







UNIVERSITAT DE BARCELONA



**INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA SISTÈMICA A LES PLANTES PER L'AGENT DE CONTROL  
BIOLÒGIC *Trichoderma asperellum* SOCA T34 O SUBSTRATS SUPRESSIUS**

**Guillem Segarra Braunstein**

**Departament de Biologia Vegetal  
Universitat de Barcelona**

**Barcelona, 2007**





**Facultat de Biologia  
Departament de Biologia Vegetal**

**INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA SISTÈMICA A LES PLANTES PER L'AGENT DE CONTROL  
BIOLÒGIC *Trichoderma asperellum* SOCA T34 O SUBSTRATS SUPRESSIUS**

**Memòria de la tesi presentada per  
Guillem Segarra Braunstein  
per optar al grau de Doctor  
per la Universitat de Barcelona**

**Directores: Dra. Maria Isabel Trillas Gay i Dra. Eva Casanova Fernández  
Programa de doctorat: BIOLOGIA VEGETAL  
Bienni: 2003-2005**

**Doctorand**

**Vistiplau de les directores**

**Guillem Segarra Braunstein**

**Dra. Maria Isabel Trillas Gay**

**Dra. Eva Casanova Fernández**

**Barcelona, octubre de 2007**



## *Agraïments*

*Moltes gràcies...*

*A la Dra. Ma Isabel Trillas per haver-me donat la possibilitat de realitzar aquesta tesi, així com per l'optimisme, les crítiques i el suport que m'han permès fer aquest viatge. A la Dra. Eva Casanova per haver tingut sempre un moment per escoltar-me, per corregir tan pacientment els manuscrits i valorar tan entusiastament el meu treball (això sempre va bé per l'autoestima!). A les dues, gràcies per haver confiat en la meua manera de fer tot i que sovint era tan diferent de la vostra.*

*Als "biolocos" del departa i adoptats: Alex, Aritz, Cristina, David, Gemma, Iker, Isis, Laura, Luís, Mireia, Rubén, Sam... esteu bojos, però sou genials! I a tots els precaris amb qui he compartit aquest petit espai, a vegades surrealista, que anomenem Departament: Alberto, Boubker, Diana, Elena, Eva, Fagua, Jordi, Laura, Llorenç, Marta, Mercè, Montse, Nuri, Paula, Rebeca, Ricard, Salima, Santi, Tana i Zaida. A tots... no tinc paraules per agrair-vos tot el que heu fet per mi.*

*A l'Iker per les lliçons d'escalada que tant han contribuït en els darrers mesos de l'elaboració d'aquesta tesi a la meua salut física i mental. A la Tana i a la Lúdia per les converses místico-espirituals-marcianes tan profitoses, sobretot quan érem immigrants a les fredes terres del nord. Al Santi per les converses de passadís, tant les científiques com les personals.*

*A Ca la Mireia i la seva gent, que ens han donat aixopluc tantes vegades...*

*A tots els membres de la Unitat de Fisiologia Vegetal.*

*Al personal de Proteòmica, Cromatografia i Espectrometria de Masses dels Serveis Científicotècnics del Parc Científic pel seu treball, a la vegada rigurós i entusiata, i per l'ajuda desinteressada que m'han brindat.*

*Al Dr. Sergi Munné per tenir tanta paciència en un despatx tan massificat.*

*A la Mercè per l'ajuda i l'eficiència en la preparació de tota la paperassa que acompanya una tesi.*

*Al Dr. Manuel Avilés y a la Dra. Celia Borrero de la Universidad de Sevilla por su apoyo y afecto.*

*I would like to thank Dr. Corné Pieterse for accepting me in his lab and giving me the opportunity to learn so many things. Thanks to Sjoerd and Maartekē (Tik hem aan!) for adopting me when I was a homeless in the Netherlands. Thanks to everybody at the Phytopathology lab in Utrecht for being so kind and helpful. Hasta la pasta!*

*I would like to thank Dr. Ilan Chet (The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for kindly providing the isolate of Pseudomonas syringae pv. lachrymans.*

*A Miguel (Estación Espacial del Calabacín) lo bien que nos lo pasamos esos meses en Holanda....*

*A en Gabriel i en Joan per l'amistat, les cerveses, cafès i teràpies psicològiques diverses.*

*A Willowisp per l'energia.*

*A la Irene per tot el que ens hem donat i tot el que hem après.*

*A la Laia per la sorpresa.*

*A l'Arnau, que un bon dia triomfarà i caldrà fer cua per veure les seves pel·lícules.*

*Al pare i la mare per ser uns fans incondicionals dels seus fills i donar tant, sovint rebent menys del que es mereixerien...*

Aquesta tesi s'ha realitzat amb el finançament del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, del Fons Social Europeu i del Ministeri Espanyol d'Educació i Ciència (Projectes AGL2002-04313-C03-01 i AGL2005-08137-C03-01).



# Índex

<b>Abreviatures</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1.1. Els productes fitosanitaris a l'agricultura	3
1.1.1. Problemes dels productes fitosanitaris	3
1.1.2. Els productes fitosanitaris, l'agricultura ecològica i la protecció integrada a Europa	5
1.2. Alternatives als fitosanitaris químics de síntesi	6
1.2.1. Els composts en la reducció de les malalties de les plantes	8
1.2.2. Els agents de control biològic. El gènere <i>Trichoderma</i>	11
1.3. La inducció de resistència a les plantes	14
1.3.1. El <i>priming</i> i la resistència sistèmica adquirida	15
1.3.2. El <i>priming</i> en les interaccions beneficioses de microorganismes amb les plantes	15
1.3.3. Els mecanismes del <i>priming</i>	17
1.3.4. L'ús de mutants en la dissecció de les vies de senyalització	18
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>21</b>
<b>3. RESULTATS</b>	<b>25</b>
3.1. Capítol 1. Efectes supressius dels composts emprats com a substrats de cultiu contra <i>Botrytis cinerea</i> en plantes de cogombre	27
Resum	29
Article: <b>The suppressive effects of composts used as growth media against <i>Botrytis cinerea</i> in cucumber plants</b>	31
3.2. Capítol 2. Quantificació simultània d'àcid salicílic i àcid jasmònic per mitjà d'LC-ESI-MS/MS en extractes crus de <i>Cucumis sativus</i> sotmès a estrès biòtic	41
Resum	43
Article: <b>Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of <i>Cucumis sativus</i> under biotic stress</b>	45
3.3. Capítol 3. Canvis en els nivells d'àcid salicílic, d'àcid jasmònic i del proteoma de plantes de cogombre inoculades amb la soca T34 de <i>Trichoderma asperellum</i>	53
Resum	55
Article: <b>Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with <i>Trichoderma asperellum</i> strain T34</b>	57

3.4. Capítol 4. La resistència sistèmica induïda per <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34 en arabidopsis és similar a la ISR induïda per rizobacteris	67
Resum	69
Article: <b>Signaling of <i>Trichoderma</i>-induced systemic resistance in Arabidopsis is similar to rhizobacteria-mediated ISR</b>	71
<b>4. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>81</b>
4.1. Reducció de la malaltia foliar produïda per <i>Botrytis cinerea</i> en plantes de cogombre cultivades en substrats formulats a base de composts	83
4.2. Mecanismes implicats en la supressivitat dels composts	83
4.3. Optimització d'un mètode per quantificar SA i JA de manera simultània en extractes vegetals	85
4.4. Efecte de la inoculació del substrat de cultiu amb <i>Rhizoctonia solani</i> o <i>Trichoderma asperellum</i> T34 sobre els nivells d'SA i JA de les plantes de cogombre	85
4.5. Inducció de resistència sistèmica en planta de cogombre mitjançant altes concentracions de <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34	86
4.6. Efecte de la inoculació amb diverses concentracions de <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34 en l'activitat peroxidasa i els nivells d'SA i JA de les plantes de cogombre	87
4.7. Efecte de la inoculació de les rels amb una alta concentració de <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34 en el proteoma dels cotilèdons de planta de cogombre	88
4.7.1. Proteïnes de defensa i relacionades amb la malaltia	88
4.7.2. Proteïnes d'energia i metabolisme, metabolisme secundari i síntesi i plegament de proteïnes	89
4.8. Inducció de resistència sistèmica en arabidopsis mitjançant <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34	89
4.9. Estudi de les vies de senyalització de la resistència sistèmica induïda per <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34 mitjançant mutants d'arabidopsis	90
4.10. El <i>priming</i> en la inducció de resistència sistèmica per <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34	91
4.11. Síntesi dels mecanismes d'inducció de resistència sistèmica per <i>Trichoderma asperellum</i> soca T34	93
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>95</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA (de la Introducció i del Resum dels resultats i discussió)</b>	<b>99</b>

# Abreviatures

Les abreviatures escollides han estat les que s'utilitzen en anglès, ja que són les que es troben més habitualment en la literatura científica.

Abreviatura	Català	Anglès
BCA	Agent de Control Biològic	<i>Biological Control Agent</i>
ET	Etilè	<i>Ethylene</i>
HSP	Proteïna de Xoc Tèrmic	<i>Heat Shock Protein</i>
ISR	Resistència Sistèmica Induïda	<i>Induced Systemic Resistance</i>
JA	Àcid Jasmònic	<i>Jasmonic Acid</i>
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida - Ionització per Electroesprai - Espectrometria de Masses en Tàndem	<i>Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry</i>
MRM	Monitorització de Múltiples Reaccions	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	Àcid Ribonucleic Missatger	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
PGPR	Rizobacteris Promotors del Creixement	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
PR	Relacionat amb la Patogènesi	<i>Pathogenesis Related</i>
SA	Àcid Salicílic	<i>Salicylic Acid</i>
SAR	Resistència Sistèmica Adquirida	<i>Systemic Acquired Resistance</i>



# 1. INTRODUCCIÓ



## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Els productes fitosanitaris a l'agricultura

La producció agrícola està amenaçada per malalties que produeixen pèrdues d'entre el 20 i el 25% de les collites del món. El control de les malalties de les plantes és essencial a l'agricultura per respondre a la demanda creixent d'aliments i fibres per part dels més de 6000 milions d'habitants de la Terra. Amb un increment de la població mundial de 2000 milions de persones previst pel 2030, la pressió sobre la principal font d'aliment està creixent ràpidament, alhora que decreix la superfície cultivable fèrtil i els recursos naturals per fertilitzar. Des que l'home va iniciar l'agricultura fa més de 8000 anys hi ha hagut problemes de plagues i malalties que han atacat les plantes cultivades. Tanmateix, l'evolució de l'agricultura ha conduït a una situació on els problemes deguts a plagues s'han anat agreujant per la tendència a emprar varietats de plantes més productives i menys rústiques, l'ús de grans superfícies de monocultiu genèticament uniformes, l'augment de les dosis d'adobat que poden fer la planta més sensible a certes plagues i malalties, i la rapidesa del transport de material vegetal entre regions diferents que pot actuar de vehicle de transmissió de patògens a zones on no existien (Agrios, 1997). Malgrat que la utilització de remeis contra les plagues es remunta a mil·lenis enrera, fins l'any 1940 es pot dir que el ventall disponible estava limitat a uns pocs productes, la seva majoria d'origen natural (bàsicament sofre i sulfat de coure). A partir dels 40, el descobriment del diclorodifeniltricloroetà o DDT va marcar un punt d'inflexió en la fitoterapèutica i des d'aleshores el desenvolupament de productes orgànics de síntesi ha estat ràpid i constant (Coscollá, 2004). Durant les primeres dècades de l'ús dels plaguicides de síntesi la visió optimista dels seus resultats va portar a l'ús massiu i generalitzat. Com a exemple de l'anomenada "espiral de tractaments" trobem el fet que al llarg de la segona meitat del segle XX la incidència negativa de les plagues es va duplicar mentre que l'ús de plaguicides es va multiplicar per deu (Pimentel, 1985).

