplicado los tratamientos de 0 $\mu M/ml$ (A), 10 $\mu M/ml$ (B), 20 $\mu M/ml$ (C) y 40 $\mu M/ml$ de $HgCl_2$. Los datos se analizaron con la prueba de Friedman. De manera preliminar, las plantas bajo la interacción con *Trichoderma* spp. disminuyen la cianosis

6. Determinación de mercurio en tejido vegetal

Tabla C.6.1 Concentraciones de Hg en tejido vegetal determinados por EAA

CEPAS	TRATAMIENTO	TEJIDO	Hg TOTAL mg L⁻¹ (ppm)	Hg TOTAL mg/g⁻¹
SIN INOCULAR	CON MERCURIO	PARTE AÉREA	70.247	0.220154
SIN INOCULAR	SIN MERCURIO	PARTE AÉREA	53.982	0.169179
SIN INOCULAR	CON MERCURIO	RAÍZ	63.894	0.116797
SIN INOCULAR	SIN MERCURIO	RAÍZ	37.149	0.067908
IMI	CON MERCURIO	PARTE AÉREA	55.221	0.173061
IMI	SIN MERCURIO	PARTE AÉREA	41.626	0.130455
IMI	CON MERCURIO	RAÍZ	68.292	0.124838
IMI	SIN MERCURIO	RAÍZ	61.668	0.112783
CEPA 11	CON MERCURIO	PARTE AÉREA	70.440	0.220758
CEPA 11	SIN MERCURIO	PARTE AÉREA	46.283	0.14505
CEPA 11	CON MERCURIO	RAÍZ	67.188	0.122819
CEPA 11	SIN MERCURIO	RAÍZ	58.334	0.10663
20-D	CON MERCURIO	PARTE AÉREA	64.037	0.20069
20-D	SIN MERCURIO	PARTE AÉREA	50.820	0.15927
20-D	CON MERCURIO	RAÍZ	66.151	0.120922
20-D	SIN MERCURIO	RAÍZ	58.340	0.10664
20-F	CON MERCURIO	PARTE AÉREA	75.783	0.237503
20-F	SIN MERCURIO	PARTE AÉREA	68.446	0.21451
20-F	CON MERCURIO	RAÍZ	60.664	0.11089
20-F	SIN MERCURIO	RAÍZ	46.606	0.085196

***Nota** En la tabla anterior se registran los niveles de Hg total (ppm) en tejidos vegetales, tanto de plantas inoculadas con *Trichoderma* spp. como en plantas no inoculadas. Obsérvese que en los tejidos de las plantas a las cuales no se les aplicó el tratamiento con HgCl₂ se encontraron concentraciones relativamente bajas en comparación de las plantas a las cuales si se les aplico el tratamiento. La determinación de los niveles de mercurio se efectuó entre los grupos de plantas bajo los tratamientos con 40µM de HgCl₂.

Debido que los resultados se encuentran expresados en mg/L fue necesario calcular los mg de Hg por g de tejido vegetal. Para ello se consideró el peso seco 5 plantas de *Arabidopsis thaliana*, obteniendo 3.134g (0.003134Kg) para los tejidos de la parte aérea y de raíces el peso seco fue de 1.828g (0.00182Kg). Los valores se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\frac{mg}{g} = \frac{\text{concentración de Hg dada en } \frac{mg^{-1}}{L} \text{ (ppm)}}{1000} \text{ (peso del tejido vegetal dado en g)}$$

Los datos que se reportan en la **Tabla 7.6**, se obtuvieron restando a las concentraciones de las muestras de las plantas tratadas **con mercurio** las concentraciones de las muestras de los tejidos de las plantas **sin mercurio**.