#### 1.1.1 Problemes dels productes fitosanitaris

Fins que la Rachel Carson va disparar l'alarma el 1962 amb el seu llibre *Silent Spring* (Carson, 1962), hom creia que els plaguicides només eren tòxics pels patògens, fins i tot els científics

posaven en dubte la toxicitat dels plaguicides pels animals i pels humans com no fos deguda a una ingestió accidental. El cert és que els posteriors estudis van revelar la toxicitat pels insectes, cucs de terra, ocells, peixos, plantes i animals. Els fitosanitaris químics no només afecten els patògens, sinó que poden ser nocius per les plantes i pels organismes antagònics dels patògens. L'ús de fungicides específics contra una malaltia pot conduir a l'augment de la població i gravetat de la malaltia produïda per un altre patògen que no és afectat per aquell fungicida. Això succeeix per exemple amb el benomil, que és un fungicida d'ampli espectre que controla la majoria, però no tots els patògens (Agrios, 1997).

L'ús de fitosanitaris de toxicitat inespecífica pot produir l'empobriment microbiològic del sòl, fent-lo més susceptible a ser infestat novament per altres patògens, i facilitant que aquests arribin a infectar l'arrel (Altman i Rovira, 1989). Sovint succeeix que, amb l'ús reiteratiu i continuat d'un mateix fitosanitari per controlar un patògen, aquell va perdent eficàcia i el patògen arriba a fer-se resistent. En alguns casos, soques resistents a un determinat fungicida poden aparèixer dos anys després de l'inici de la seva aplicació. En el present, alguns dels patògens fúngics més importants, com per exemple *Alternaria*, *Botrytis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Sphaerotheca*, *Mycosphaerella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium* i *Ustilago*, han produït soques resistents a un o més fungicides sistèmics. El fenomen de l'aparició de resistències condueix a la cursa constant per al desenvolupament de nous productes (Cook et al., 1996). A vegades l'ús de fitosanitaris pot no ser efectiu. El control de patògens com *Fusarium*, que presenta una elevada resistència a la majoria de fitosanitaris, s'ha basat en molts casos en la desinfecció del sòl per solarització, fumigació amb productes químics biocides com ara el bromur de metil, amb vapor o per biofumigació, i el cultiu de varietats resistents (Fravel et al., 2003).

Com a contrapartida als beneficis dels fitosanitaris, la seva aplicació ha estat associada a problemes greus tals com els efectes aguts i crònics sobre la salut humana, contaminació del sòl i l'aigua, destrucció de la capa d'ozó i toxicitat pels animals i plantes (Pimentel, 1996; WHO/UNEP, 1989; Bull, 1982).



### 1.1.2 Els productes fitosanitaris, l'agricultura ecològica i la protecció integrada a Europa

En resposta a una creixent preocupació pels efectes secundaris dels fitosanitaris, la legislació europea que regula la comercialització de productes per la seva aplicació com a productes fitosanitaris s'ha fet més estricta (Directriu 91/414/CE i les seves posteriors modificacions). En aquest marc es proposa la creació d'una Llista Única Comunitària de les substàncies actives i de les seves formulacions. De les substàncies actives que es venien a Europa abans de l'any 1993 se n'han rebutjat 595 i només 90 han estat aprovades; 286 encara estan sent revisades ([http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/index_en.htm)).

Així doncs, els agricultors estan rebent una pressió creixent perquè redueixin l'ús de pesticides i implementin pràctiques d'agricultura sostenibles (Litterick et al., 2004), com l'agricultura ecològica i la producció integrada.

Segons el Reglament CE 2092/91 de la Unió Europea, l'agricultura ecològica, orgànica o biològica és aquella que defineix un sistema agrari l'objectiu del qual és l'obtenció d'aliments de màxima qualitat, respectant el medi ambient i conservant la fertilitat de la terra, mitjançant la utilització òptima dels recursos naturals, exclouent l'ús de productes químics de síntesi i procurant un desenvolupament agrari sostenible (Figura 1).

El control biològic és la utilització d'éssers vius diferents de l'home capaços de reduir la quantitat d'un patògen o la malaltia que produeix (Cook i Baker, 1983).

La protecció integrada, segons la definició de la FAO (Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació) de 1967, consisteix en un "sistema de protecció contra els enemics dels cultius que, tenint en compte la dinàmica de les poblacions de les espècies considerades, emprant tots els mitjans i tècniques apropiats, de manera tan compatible com sigui possible, amb la finalitat de mantenir les poblacions de les plagues a un nivell suficientment baix, perquè les pèrdues produïdes siguin econòmicament tolerables" (Figura 1). Aquesta definició engloba els tres components essencials de la protecció integrada:

- coneixement de la dinàmica de les poblacions de plagues, cosa que suposa una avaluació del risc
- caràcter tolerable de la plaga fins que la població arriba al llindar econòmic d'intervenció

- utilització de totes les tècniques o mesures apropiades amb la finalitat d'impedir que les poblacions de plagues sobrepassin aquests nivell

La Unió Europea, a través de la Directiva 91/414/CEE, defineix la "lluita integrada" com "l'aplicació racional d'una combinació de mesures biològiques, biotecnològiques, químiques, agronòmiques o de selecció d'espècies vegetals, de manera que la utilització de productes fitosanitaris químics es limiti al mínim necessari per mantenir la població de la plaga en nivells inferiors als que produiran danys o pèrdues inacceptables des d'un punt de vista econòmic".



**Figura 1.** Logotips que certifiquen que els productes han estat produïts d'acord amb les respectives normes (d'esquerra a dreta i de dalt a baix): distintiu català d'agricultura ecològica i distintiu europeu d'agricultura ecològica (Reglaments CE 838/2007 i 2092/91), distintiu català de producció integrada (Decret 214/2002) i distintiu espanyol de producció integrada (Reial Decret 1201-2002).

## 1.2 Alternatives als fitosanitaris químics de síntesi.

El mètodes no químics de control dels patògens de les plantes inclouen (Coscollá, 2004):

- la **biofumigació**, que és la incorporació de fems immadurs al sòl per tal que fermentin i desprenguin gasos tòxics
- el **cultiu sense sòl**, que consisteix en utilitzar substrats naturals o artificials lliures de patògens en substitució del sòl (que pot ser reservori de malalties)

- l'ús de **varietats resistents**, el cultiu de plantes que són genèticament més resistents a patògens és un mètode evident de controlar una malaltia ja que des d'antic s'han anat seleccionant aquelles plantes que eren menys atacades
- l'**empelt** de varietats productives sobre peus resistents permet protegir els cultius de malalties edàfiques
- la **solarització**, que és l'escalfament de la capa superficial del sòl cobert amb un plàstic transparent que deixa passar la radiació solar incident, però que reté la radiació reflexada pel sòl
- la **desinfecció amb vapor d'aigua** consisteix en esterilitzar o desinfectar el sòl per mitjà de l'aplicació de vapor d'aigua a altes temperatures
- les pràctiques culturals com:
  - **rotacions**, l'objectiu és no posar plantes susceptibles a ser atacades pels mateixos patògens durant un temps prudencials perquè es debiliti o desapareixi el patogen
  - aplicació **d'esmenes orgàniques**, l'addició de matèria orgànica al sòl pot augmentar l'activitat i diversitat microbiana del sòl i pot augmentar el caràcter supressiu del sòl sobre certes malalties
  - **maneig del reg i de la fertilització**, ja que pot influir directament sobre el patogen (proporcionant condicions més o menys favorables pel seu atac) o indirectament (a través del manteniment de millors condicions vegetatives de la planta)
  - **plantes trampa**, es tracta de cultivar plantes que siguin més atractives pel patogen que el propi cultiu de manera que l'ataquin menys
  - **plantes reservori**, cultiu de plantes que poden albergar enemics naturals dels patògens
  - **ajust de les èpoques de plantació**, es tracta de situar el cultiu de manera que la fase fenològica susceptible de ser atacada estigui el menys exposada possible al període probable d'atac del patogen
- l'ús de **composts** com a substrats supressius de malalties
- l'ús d'**agents de control biològic**

Les dues últimes alternatives del llistat anterior són les que s'estudien en el present treball.

### 1.2.1 Els composts en la reducció de les malalties de les plantes

El compostatge és un procés dinàmic que consisteix en tres fases en què la matèria orgànica es mineralitza i es transforma per les activitats dels microorganismes aeròbics. El producte resultant és parcialment humificat de manera similar als components recalcitrants dels sòls (Debertoldi et al., 1982). En condicions de maneig òptimes hi ha una fase inicial mesofílica, d'una duració aproximada d'una setmana, en què la temperatura de la pila augmenta fins uns 50°C. Durant la següent fase –anomenada termofílica– la temperatura puja per sobre dels 50°C amb una duració variable segons el material i metodologia del compostatge. La tercera fase és la de maduració, en què la temperatura cau per sota de 50°C durant un període mesofílic llarg (fins a un any). Cada fase es caracteritza per una successió previsible de comunitats microbianes, la composició de les quals és influenciada per les modificacions fisicoquímiques que la comunitat precedent ha provocat a la pila (Chang i Hudson, 1967).

Els avenços en l'agricultura que es van produir el segle passat, com la introducció de fertilitzants inorgànics, fungicides i varietats resistents, i les millores en les pràctiques culturals van permetre a l'agricultor trencar la connexió entre aplicació de matèria orgànica i fertilitat del sòl. Com a resultat, els subproductes van esdevenir residus enlloc de recursos. En conseqüència, els sòls perderen matèria orgànica i estructura i certes malalties edàfiques prengueren proporcions d'epidèmia (Hoitink i Boehm, 1999). El compostatge de diversos subproductes com els de l'agricultura i la ramaderia, així com també el de la brossa procedent de recollida selectiva de matèria orgànica, proporciona composts que poden servir com a substrats per al cultiu sense sòl o com a esmenes orgàniques per al cultiu en sòl. L'ús del compost permet reprendre la connexió entre aplicació de matèria orgànica i fertilitat del sòl. El compost com a substrat pel cultiu sense sòl (cultiu en contenidor) es pot obtenir a un cost inferior al de la torba i pot proporcionar cultius productius (Trillas et al., 2002).

Alguns composts emprats com a substrat de cultiu són capaços de reduir la incidència i severitat de malalties de plantes com per exemple *Aphanomyces euteiches* (Stone et al., 2003; Lumsden et al., 1983), *Fusarium* spp. (Borrero et al., 2004; Cotxarrera et al., 2002; Trillas-Gay et al., 1986), *Macrophomina phaesolina* (Lodha i Burman, 2000), *Mycosphaerella pinodes*

(Schuler et al., 1993), *Phytophthora* spp. (Aryantha et al., 2000; Lumsden et al., 1983), *Pythium* spp. (Mandelbaum i Hadar, 1990; Lumsden et al., 1983), *Rhizoctonia solani* (Trillas et al., 2006; Tuitert et al., 1998; Stephens et al., 1981), *Sclerotinia* spp. (Lumsden et al., 1983), *Thielaviopsis basicola* (Abawi i Widmer, 2000) i *Verticillium dahliae* (LaMondia et al., 1999). El paper supressiu dels composts ha estat àmpliament documentat des de Hoitink et al. (1975), principalment per malalties edàfiques. Litterick et al. en van fer un recull exhaustiu en el seu article de revisió de 2004 (Litterick et al., 2004).

Tränkner (1992) va proposar que els composts també podien tenir efectes sistèmics positius sobre el control de malalties foliars i actualment hi ha alguns treballs que recolzen aquesta idea en diverses malalties com *Colletotrichum* spp. (Abbasi et al., 2002; Zhang et al., 1998), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Stone et al., 2003), *Alternaria solani* (Mills et al., 2002), *Puccinia* spp. (Loschinkohl i Boehm, 2001) i *Botrytis cinerea* (Horst et al., 2005). Tanmateix, els mecanismes implicats en la millora de la resistència de les parts aèries de les plantes per part de composts han estat molt poc estudiats.

El fenomen de la supressivitat dels composts s'explica tant per factors abiòtics com biòtics que afecten la capacitat del patògen de causar malaltia, ja sigui perquè incideixen sobre la seva capacitat de sobreviure com a sapròfit en el substrat de cultiu, arribar a la rizosfera i infectar la planta (competència per l'espai i nutrients amb la microflora establerta en el compost, antibiosi, hiperparasitisme), o perquè incideixen sobre els mecanismes de resistència de la planta (Hoitink i Boehm, 1999).

Els mecanismes de control degut a l'activitat microbiològica es poden dividir en generals i específics (Baker i Cook, 1974). El terme general s'empra en aquells casos en què la supressivitat es pot atribuir a l'activitat de diverses menes de microorganismes. Els propàguls dels patògens que són afectats per la supressivitat general són petits, no acumulen grans quantitat de nutrients i depenen de fonts exògenes de nutrients per la germinació i infecció (Nelson, 1990). Aquests patògens són sensibles a la microbiostasi. En són exemples *Phytophthora* i *Pythium* spp. (Hoitink et al., 1997). La supressivitat específica es produeix quan només un o dos organismes són responsables de la supressió de cert patògen o de la malaltia que produeix. Els propàguls d'aquests patògens són més grans (sovint són esclerocis) i no depenen de les fonts de carboni externes per geminar i infectar. En alguns casos, com el de *R.*

*solani*, durant la supressió, els esclerocis són colonitzats per hiperparàsits específics i el seu potencial com a inòcul queda reduït. En altres, la germinació és inhibida per la producció d'antibiòtics específics per part de microorganismes antagònics (Litterick et al., 2004).

En un principi es va donar molta importància a l'efecte directe dels microorganismes dels composts sobre el patogen (Hoitink et al., 1975). La major part dels estudis de supressivitat de malalties edàfiques suggereixen que la microbiostasi (per exemple, competició i/o antibiosi) i l'hiperparasitisme són els principals mecanismes de control. Darrerament s'ha donat èmfasi a la inducció de resistència sistèmica a la planta per part dels microorganismes dels composts (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1996) o habituals als sòls (Yedidia et al., 2000; Yedidia et al., 1999; Van Loon et al., 1998).

En el cas del control de patògens foliars mitjançant l'aplicació de compost en el substrat de cultiu, la supressió seria fruit bàsicament de la millora dels mecanismes de resistència de la planta. Sembla ser que només una petita proporció de composts presentaria la capacitat d'induir resistència sistèmica, i que aquesta inducció podria estar vinculada amb una petita fracció dels microorganismes presents en el compost. En un assaig en què es va estudiar la capacitat de diversos composts de reduir la malaltia produïda a les fulles de rave per *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, només un dels 79 composts estudiats fou capaç de suprimir la malaltia (Krause et al., 2003). A més a més, el grau de resistència assolit és altament variable, i el mecanisme mitjançant el qual té lloc aquesta inducció no és encara del tot conegut (Krause et al., 2003). Uns treballs pioners van proposar que els composts induïen una resistència sistèmica que seria similar a la que indueixen els rizobacteris no patogènics (vegeu apartat 1.3.2), ja que les activitats enzimàtiques peroxidasa i  $\beta$ -1,3-glucanasa de les plantes cultivades en els composts no augmentaven per sobre de les obtingudes en substrats estàndards fins que la planta era atacada pel patogen (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1996).

Recentment, s'ha proposat que l'efecte fertilitzant dels composts influeix en la severitat de les malalties (Krause et al., 2003; De Ceuster i Hoitink, 1999). Per exemple, el Fe afecta la inducció de resistència sistèmica per part de rizobacteris (Press et al., 2001). Per altra banda és possible induir resistència sistèmica a les plantes per mitjà de l'aplicació de productes químics orgànics com l'àcid salicílic (*salicylic acid*, SA) (Kessmann et al., 1994) o inorgànics com el monofosfat potàssic (Reuveni et al., 2000).

### 1.2.2 Els agents de control biològic. El gènere *Trichoderma*

El control biològic, entès com la utilització d'éssers vius diferents de l'home capaços de reduir la quantitat d'un patògen o la malaltia que produeix (Cook i Baker, 1983), és ara una subdisciplina en la ciència de la fitopatologia. Malgrat que els seus inicis es remunten 70 anys enrera, no va ser fins els seixantes del segle XX que la teoria i la pràctica es van trobar a les actes d'un dels primers congressos sobre control biològic (Baker K.F. i Snyder W.C., 1965). Durant els darrers 20 anys la recerca en aquesta àrea ha augmentat de forma exponencial. Actualment es poden trobar diversos productes comercials formulats amb agents de control biològic ja siguin per ser aplicats al sòl o substrat de cultiu, al sistema de fertirrigació, a les llavors o a la part aèria de les plantes (Paulitz i Belanger, 2001). Com a exemple, agents de control biològic comercialitzats als EUA (nom del microorganisme seguit dels noms dels productes formulats):

#### Bacteris

- *Agrobacterium radiobacter*: **Galltrol, Nogall**
- *Bacillus* spp.: **BioYield, Companion, EcoGuard, HiStick N/T, Kodiak, Mepplus, Serenade, Sonata, Subtilex, YieldShield**
- *Burkholderia cepacia*: **Deny, Intercept**
- *Pseudomonas* spp.: **AtEze, Bio-save, BlightBan, Frostban, Spot-Less**
- *Streptomyces* spp.: **Actinovate, Mycostop**

#### Fongs

- *Ampelomyces quisqualis*: **AQ10**
- *Aspergillus flavus*: **AF36, afla-guard**
- *Candida oleophila*: **Aspire**
- *Coniothyrium minitans*: **Contans, Intercept WG**
- *Gliocladium* spp.: **Primastorp, SoilGard**
- *Myrothecium verrucaria* (mort): **DiTera**

- *Paecilomyces lilacinus*: **MeloCon WG**
- *Trichoderma* spp.: **BinabT, RootShield/PlantShield, T-22G, T-22 Planter Box, Trichodex**

D'altra banda, a la Unió Europea, d'acord amb les directrius 91/414/CE i 2001/36/CE i les posteriors esmenes, actualment només es poden comercialitzar com a productes protectors de plantes els productes formulats amb els següents microorganismes:

*Ampelomyces quisqualis* soca AQ10

*Bacillus subtilis* soca QST 713

*Coniothyrium minitans*

*Gliocladium catenulatum* soca J1446

*Paecilomyces fumosoroseus* Apopka soca 97

*Pseudomonas chlororaphis* soca MA342

*Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*

Els agents de control biològic (*biological control agent*, BCA) tenen avantatges sobre els fungicides sintètics, com el fet de tenir menys efectes col·laterals sobre els éssers vius i el medi ambient, ser eficients contra patògens resistents a fungicides i tenir menor probabilitat de generar resistències; a més a més es poden emprar en agricultura ecològica on l'ús de fungicides sintètics està restringit (Brimner i Boland, 2003).

Els principals factors que determinen el futur del control biològic són: la recerca, les iniciatives polítiques, l'escalament de l'agricultura ecològica, l'interès de les companyies en el màrqueting del biocontrol i l'opinió pública (Migheli, 2001; Eilenberg et al., 2000).

*Trichoderma* no tan sols és el gènere de fongs més utilitzat com a BCA contra fongs fitopatògens (Benitez et al., 2004), sinó que és el segon més emprat per la indústria després de *Penicillium* (Harman i Kubicek, 1998). *Trichoderma* és un gènere de fongs que es reproduïxen asexualment i que amb més freqüència s'aïllen del sòl; pràcticament tots els sòls temperats i tropicals en contenen entre 10 i 1000 unitats formadores de colònies per gram (Harman et al., 2004a). Les soques més emprades com a BCA són de *T. virens*, *T. viride*, *T. asperellum* i *T. harzianum*. Recentment, com a conseqüència d'una revisió del gènere basada en mètodes de



biologia molecular, alguns *Trichoderma* s'han reclassificat en espècies diferents (Kullnig et al., 2001); més de 100 espècies de *Trichoderma* es poden classificar per tècniques moleculars (Druzhinina et al., 2006). L'aplicació de *Trichoderma* com a BCA al substrat de cultiu redueix significativament la incidència i el grau de diverses malalties, com *Fusarium oxysporum* (Marois et al., 1981), *Phytophthora ultimum* (Roberts et al., 2005), *Phytophthora capsici* (Khan et al., 2004), *R. solani* (Nelson et al., 1983) i *B. cinerea* (De Meyer et al., 1998), entre d'altres. En concret, la soca T34 de *T. asperellum*, aïllada d'un compost de restes de poda i brossa procedent de recollida selectiva (Trillas i Cotxarrera, 2003), redueix la fusariosis produïda per *F. oxysporum* (Cotxarrera et al., 2002) i la rizoctoniosi produïda per *R. solani* (Trillas et al., 2006). Els conidiòfors dels fongs de l'espècie *T. asperellum* tenen un aspecte simètric amb les branques principals, que sorgeixen del tronc majoritàriament per parelles, formant un angle recte. Aquestes branques són cada vegada més llargues com més distants són de l'extrem del conidiòfor. Això li confereix un aspecte de piràmide o arbre de Nadal (Figura 2). Els conidis són globoides o ovoides de color verd fosc i finament ornamentats (Samuels et al., 1999).



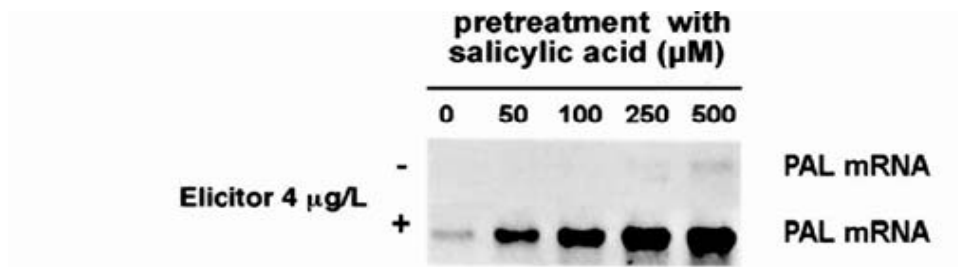
**Figura 2.** Imatge dels conidiòfors i conidis de *Trichoderma asperellum* soca T34 per microscòpia òptica.

Els BCA són éssers vius l'activitat dels quals depèn de les condicions fisicoquímiques de l'entorn; per això, a vegades, el control biològic pot ser impredecible. Els mecanismes pels

quals *Trichoderma* spp. controla les malalties vegetals són complexos, varien d'una soca a l'altra i són el resultat final de diversos mecanismes actuant sinèrgicament (Howell, 2003). Aquest control biològic és el resultat de la competició pels nutrients i l'espai, i de l'habilitat del BCA *Trichoderma* de produir metabolits que impedeixen la germinació de les espores (fungistasi), maten les cèl·lules (antibiosi) o modifiquen la rizosfera de tal manera que els patògens no hi poden viure. També es basa en la interacció directa entre el patògen i el BCA com en el cas del micoparasitisme, que inclou la síntesi d'enzims hidrolítics a més dels compostos tòxics i antibiòtics. Finalment, els BCA *Trichoderma* poden afectar positivament el creixement de les plantes (biofertilització) i estimular els mecanismes de defensa de la planta (Benitez et al., 2004). Tanmateix, el coneixement que es té dels mecanismes implicats en la inducció de resistència sistèmica per part dels fongs del gènere *Trichoderma* és poc més que incipient.