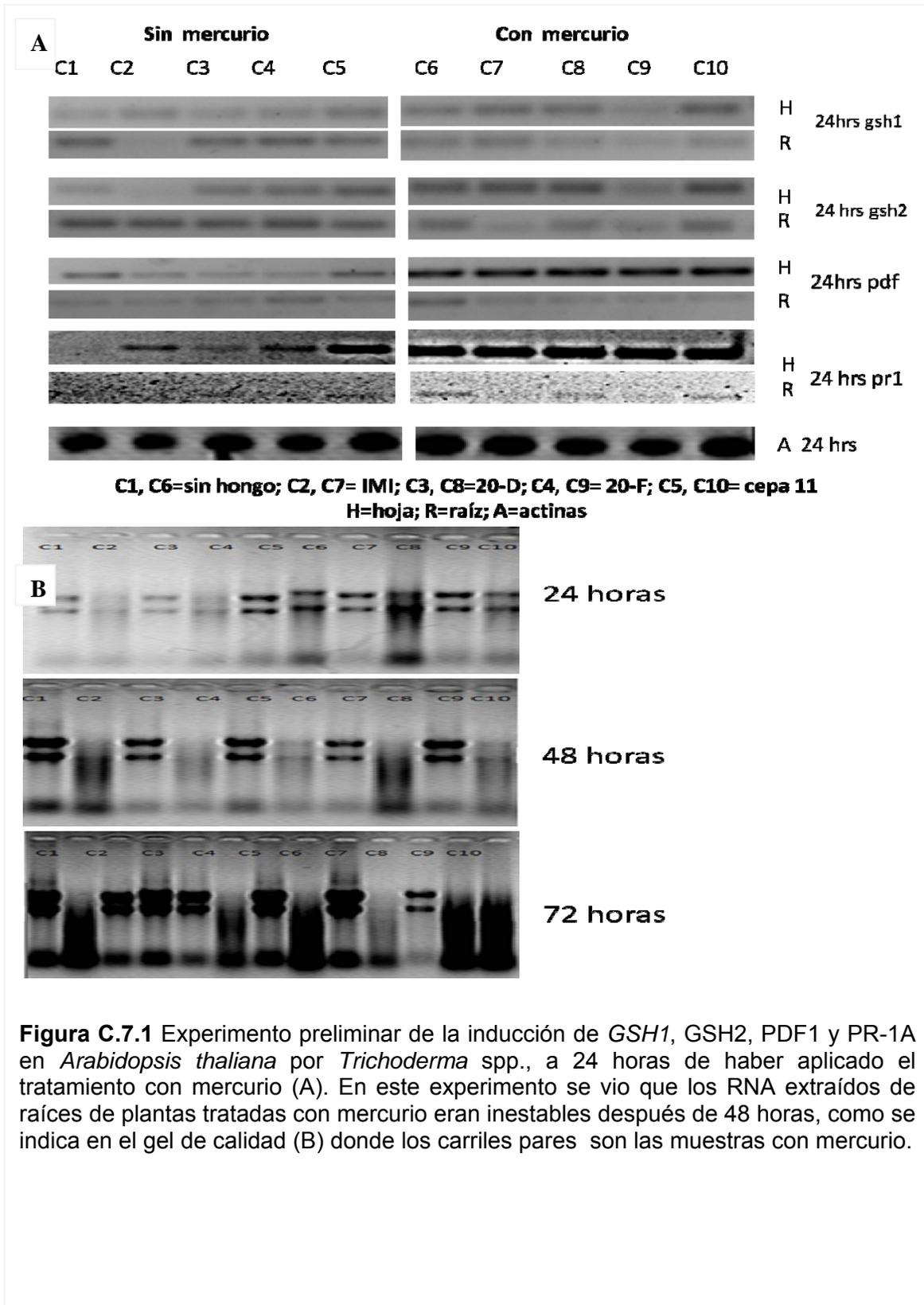
Por otro lado, cuando los resultados fueron expresados en µg/L (ppb), fue requerido convertir a µg/ml (ppm), como se observa en la **Tabla C.6.2**. Para determinar los niveles de Hg en el micelio de las diferentes cepas fue requerido convertir de µg/L a µg/ml. El peso del micelio fue de 1.0g (0.001Kg).