### **1.3 La inducció de resistència a les plantes**

En les darreres dècades hi ha hagut l'evidència creixent que les plantes es poden "condicionar" perquè activin les defenses cel·lulars de forma més eficient. Aquest fenomen és el que en anglès s'anomena *priming*. La potenciació de la defensa de les plantes degut al *priming* s'ha associat a l'augment de resistència contra diversos estressos biòtics i abiòtics. Per exemple, les plantes de cogombre que havien estat atacades pel fong *Colletotrichum lagenarium* combatien els atacs secundaris amb ràpides deposicions de cal·losa als llocs on el fong provava d'entrar (Kuc, 1982). La resposta hipersensible també s'ha demostrat que és induïda amb una major eficàcia en plantes que han estat atacades prèviament (Kuc, 1995; Ross, 1961). Un dels primers casos en què es va estudiar el *priming* fou en un estudi en cultius cel·lulars de julivert amb un elicitor provinent de la paret cel·lular de *Phytophthora sojae*. En aquest experiment, quan s'aplicaven concentracions baixes de l'elicitor o d'SA al cultiu, no s'observaven canvis en l'expressió del gen de la fenilalanina amoni liasa. Per contra si primer es tractava amb SA i després amb l'elicitor, l'mRNA de la fenilalanina amoni liasa s'acumulava a nivells alts (Thulke i Conrath, 1998; Kauss et al., 1992) (Figura 3).



**Figura 3.** El pretractament amb SA va potenciar l'expressió de la fenilalanina amoni liasa (PAL) que es produïa en una suspensió de cèl·lules de julivert en resposta a un elicitor provinent de la paret cel·lular de *Phytophthora sojae* (Thulke i Conrath, 1998).

### 1.3.1 El *priming* i la resistència sistèmica adquirida

La resistència sistèmica adquirida (*systemic acquired resistance*, SAR) és un estat de defensa de la planta que és induït per una infecció local de patògens necròtrofs i que confereix resistència contra un ampli espectre d'atacants (Sticher et al., 1997; Ryals et al., 1996). La inducció de SAR requereix l'acumulació de la molècula endògena de senyalització SA (Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990), que és la mitjancera de l'activació d'un gran ventall de gens relacionats amb la patogènesi (*pathogenesis related*, PR) (Durrant i Dong, 2004; Ward et al., 1991). En *Arabidopsis thaliana*, la inducció de SAR degut a la infecció amb una soca de *Pseudomonas syringae* avirulenta s'associa a l'activació directa de gens PR, però alhora produeix *priming* en teixits sistèmics, de manera que posteriors atacs de patògens activen l'expressió dels gens PR per sobre dels nivells de les plantes no induïdes. La potenciació de la resposta induïda només es fa aparent després del consegüent atac del patògen (Kohler et al., 2002; van Wees et al., 1999; Cameron et al., 1999), i per això sovint ha passat desapercibuda en els estudis de SAR. Aquests estudis suggereixen un rol dual per l'SA en la senyalització de la SAR; d'una banda, pot activar de forma directa l'expressió de gens PR i de l'altra, en nivells baixos que no activen directament els gens, pot induir *priming* per potenciar l'expressió dels gens PR després d'un posterior atac de patògens.

### 1.3.2 El *priming* en les interaccions beneficioses de microorganismes amb les plantes

Les interaccions beneficioses entre plantes i microorganismes són freqüents a la natura i tant poden millorar la nutrició de la planta com ajudar-la a superar estressos biòtics i abiòtics. En

diversos casos, la interacció planta-microorganisme potencia la capacitat de la planta de defensar-se contra un gran ventall de patògens (Pozo et al., 2004). Per exemple, la colonització de les rels de tomaquera per part del fong micorízic *Glomus mossae* protegeix de forma sistèmica la planta contra l'atac de *Phytophthora parasitica* (Cordier et al., 1998). De manera similar, certes soques no patogèniques de rizobacteris promotors del creixement (*plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR) poden reduir la malaltia a les parts aèries de la planta a través de la inducció d'un estat defensiu anomenat resistència sistèmica induïda (*induced systemic resistance*, ISR) (Van Loon et al., 1998). En general, la resposta de resistència sistèmica induïda per microorganismes beneficiosos no s'associa a canvis remarcables en l'expressió de gens de defensa (Pieterse et al., 2002), probablement perquè això conduiria a una forta inversió de recursos i reduiria l'eficàcia biològica de la planta (van Hulten et al., 2006; Heil, 2002).

Un tret característic de la ISR és el *priming*. Per exemple, la colonització de les rels de tomaquera amb fongs micorízics no condueix a l'acumulació de proteïnes PR fins que es produeix l'atac del patogen i és aleshores quan s'acumula la proteïna PR-1a i la planta és protegida de forma sistèmica contra l'atac de *P. parasitica* (Cordier et al., 1998). De manera similar alguns fongs que promouen el creixement de les plantes també produeixen *priming*, com en el cas de les plantes de cogombre inoculades amb la soca T203 de *T. asperellum* que després de l'atac del patogen foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* mostraven una expressió potenciada de gens PR (Shoresh et al., 2005). Fins fa poc es desconeixia la natura de la interacció de *Trichoderma* amb les plantes. La major part de la informació que es té sobre la via de senyalització que està implicada en la inducció de resistència per part de *Trichoderma* ve l'estudi de la soca T203 de *T. asperellum*. Aquest fong va ser capaç d'induir resistència contra el patogen foliar *P. syringae* pv. *lachrymans* en cogombre. En aquests cas es va demostrar que l'SA no augmentava en la planta quan el fong s'aplicava a  $10^5$  conidis ml<sup>-1</sup>, mentre que l'àcid jasmònic (*jasmonic acid*, JA) i l'etilè (*ethylene*, ET) hi devien estar implicats, ja que en inhibir la seva síntesi l'efecte protector del fong desapareixia. A més a més no es van observar canvis en la concentració d'ET. Tanmateix, en contrast amb la típica ISR, les activitats peroxidasa i quitinasa, així com l'expressió d'aquests gens, van augmentar de forma transitòria

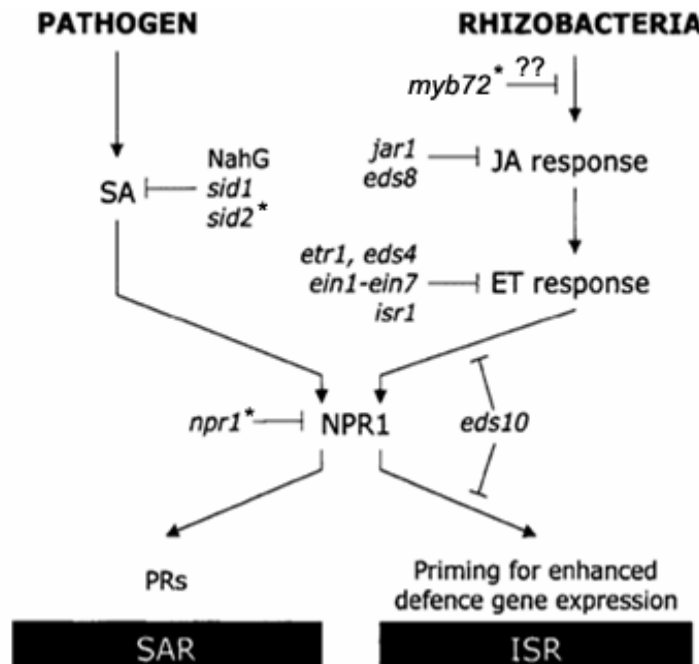
localment i sistèmica (i la  $\beta$ -1,3-glucanasa només localment) després d'inocular la planta amb T203 en absència de patògens (Shoresh et al., 2005; Yedidia et al., 2000; Yedidia et al., 1999). El *priming* s'ha estudiat sobretot en les interaccions entre plantes i PGPR inductors d'ISR. Per exemple, en aràbidopsis, la ISR desencadenada per la soca WCS417r de *P. fluorescens* (un PGPR) és efectiva contra diferents tipus de patògens, però no va associada a l'activació de gens PR (Pieterse et al., 1996). Estudis amb mutants van demostrar que la ISR induïda per WCS417r requereix que la capacitat de resposta al JA i a l'ET estigui intacta (Pieterse et al., 1998). L'anàlisi del transcriptoma d'aràbidopsis va revelar que, de forma local a les rels, la ISR induïda per WCS417r produïa canvis substancials en l'expressió d'uns 100 gens (Verhagen et al., 2004). Tot i així, de manera sistèmica a les fulles, no es va observar cap alteració consistent de l'expressió gènica. A més a més, no es van observar alteracions en la producció de JA o d'ET, suggerint que l'estat de resistència induïda es basa en una major sensibilitat a aquestes hormones, més que en un augment de la seva producció (Pieterse et al., 2000). L'estudi del transcriptoma de fulles d'aràbidopsis que mostraven ISR induïda per WCS417r contra *P. syringae* pv. *tomato* va revelar que l'expressió de 81 gens era potenciada en comparació amb les plantes no induïdes; la majoria d'aquests gens són regulats per JA i/o ET (Verhagen et al., 2004).

### 1.3.3 Els mecanismes del *priming*

Els mecanismes moleculars subjacents al *priming* no es comprenen del tot. Una hipòtesi és que l'estat "activat" de la planta es basa en l'acumulació o la modificació post-traduccionals d'una o més proteïnes senyalitzadores, que després de ser expressades o modificades romanen inactives fins que una posterior percepció d'estrès desencadena "la hiperactivació" de la proteïna senyalitzadora, cosa que desencadenaria una transducció potenciada del senyal. Una altra hipòtesi és que el *priming* actua per mitjà de l'acumul de factors de transcripció crucials. Un cop reconegut l'estrès, la planta induïda podria activar l'expressió del gens adients sense haver de fer el pas previ de sintetitzar els factor de transcripció (Conrath et al., 2006).

### 1.3.4 L'ús de mutants en la dissecció de les vies de senyalització

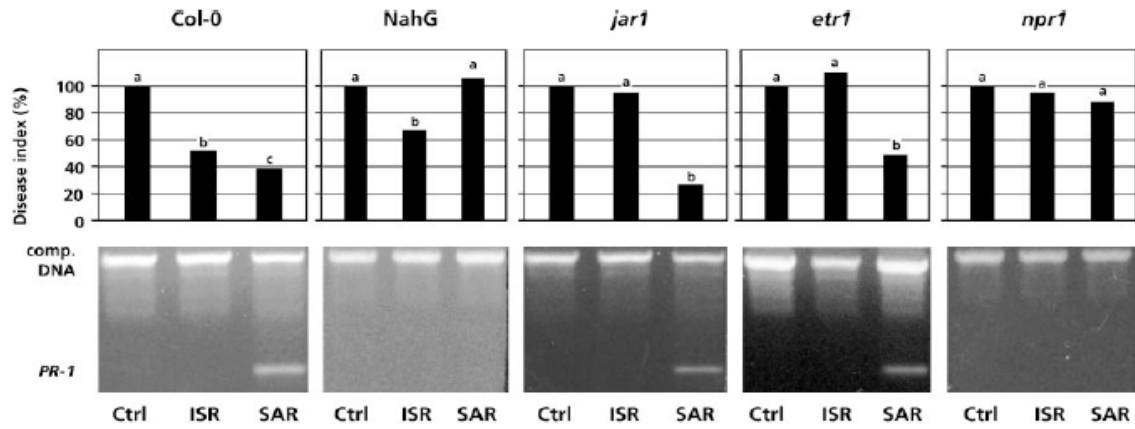
Al llarg dels anys, en *arabidopsis*, s'han caracteritzat diversos mutants afectats en la seva resposta a les molècules senyalitzadores JA, ET i SA i/o amb un fenotip de *priming* alterat (Figura 4). Les plantes mutants *npr1* (*non-expressor of PR-genes 1*), que tenen mutat el gen *NPR1*, són incapaces de d'expressar gens *PR* o SAR quan són tractades amb patògens avirulents, malgrat que són capaces d'acumular SA com les plantes salvatges (Delaney et al., 1995; Cao et al., 1994). Les plantes transgèniques NahG són incapaces d'acumular SA degut a que expressen el gen bacterià nahG de la salicilat hidroxilasa (Delaney et al., 1994). Els mutants *sid1* i *sid2* (*SA induction deficient 1* i *2*) estan impeditos en la síntesi d'SA induïda per patògens (Wildermuth et al., 2001). Els mutants *jar1* (*affected JA response 1*) tenen afectada la resposta al JA. Les plantes *etr1* (*ET receptor mutant 1*) són insensibles a l'ET (Pieterse et al., 1998) així com també ho són els mutants *ein1-7* (*ET insensitive*) (Knoester et al., 1999). Els mutants *eds4*, *eds8* i *eds10* (*enhanced disease susceptibility 4, 8* i *10*) tenen una elevada susceptibilitat a l'atac de *P. syringae* (Ton et al., 2002). Els mutants *isr1* (*non ISR expressor 1*) són incapaces d'expressar ISR (Ton et al., 2001). A més a més, els mutants *eds8* i *eds4* tenen la resposta a JA i ET afectades, respectivament. La colonització de les rels per part de WCS417r condueix a l'activació local de diversos gens, entre ells el *MYB72* (Verhagen et al., 2004). Els factors de transcripció MYB estan implicats en la regulació de processos específics de les plantes, malgrat que la funció de la major part d'ells és encara desconeguda (Stracke et al., 2001). Les plantes mutants *myb72* no eren capaces d'expressar ISR induïda per PGPR contra *P. syringae* p.v. *tomato* a les fulles tot i que si podien expressar SAR, indicant que el *MYB72* és un regulador important de la ISR (Verhagen, 2004). En conjunt, ha estat l'experimentació amb aquests i d'altres mutants que ha permès establir les vies de transducció de senyals de la SAR i la ISR descrites en les seccions 1.3.1 i 1.3.2 (Figura 4).



**Figura 4.** Model esquemàtic que mostra la via de transducció de senyals de la ISR induïda per rizobacteris i de la SAR induïda per patògens en aràbidopsis, adaptat de Pieterse *et al.* (2002). Els asteriscs indiquen els mutants que s'han utilitzat en aquesta tesi.

El grup dirigit pels doctors Pieterse i van Loon de la Universitat d'Utrecht als Països Baixos ha liderat durant anys la recerca en el camp de les vies de senyalització de la ISR. A la Figura 5 es mostren els resultats obtinguts en un experiment modèlic realitzat per investigadors de l'esmentat grup (Pieterse *et al.*, 1998). Per analitzar la via de senyalització que controla la ISR induïda per PGPR es va estudiar si els mutants *jar1*, *etr1* i *npr1*, així com les plantes transgèniques NahG, eren capaços de mostrar ISR quan les seves rels eren colonitzades per rizobacteris. Les plantes NahG no poden desenvolupar SAR i no mostren activació dels gens PR quan són atacades per patògens, cosa que indica que l'SA és un intermediari necessari en la via de senyalització de la SAR (Delaney *et al.*, 1994). Per contra, la ISR induïda per PGPR no s'associa a l'activació de gens PR (Pieterse *et al.*, 1996). A més a més, les plantes NahG que són incapaces d'expressar SAR poden desenvolupar nivells normals d'ISR després del tractament de les rels amb PGPR inductores d'ISR (van Wees *et al.*, 1997). Això demostra que la resistència biològicament induïda és controlada per dues vies amb diferents requeriments pel que fa a l'acumulació d'SA. Emprant aquests mutants es va veure que la ISR induïda pel rizobacteri *P. fluorescens* WCS417r contra *P. syringae* pv. *tomato* en aràbidopsis, seguia una

via de senyalització que era dependent de la capacitat de respondre al JA i a l'ET, i que de forma similar a la SAR, la proteïna NPR1 hi jugava un paper clau (Pieterse et al., 1998).



**Figura 5.** Quantificació de la ISR (induïda per la soca WCS417r de *Pseudomonas fluorescens*) i de la SAR (induïda per una soca avirulenta de *P. syringae* p.v. *tomato*) contra l'atac de *P. syringae* p.v. *tomato* en plantes d'arabidopsis Col-0, NahG, *jar1*, *etr1*, i *npr1* i anàlisi de l'expressió del gen *PR-1* (Pieterse et al., 1998).



## **2. OBJECTIUS**



## 2. OBJECTIUS

### Objectiu general

Estudiar la inducció de resistència sistèmica a les plantes per l'agent de control biològic *Trichoderma asperellum* soca T34 o per substrats formulats a base de compost i els mecanismes pels quals es produeix. Aquest objectiu global es desglossa en objectius específics.

### Objectius específics

1. Avaluar la capacitat de cinc composts provinents de residus municipals i agrícoles i dues torbes comercials de suprimir la malaltia provocada per *Botrytis cinerea* en plantes de cogombre i a la vegada correlacionar aquest fenomen amb l'estat nutricional de la planta i l'activitat microbiològica i conductivitat elèctrica dels substrats de cultiu.
2. Desenvolupar un mètode ràpid i sensible per determinar simultàniament els nivells d'àcid salicílic i àcid jasmònic en plantes. Validar el mètode amb plantes infectades pel patògen edàfic *Rhizoctonia solani* o inoculades amb l'agent de control biològic *T. asperellum* soca T34.
3. Estudiar els canvis produïts en l'activitat peroxidasa, els nivells de les hormones àcid salicílic i àcid jasmònic i el proteoma dels cotilèdons de plantes de cogombre amb les arrels inoculades amb diferents concentracions de l'agent de control biològic *T. asperellum* soca T34 en les primeres hores de la interacció (entre les 0 i les 48 hores).
4. Estudiar l'habilitat de l'agent de control biològic *T. asperellum* soca T34 aplicat a alta concentració ( $10^7$  conidis  $\text{ml}^{-1}$ ) a les arrels d'induir resistència sistèmica contra el patògen foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en planta de cogombre.

## 2. Objectius

---

5. Estudiar l'habilitat de l'agent de control biològic *T. asperellum* soca T34 aplicat a baixa concentració ( $10^5$  conidis  $\text{ml}^{-1}$ ) a les arrels d'induir resistència sistèmica contra els patògens foliars *P. syringae* pv. *tomato*, *Plectosphaerella cucumerina* i *Hyaloperonospora parasitica* en la planta model *Arabidopsis thaliana*.

6. Establir la natura de la via de senyalització implicada en la resistència sistèmica induïda per *T. asperellum* soca T34 en comparació amb la ISR típica dels rizobacteris, emprant diversos mutants d'*Arabidopsis*.

## **3. RESULTATS**



## **3.1 CAPÍTOL 1**

**Efectes supressius dels composts emprats com  
a substrats de cultiu contra *Botrytis cinerea*  
en plantes de cogombre**





## **Efectes supressius dels composts emprats com a substrats de cultiu contra *Botrytis cinerea* en plantes de cogombre**

Segarra G, Casanova E, Borrero C, Aviles M and Trillas I (2007) The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology* 117: 393-402.

<http://www.springerlink.com/content/w1354x3217hxm482/fulltext.pdf>

### **Resum**

La incidència i grau de les malalties d'origen edàfic que afecten els conreus sovint es redueix quan s'utilitzen composts com a substrats. Tanmateix, hi ha poca informació pel que fa als efectes dels composts en el desenvolupament de les malalties foliars. L'objectiu d'aquest estudi fou avaluar la capacitat supressiva de cinc composts (procedents de residus de la indústria de les begudes alcohòliques, de l'oli i del suro, així com de residus del cultiu de xampinyó i de brossa orgànica de recollida selectiva amb restes de poda urbanes) emprats com a substrats de cultiu contra la malaltia produïda per *Botrytis cinerea* en plantes de cogombre. La capacitat supressiva dels substrats es va estudiar comparant la incidència i grau de la malaltia de les plantes crescudes en els composts amb la de les plantes crescudes en torbes comercials, que són conductores a la majoria de les malalties d'origen edàfic. També es van realitzar correlacions entre la incidència de la malaltia i l'estat nutricional de la fulla, així com amb la conductivitat elèctrica i l'activitat microbiològica (mesurada com a activitat  $\beta$ -glucosidasa) dels substrats de cultiu. La incidència de la malaltia en les plantes cultivades en les torbes fou d'entre el 90 i el 100%, mentre que en les cultivades en composts procedents de residus de la indústria del suro, de l'oli i de residus del cultiu de xampinyó va ser d'entre l'11 i el 34% i en les crescudes en composts procedents de brossa orgànica de recollida selectiva amb restes de poda urbanes i residus de la indústria de les begudes alcohòliques va ser d'entre el 31 i el 72%. A més a més, els cogombres cultivats en les torbes van mostrar un major grau de la malaltia durant el bioassaig que aquelles que foren cultivades en qualsevol dels composts. El contingut de Mo, Ca i Si a les fulles es correlacionà negativament amb el grau de malaltia. També es van trobar correlacions negatives de la conductivitat elèctrica i l'activitat microbiològica amb el grau de malaltia. La notable reducció de la malaltia produïda per *B. cinerea* en plantes de cogombre cultivades en els composts es va relacionar amb el subministre d'elements químics específics,

amb cert grau d'estrès salí (entre 0.79 i 3.60 mS cm<sup>-1</sup>) i amb l'alta activitat microbiològica dels composts (entre 81.73 i 261.8 µg de p-nitrofenol hidrolitzat cm<sup>-3</sup> de substrat).

## **3.2 Capítol 2**

**Quantificació simultània d'àcid salicílic i àcid  
jasmònic per mitjà d'LC-ESI-MS/MS en  
extractes crus de *Cucumis sativus*  
sotmès a estrès biòtic**



**Quantificació simultània d'àcid salicílic i àcid jasmònic per mitjà d'LC-ESI-MS/MS en extractes crus de *Cucumis sativus* sotmès a estrès biòtic**

Segarra G, Jáuregui O, Casanova E and Trillas I (2006) Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress. *Phytochemistry* 67: 395-401.

**Resum**

L'àcid salicílic i l'àcid jasmònic són hormones vegetals involucrades en la resistència basal i induïda contra fitopatògens. L'objectiu d'aquest estudi és desenvolupar un mètode ràpid i sensible per determinar simultàniament els nivells d'ambdues hormones. El present article proposa un mètode que inclou l'extracció de les hormones amb metanol-aigua-àcid acètic (90:9:1, v/v), l'evaporació dels extractes, i la injecció en un sistema basat en la cromatografia líquida, la ionització per electroesprai i la detecció amb tàndem de masses (*liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry*, LC-ESI-MS/MS) en la modalitat de monitorització de múltiples reaccions (*multiple reaction monitoring*, MRM). Els nivells endògens d'àcid salicílic i àcid jasmònic en els cotilèdons dels cogombres control van ser 30.96 i 0.73 ng g<sup>-1</sup> pes fresc, respectivament. A les rels, els nivells foren 8.31 i 15.82 ng g<sup>-1</sup> pes fresc, respectivament. A les plantes tractades amb l'agent de control biològic *Trichoderma asperellum* T34 aplicat a una concentració de 10<sup>5</sup> ufc ml<sup>-1</sup>, els nivells d'àcid salicílic i àcid jasmònic no foren diferents dels controls. Les plantes de cogombre malaltes per *Rhizoctonia solani* mostraren nivells més elevats d'àcid salicílic i àcid jasmònic en comparació amb els controls no infectats (fins a 2 i 13 vegades més elevats, respectivament). Els límits de detecció d'àcid salicílic i àcid jasmònic foren 0.45 i 0.47 ng g<sup>-1</sup> pes fresc, respectivament. Els resultats de la nostra recerca inclouen el desenvolupament d'un mètode que és a la vegada ràpid i altament sensible per quantificar de manera simultània l'àcid salicílic i l'àcid jasmònic d'extractes crus de plantes de cogombre, evitant qualsevol pas de purificació o derivatització.