Cabe destacar que se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por ICP y EAA (P<0.05), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el efecto de *Trichoderma* sobre las concentraciones de Hg (P > 0.05).

Tabla C.6.2 Concentraciones de Hg total en tejido vegetal y micelio determinados por ICP

CEPA	TEJIDO	TRATAMIENTO	$\mu\text{g/L}$ (ppb)	$\mu\text{g/ml}$ (ppm)	mg/g^{-1}
S/N	RAIZ	con Hg	84.8272171	0.08482	0.155064
S/N	HOJA	sin Hg	78.7883792	0.07878	0.246922
S/N	RAIZ	con Hg	61.7474006	0.06174	0.112874
IMI	RAIZ	con Hg	30.8737003	0.03087	0.056437
D	RAIZ	con Hg	28.980581	0.02898	0.052976
S/N	RAIZ	con Hg	31.7094801	0.03170	0.057964
D	HOJA	con Hg	83.7195719	0.08371	0.262377
F	RAIZ	con Hg	31.358104	0.03135	0.057322
11	RAIZ	con Hg	31.6186544	0.03161	0.057798
D	RAIZ	sin Hg	38.1165138	0.03811	0.069676
S/N	RAIZ	sin Hg	34.2856269	0.03428	0.062674
S/N	HOJA	con Hg	40.2021407	0.04020	0.125993
IMI	HOJA	con Hg	26.0068502	0.02600	0.081505
F	HOJA	con Hg	47.2960245	0.04729	0.148225
11	HOJA	con Hg	60.2556575	0.06025	0.188841
D	HOJA	con Hg	35.2513761	0.03525	0.110477
11	HOJA	con Hg	38.6880734	0.03868	0.121248
IMI	HOJA	con Hg	25.0885321	0.02508	0.078627
IMI	RAIZ	con Hg	197.966361	0.19796	0.361882
D	HOJA	con Hg	38.4767584	0.03847	0.120586
11	RAIZ	con Hg	28.0540673	0.02805	0.051282
F	HOJA	con Hg	18.6612538	0.01866	0.058484
11	HOJA	con Hg	16.8992966	0.01689	0.052962
F	RAIZ	con Hg	18.2932722	0.01829	0.033440
IMI	HOJA	con Hg	18.6996636	0.01869	0.058604
F	RAIZ	con Hg	26.5974924	0.02659	0.048620
F	HOJA	con Hg	17.4238838	0.01742	0.054606
11	RAIZ	con Hg	25.9224465	0.02592	0.047386
IMI	RAIZ	con Hg	42.9415902	0.04294	0.078492
D	RAIZ	con Hg	51.1850153	0.05118	0.093566
F	HOJA	sin Hg	14.6488073	0.01464	0.045909
D	RAIZ	con Hg	20.0366972	0.02003	0.036627
S/N	HOJA	con Hg	14.5787462	0.01457	0.045689
S/N	HOJA	con Hg	13.5977982	0.01359	0.042615
IMI	MICELIO	75 $\mu\text{l/ml}$ Hg	13.6392661	0.01363	0.013639
D			18.5498777	0.01854	0.018549
F			17.5774618	0.01757	0.017577
11			20.0634251	0.02006	0.020063

7. Experimento preliminar de inducción de los genes que permitió establecer los tiempos de colecta.



Nombre de archivo: TESIS MAESTRIA Final preliminar.docx
Directorio: C:\Users\GERARDO\Desktop
Plantilla: C:\Users\GERARDO\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas
 \Normal.dotm
Título: TESIS DE MAESTRIA
Asunto: UAQ
Autor: BIÓLOGO 6250528
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 08/02/2012 12:30:00 p.m.
Cambio número: 222
Guardado el: 01/03/2012 01:37:00 a.m.
Guardado por: BIÓLOGO 6250528
Tiempo de edición: 4,194 minutos
Impreso el: 01/03/2012 02:08:00 a.m.
Última impresión completa
 Número de páginas: 136
 Número de palabras: 41,451 (aprox.)
 Número de caracteres: 227,984 (aprox.)