# Simultaneous quantitative LC–ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of *Cucumis sativus* under biotic stress

Guillem Segarra<sup>a,\*</sup>, Olga Jáuregui<sup>b</sup>, Eva Casanova<sup>a</sup>, Isabel Trillas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain*

<sup>b</sup> *Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona, Josep Samitier, 1-5, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain*

Received 4 October 2005; received in revised form 14 November 2005

Available online 5 January 2006

## Abstract

Salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) are plant hormones involved in basal resistance against plant pathogens and also in induced resistance. The aim of this study is to develop a fast and sensitive method to determine simultaneously the levels of both these hormones. The present paper proposes a method that includes hormone extraction with MeOH–H<sub>2</sub>O–HOAc (90:9:1, v/v), evaporation of the extracts, and injection into the liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS) system in multiple reaction monitoring (MRM). Endogenous SA and JA levels in noninfested control cucumber cotyledons were 30.96 and 0.73 ng g<sup>-1</sup> fresh weight, respectively. In roots, the levels were 8.31 and 15.82 ng g<sup>-1</sup> FW, respectively. In plants treated with the biological control agent *Trichoderma asperellum* strain T-34, the levels of SA and JA did not differ from control plants. *Rhizoctonia solani*-diseased cucumber plants showed higher levels of SA and JA compared to noninfested controls (up to 2 and 13-fold higher, respectively). Detection limits for SA and JA were 0.45 and 0.47 ng g<sup>-1</sup> fresh weight, respectively. The results of our research include the development of a method that is both fast and highly sensitive in the simultaneous quantitation of SA and JA from crude cucumber plant extracts, avoiding any purification and derivatization steps.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Cucumis sativus*; Cucumber; Jasmonic acid; Salicylic acid; LC–ESI-MS/MS; Plant defense; Quantitation; *Rhizoctonia solani*; *Trichoderma* spp.

## 1. Introduction

Plants have evolved a number of inducible defense mechanisms to respond to both biotic and abiotic stress. Local or systemic resistance is triggered in the majority of plants by pathogen attack, lesions produced by insect feeding, and other kinds of physical damage, as well as certain chemical treatment and the presence of some biological control agents such as nonpathogenic rhizobacteria (Harman et al., 2004). Systemic acquired resistance (SAR) produced by pathogen attack is based on salicylic acid (SA) signaling and leads to pathogenesis-related proteins (PR) and phytoalexin synthesis, which may confer

protection against later attacks (Sticher et al., 1997). A similar response is produced when the plant is attacked by a necrotrophic pathogen and/or after insect wounding. In this case, molecular signaling is based on jasmonic acid (JA) and ethylene (Pieterse and Van Loon, 1999). Another kind of JA-dependent response is the so-called induced systemic resistance (ISR), which is produced when the roots are colonized by certain nonpathogenic rhizobacteria. In this latter case, PR and phytoalexins do not accumulate until later pathogen attack, when the plant response is magnified (Van Loon et al., 1998; Pozo et al., 2004). While many SA and JA responses show mutual antagonism, some genes are induced by both compounds, revealing complexities in the network of defense pathways (Delaney, 2004). Thus, the plant hormones JA and SA are major regulators of plant response to pathogen attack. However, there is

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 4021463; fax: +34 93 4112842.

E-mail address: [gsegarra@ub.edu](mailto:gsegarra@ub.edu) (G. Segarra).

little information about the effect of fungal biological control agents such as *Trichoderma* spp. on these plant hormones (Shoresh et al., 2005). A sensitive and reliable method to quantitate simultaneously such hormones in plant extracts would thus be of special interest for a better understanding of plant defense mechanisms.

Under physiological conditions the plant regulators SA and JA, like all plant hormones, are present at very low concentrations against a background of a wide range of more abundant primary and secondary metabolites. Therefore, analytical methods to quantitate these hormones simultaneously must be extremely selective and sensitive (Chiwocha et al., 2003). Different types of methods have been described to estimate SA and JA in plants. Liquid chromatography (LC), with fluorescence detection has been used successfully for the quantitation of both SA (Meuwly and Metraux, 1993) and JA (Anderson, 1985), but these procedures include complex purification steps in order to separate the desired compounds from a high number of other interfering molecules present in the plant sample as well as a derivatization step (in the case of JA). Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) has also been applied for the quantitation of SA (Scott and Yamamoto, 1994) and JA (Mueller and Brodschelm, 1994) after derivatization of these molecules. Even though the GC/MS quantitation step shows a high sensitivity for these compounds, these methods rely on elaborate purification and concentration steps. Usually, ion-exchange columns or hydrophobic columns are used to purify partially and to clean the plant samples (Mueller and Brodschelm, 1994; Scott and Yamamoto, 1994; Muller et al., 2002). These time-consuming steps severely limit the number of samples that can be processed in a day. A new GC/MS method for the simultaneous quantitation of SA and JA based on the collection of derivatized and volatilized compounds on polymeric adsorbent (Super Q) as the only purification step has been described (Engelberth et al., 2003) but still relies on both purification and derivatization steps. LC coupled to mass spectrometry (LC/MS) is better suited for the analysis of nonvolatile polar compounds in their natural form (Glassbrook and Ryals, 2001). The selectivity and sensitivity of this method relies on the application of multiple reaction monitoring (MRM), in which each ionized compound gives a distinct precursor-to-product ion transition that is diagnostic for the presence of that particular compound in an extract. Also, the need for complete resolution of compounds prior to analysis is bypassed because peaks containing co-eluting compounds can be resolved by monitoring for specific precursor-to-product ion transitions (Chiwocha et al., 2003). LC-MS has been applied for the quantitation of JA in plant samples (Tamogami and Kodama, 1998) but to our knowledge only one paper describes simultaneous quantitation of both SA and JA by using this technique (Wilbert et al., 1998).

The aim of this study was to develop a method to determine simultaneously SA and JA levels in cucumber cotyle-

dons and roots in a way that would combine speed with the highest accuracy and with low limits of detection. In order to achieve these objectives an LC-MS/MS method is proposed which shows noticeable chromatographic ameliorations with respect to other existing methods. These procedures were tested to evaluate the effect of plant infestation with the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia solani* and the biological control agent *Trichoderma asperellum* strain T-34 on the endogenous plant SA and JA levels.

## 2. Results

### 2.1. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)

Basic pH conditions as described by Wilbert et al. (1998) gave a poor peak shape for both compounds and SA eluted showing peak tailing. The 5 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  pH 5/MeCN gradient method produced well-shaped peaks for SA at 2.7 min with good sensitivity. Nevertheless, JA at 7 min presented a high decrease in sensitivity in comparison with the other LC conditions. Finally, acid pH conditions (0.05% HOAc in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  gradient) with a Discovery  $\text{C}_{18}$   $150 \times 2.1$  mm,  $5 \mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, USA) gave the best results in terms of sensitivity and peak shape. This column has the main advantage of low bleeding at the end of the MeCN gradient compared with the other columns. Retention times in these conditions were 4.0 min for SA and 6.6 min for JA. These conditions allowed the injection of a relatively high number of samples in a short time (up to 100 per day). Fig. 1 shows the overlaid trace chromatograms of cucumber extracts from control plants and *Rs*-inoculated plants for SA and JA.

The spectra generated for both compounds in negative ion detection gave the deprotonated molecule  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ( $m/z$  137 for SA and  $m/z$  209 for JA). The product ion scan spectrum of  $m/z$  137 gave the ion  $[\text{M} - \text{H} - \text{COO}]^-$  ( $m/z$  93) for SA. For JA, the product ion scan of  $m/z$  209 gave the  $[\text{M} - \text{H} - \text{COO}]^-$  ( $m/z$  165) and the  $m/z$  59. It should be noted that the MRM 209/59 transition gave a signal 10 times greater than the 209/165 at the described MS/MS conditions (CE-25). Quantitation of SA and JA in cucumber plantlets was done by injection of extracted and spiked samples in the LC-ESI(-)-MS/MS system in MRM mode (137/93 for SA and 209/59 for JA). Identification of SA and JA was done on the basis of retention time and presence of peak in the MRM trace compared with those of the standards. When possible, product ion scan experiments were done to confirm positively the presence of both acids in the samples. As can be seen in Fig. 2 an interference that almost coelutes with JA is present in the 209/165 MRM trace in the cucumber extracts and does not allow this trace to be used for quantification. Using these MRM conditions background noise was minimized and sensitivity was very high.



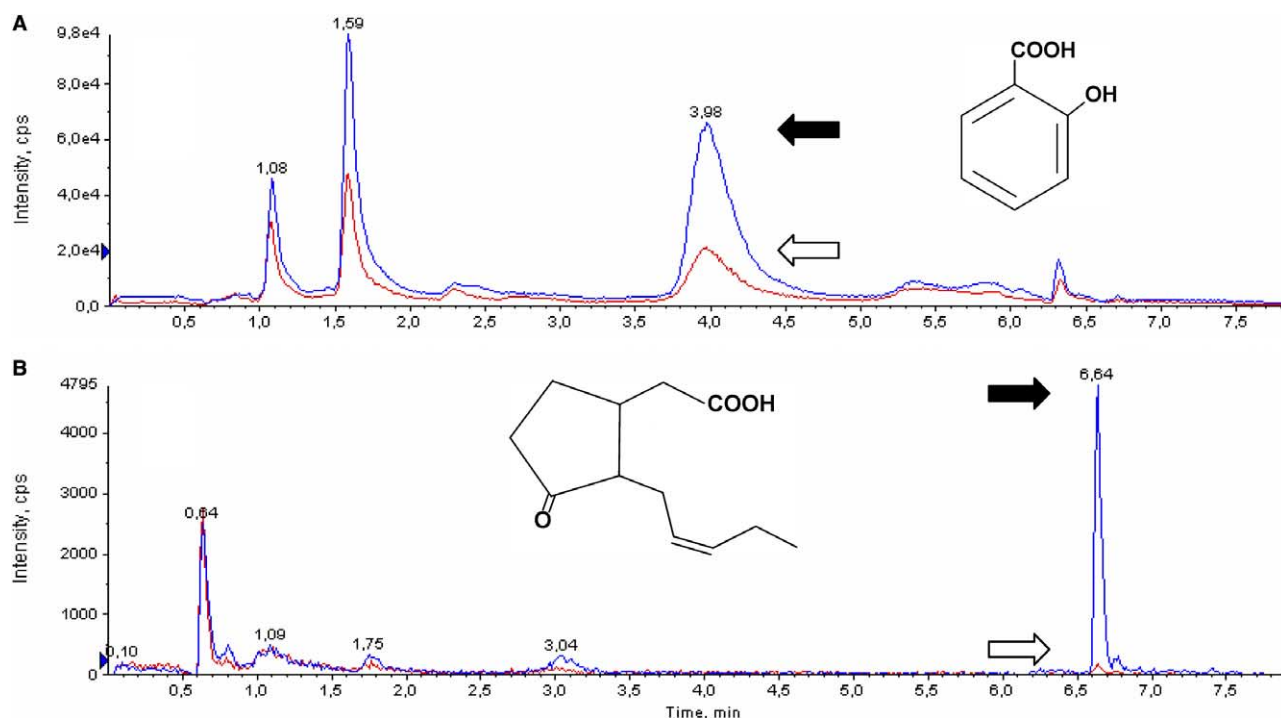


Fig. 1. Overlaid trace chromatograms in MRM mode of 137/93 for salicylic acid in cotyledon samples (A) and 209/59 for jasmonic acid in root samples (B). Empty arrows show the peak corresponding to the control sample. Filled arrows show the peak of the *Rhizoctonia solani*-inoculated sample.

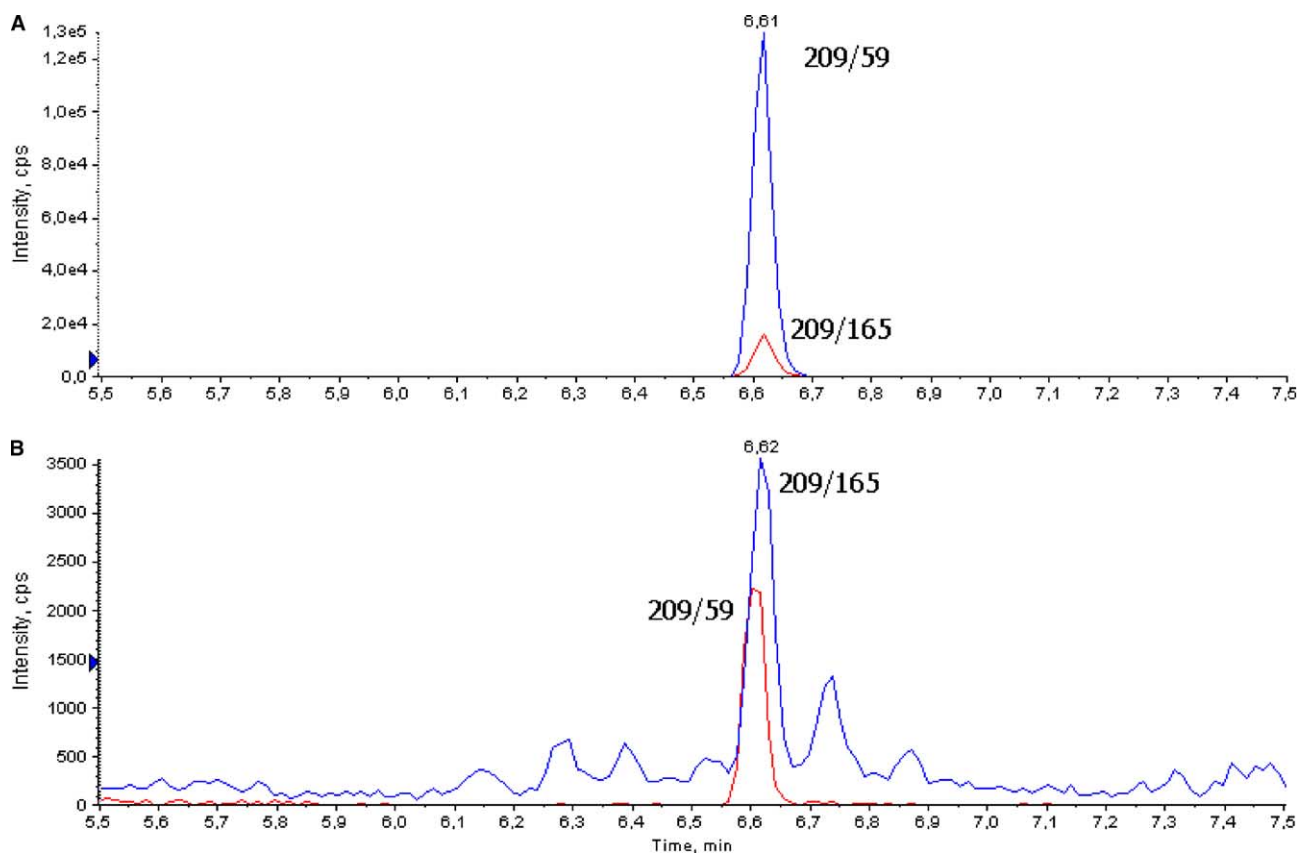


Fig. 2. Trace chromatograms in MRM mode of 209/59 overlaid onto those of 209/165 for a 1 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  jasmonic acid standard (A) and for a sample of cucumber extract (B).

## 2.2. Quality parameters of the LC–MS/MS method

In the optimum LC–MS/MS conditions described above, standards of SA and JA (200 and 4 ppb, respectively) were quantified ( $n = 10$ ) on three different days using a standard addition calibration curve (from 50 to 1000 and from 1 to 20 ppb, respectively). Good correlation coefficients ( $r \geq 0.999$ ) were obtained in the concentration range studied. The results for reproducibility were a relative standard deviation (RSD) of 1.5% and 3.5% for run-to-run precision, and 2% and 3.5% for day-to-day precision on SA and JA concentrations, respectively. The method also showed good precision with regard to retention time (0.4% and 0.1% for run-to-run and 0.7% and 0.1% in day-to-day for SA and JA, respectively). Detection limit (LOD) based on a signal-to-noise ratio of 3:1 was calculated through the standard addition curves, giving a value of 0.45 and 0.47 ng g<sup>-1</sup> of SA and JA, respectively, in fresh weight of plant.

## 2.3. Quantitation of SA and JA in cucumber cotyledons and roots

Incidence of *R. solani* disease at 7 days after seeding was 100% in *R. solani*-treated plants (Rs treatment) and 0% in plants from both control and *T. asperellum* isolate T-34

treatments. Disease severity was  $4.0 \pm 0.1$  (mean  $\pm$  s.e.) in Rs-infected plants.

Cotyledons from diseased cucumber plants (grown in Rs-inoculated substrate) showed significant higher levels of endogenous SA and JA (up to 2- and 13-fold higher, respectively) than healthy plants (those grown in T-34-inoculated or control substrates) 72 h after seeding (Fig. 3(A) and (C)). In the same way, roots from diseased cucumber plants showed significant higher levels of endogenous SA and JA (up to 2 and 2.5-fold higher, respectively) than healthy plants 72 h after seeding (Fig. 3(B) and (D)). It is noticeable that SA quantities in cotyledons of Rs-treated plants were approximately 4-fold higher than in roots, whereas JA quantities were 4-fold higher in roots than in cotyledons and up to 20-fold higher in roots in the case of healthy plants.

Extractions from lyophilized samples yielded half as many SA levels as those from fresh samples. JA yields were not affected by lyophilization (data not shown).

## 3. Discussion

In this paper we present a rapid, sensitive LC–MS/MS method for simultaneous quantitation of SA and JA, avoiding any purification and derivatization steps. The method shows good results in terms of detection limits, repeatability, and linearity. The method presents better LOD for SA than that obtained by Meuwly and Metraux (1993) in cucumber leaves of 4 ng g<sup>-1</sup> of fresh weight (10-fold more sensitive), and slightly better LOD for JA than that obtained by Rakwal et al. (2002) of 1 pg. Our method showed better chromatographic profiles than those obtained following the method described by Wilbert et al. (1998) which is the only other existing method for simultaneous quantitative LC–MS/MS analysis of JA and SA. Another advantage of the method we describe is its speed and simplicity, allowing the analysis of high numbers of samples.

The SA levels found in healthy cucumber cotyledons and roots in the present article are similar to those obtained in other studies in the same plant species (Molders et al., 1996; Shores et al., 2005). Moreover basal SA levels were higher in the cotyledons than in the roots, which is in accordance with other studies (Molders et al., 1996; Shores et al., 2005), while JA levels behaved in the opposite way.

Our results show that both SA and JA endogenous levels rise locally (roots) and systemically (cotyledons) in *R. solani*-diseased cucumber plants. The rise in SA after pathogen attack has also been described in some works since the first reports (Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990). Free cucumber SA levels rose both locally and systemically after Tobacco Necrosis Virus inoculation (Molders et al., 1996), while potato inoculation with *Phytophthora infestans* led only to local increases of free SA in the infection site (Coquoz et al., 1995). The local and

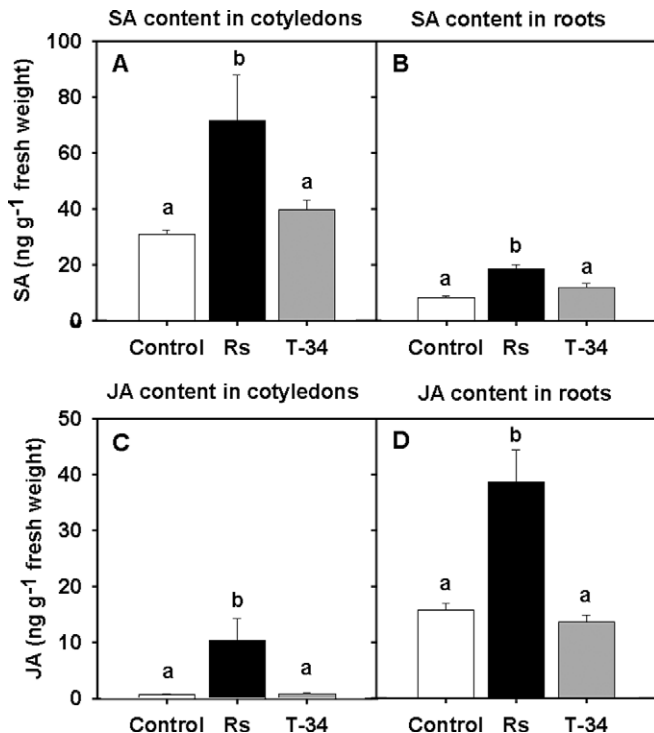


Fig. 3. Salicylic acid (SA) content in cotyledons (A) and roots (B), and jasmonic acid (JA) content in cotyledons (C) and roots (D) of cucumber plants 72 h after seeding. Treatments consisted in different growth media inoculation: Control, noninoculated; Rs, *Rhizoctonia solani*-inoculated; T-34, *Trichoderma asperellum* T-34-inoculated. Values represent the mean  $\pm$  s.e. ( $n = 5$ ). Different letters indicate statistically significant differences between treatments in a Duncan multiple range test ( $P < 0.05$ ).

systemic rise of free JA in *Arabidopsis* after *Alternaria brassicicola* inoculation has also been reported (Penninckx et al., 1996). The increases in SA and JA observed in the diseased cucumber plants in comparison to healthy plants are noticeable (from 2 to 13-fold), since a 59% increase in endogenous SA concentration is sufficient to induce the accumulation of PR protein in tobacco leaves (Yalpani et al., 1991).

The higher increases found for JA in cotyledons, in comparison to those obtained for SA, suggest a major implication of JA in this plant pathogen interaction. This is consistent with the general observation that necrotrophic pathogens' basal resistance is based on JA-related mechanisms (Thomma et al., 1998) while biotrophic or hemibiotrophic basal resistance is based on SA-related mechanisms (Delaney et al., 1994; Kachroo et al., 2000).

The fact that 72 h after seeding SA levels did not rise in T-34-inoculated cucumber plants agrees with the observation made on the same plant species between 0 and 96 h post inoculation with *T. asperellum* strain T203 (Shoresh et al., 2005). However, in the cited article the authors indirectly prove that JA may be playing a role in the induction of resistance by the T203, while in our work we could not observe, at the moment of the analyses, any increase of JA due to the application of T-34.

## 4. Experimental

### 4.1. Plant material

Fifteen cucumber seeds (*Cucumis sativus* L. 'Negrito') were placed in each of five 400 ml plastic pots containing peat from Klasmann (Palleter, Spain) amended with  $4 \text{ g l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$ . Growth media had been previously inoculated with  $2 \text{ g l}^{-1}$  of a *R. solani* AG-4 isolate soil inoculum (Rs treatment) prepared according to Ko and Hora (1971) or  $5 \times 10^5$  cfu  $\text{ml}^{-1}$  of T-34 isolate from *T. asperellum* (T-34 treatment) (Trillas and Cotxarrera, 2003). We also included a noninoculated treatment (control treatment). Pots were kept in a growth chamber at  $25 \pm 1$  °C under a 16 h photoperiod ( $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Plants were fertilized twice a day with 50 ml of the following solution:  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  Peter's foliar feed 27-15-12 from Scotts (Heerlen, The Netherlands) complemented with  $0.22 \text{ g l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  and  $0.25 \text{ g l}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### 4.2. Disease evaluation

Seven days after seeding, plants showing crown root damage or damping-off, which are typical symptoms produced by *R. solani*, were considered as diseased plants. Disease incidence was calculated as the percentage of diseased plants over the total number of plants from each pot. Disease severity was assessed using the following scale: 1, healthy plant; 2, light wounds; 3, severe wounds; 4, post emergency damping-off; 5, pre emergency damping-off.

### 4.3. Chemicals

Standards of salicylic acid >99% (Fluka, Buchs, Switzerland) and ( $\pm$ )-jasmonic acid >97% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared at a concentration of  $500 \text{ mg l}^{-1}$  in MeOH. The working SA and JA solutions of 1000 and  $20 \mu\text{g l}^{-1}$ , respectively, were made by diluting the standard solutions with the initial LC mobile phase (0.05% HOAc in  $\text{H}_2\text{O}$ –MeCN, 85:15, v/v). MeOH of HPLC grade was purchased from Panreac (Montcada i Reixac, Spain), MeCN of HPLC grade from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), HOAc from Merck (Darmstadt, Germany), and ultrapure  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q) was obtained from Millipore System (Bedford, USA).

### 4.4. Sample preparation

Seventy-two hours after seeding, the cucumber plantlets were washed under running tap water for 5 min and dried gently. Roots and cotyledons (excised from the shoots) from all the plantlets in each pot were pooled separately and quick-frozen in liquid  $\text{N}_2$ . Frozen samples were then ground under liquid  $\text{N}_2$  with mortar and pestle. An amount of 250 mg of the resulting powder was extracted with  $750 \mu\text{l}$  MeOH– $\text{H}_2\text{O}$ –HOAc (90:9:1, v/v/v) and centrifuged for 1 min at 10,000 rpm. The supernatant was collected and the extraction was repeated. Pooled supernatants were dried under  $\text{N}_2$ , resuspended in  $200 \mu\text{l}$  of 0.05% HOAc in  $\text{H}_2\text{O}$ –MeCN (85:15, v/v), and finally filtered with a Millex-HV  $0.45 \mu\text{m}$  filter from Millipore (Bedford, USA). Alternatively, frozen samples were lyophilized and ground with agate mortar and pestle; in this case only 45 mg of the resulting powder was used for the extraction. Quantitation was done by the standard addition method by spiking control plant samples with SA and JA solutions (ranging from 50 to  $1000 \text{ ng ml}^{-1}$  and from 1 to  $20 \text{ ng ml}^{-1}$ , respectively), and extracting as described above.

### 4.5. Liquid chromatography

Analyses were carried out using an Agilent 1100 (Waldrom, Germany) quaternary pump equipped with an auto-sampler. A Supelco Discovery  $\text{C}_{18}$  (Supelco, Bellefonte, USA) column ( $2.1 \times 150 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) was used at ambient temperature and the injected volume was  $10 \mu\text{l}$ . The elution gradient was carried out with binary solvent system consisting of 0.05% HOAc in  $\text{H}_2\text{O}$  (solvent A) and MeCN (solvent B) at a constant flow-rate of  $600 \mu\text{l min}^{-1}$  and a split 1/3. A linear gradient profile with the following proportions (v/v) of solvent B was applied ( $t$  (min), %B): (0, 15), (3, 15), (5, 100), (6, 100), (7, 15), (8, 15) with 5 min for re-equilibration.

### 4.6. Mass spectrometry

MS and MS/MS experiments were performed on an API 3000 triple quadrupole mass spectrometer (PE Sciex,

Concord, Ont., Canada). All the analyses were performed using the Turbo Ionspray source in negative ion mode with the following settings: capillary voltage  $-3500$  V, nebulizer gas ( $N_2$ ) 10 (arbitrary units), curtain gas ( $N_2$ ) 12 (arbitrary units), collision gas ( $N_2$ ) 4 (arbitrary units). For SA analysis we used the following parameters: declustering potential (DP)  $-30$  V, focusing potential (FP)  $-150$  V, entrance potential (EP)  $-10$  V, collision energy (CE)  $-20$  V (137/93), CXP  $-23$  V. For JA analysis the following parameters were used: declustering potential (DP)  $-37$  V, focusing potential (FP)  $-180$  V, entrance potential (EP)  $-10$  V, collision energy (CE)  $-25$  V (209/59), CXP  $-23$  V. Drying gas ( $N_2$ ) was heated to  $400$  °C and introduced at a flow-rate of  $5000$   $cm^3$   $min^{-1}$ . All the MS and MS/MS parameters were optimized in infusion experiments using individual standard solutions of SA and JA at a concentration of  $1$  ng  $\mu l^{-1}$  diluted in mobile phase A/B (1:1, v/v). These solutions were infused at a flow-rate of  $10$   $\mu l$   $min^{-1}$  into the mass spectrometer using a Model 11 syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Full scan data acquisition was performed scanning from  $m/z$  100 to 800 in profile mode and using a cycle time of 2 s with a step size of 0.1 u and a pause between each scan of 2 ms. In product ion scan experiments, MS/MS product ions were produced by collision-activated dissociation (CAD) of selected precursor ions in the collision cell of the triple quadrupole mass spectrometer and mass analyzed using the second analyzer of the instrument. In negative mode, the spectrum for SA and JA gave the deprotonated molecule  $[M - H]^-$ . Quantitation was performed by injection of samples in MRM mode, because many compounds could present the same nominal molecular mass. Thus, the combination of the parent mass and unique fragment ions was used to monitor selectively SA and JA in crude plant extracts. MRM acquisition was done by monitoring the 137/93 and 209/59 transitions for SA and JA, respectively; with a dwell time of 1000 ms for each transition.

#### 4.7. Other LC methods used for comparison

Different LC conditions were tested in order to obtain the highest sensitivity and system performance. Basic pH conditions as described by Wilbert et al. (1998) were first tested using a mobile phase 1%  $NH_3$ /5 mM  $NH_4OAc$  in  $H_2O$  in a XTerra MS  $C_{18}$   $50 \times 2.1$  mm,  $3.5$   $\mu m$  (Waters, Milford, MA, USA) column. A Gemini  $250 \times 4.6$  mm,  $5$   $\mu m$  (Phenomenex, Torrance, CA, USA) column was also tested with a 5 mM  $NH_4OAc$  pH 5/MeCN gradient (using a flow-rate of  $1.2$  ml  $min^{-1}$ ).

#### Acknowledgements

We thank the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació of the Government of Catalonia for funding the Ph.D. studentship of Guillem Segarra. This

study was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2002-04313-C03-01), Spain.

#### References

- Anderson, J.M., 1985. Simultaneous determination of abscisic acid and jasmonic acid in plant extracts using High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* 330, 347–355.
- Chiwocha, S.D.S., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Loewen, M., Ross, A.R.S., Kermode, A.R., 2003. A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant J.* 35, 405–417.
- Coquoz, J.L., Buchala, A.J., Meuwly, P., Metraux, J.P., 1995. Arachidonic-acid induces local but not systemic synthesis of salicylic-acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology* 85, 1219–1224.
- Delaney, T.P., 2004. Salicylic acid. In: Davies, P.J. (Ed.), *Plant Hormones*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 635–653.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gutrella, M., Kessmann, H., Ward, E., Ryals, J., 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247–1250.
- Engelberth, J., Schmelz, E.A., Alborn, H.T., Cardoza, Y.J., Huang, J., Tumlinson, J.H., 2003. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography–chemical ionization–mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 312, 242–250.
- Glassbrook, N., Ryals, J., 2001. A systematic approach to biochemical profiling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 186–190.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K., Klessig, D.F., 2000. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12, 677–690.
- Ko, W., Hora, F., 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 61, 707–710.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I., 1990. Salicylic-acid – a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral-infection. *Science* 250, 1002–1004.
- Metraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyssbenz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B., 1990. Increase in salicylic-acid at the onset of systemic acquired-resistance in cucumber. *Science* 250, 1004–1006.
- Meuwly, P., Metraux, J.P., 1993. Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214, 500–505.
- Molders, W., Buchala, A., Metraux, J.P., 1996. Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 112, 787–792.
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., 1994. Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography–negative chemical-ionization mass-spectrometry. *Anal. Biochem.* 218, 425–435.
- Muller, A., Duchting, P., Weiler, E.W., 2002. A multiplex GC–MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216, 44–56.
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., DeSamblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., Broekaert, W.F., 1996. Pathogen-induced systemic activation of a

- plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309–2323.
- Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C., 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52–58.
- Pozo, M.J., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., 2004. Jasmonates – signals in plant–microbe interactions. *J. Plant Growth Regul.* 23, 211–222.
- Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G.K., Iwahashi, H., 2002. Octadecanoid signaling component “burst” in rice (*Oryza sativa L.*) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1041–1045.
- Scott, I.M., Yamamoto, H., 1994. Mass-spectrometric quantification of salicylic-acid in plant-tissues. *Phytochemistry* 37, 335–336.
- Shoresh, M., Yedidia, I., Chet, I., 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95, 76–84.
- Sticher, L., Mauchmani, B., Metraux, J.P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235–270.
- Tamogami, S., Kodama, O., 1998. Quantification of amino acid conjugates of jasmonic acid in rice leaves by high-performance liquid chromatography turboionspray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 822, 310–315.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F., 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15107–15111.
- Trillas, I., Cotxarrera, L., 2003. Substrates containing a *Trichoderma asperellum* strain for biological control of *Fusarium* and *Rhizoctonia*. WO 03/000866 A1.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453–483.
- Wilbert, S.M., Ericsson, L.H., Gordon, M.P., 1998. Quantification of jasmonic acid, methyl jasmonate, and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 257, 186–194.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A., Raskin, I., 1991. Salicylic-acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell* 3, 809–818.



### **3.3 CAPÍTOL 3**

**Canvis en els nivells d'àcid salicílic, d'àcid  
jasmònic i del proteoma de plantes de  
cogombre inoculades amb la soca  
T34 de *Trichoderma asperellum***





### Canvis en els nivells d'àcid salicílic, d'àcid jasmònic i del proteoma de plantes de cogombre inoculades amb la soca T34 de *Trichoderma asperellum*

Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena M A, Oliveira E and Trillas I (2007) Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 7: 3943-3952

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/116324639/PDFSTART?CRETRY=1&SRETRY=0>

#### Resum

Els fongs del gènere *Trichoderma* són uns dels més emprats com a agents de control biològic contra fitopatògens. Aquests fongs produeixen canvis en el metabolisme de les plantes augmentant el creixement i millorant la resistència davant d'estressos biòtics i abiòtics. L'objectiu d'aquest estudi fou estudiar els canvis produïts en les hormones de defensa i el proteoma a la planta per la soca T34 de *Trichoderma asperellum*. A més a més, es va estudiar l'habilitat de T34 aplicat a alta concentració ( $10^7$  conidis  $\text{ml}^{-1}$ ) d'induir resistència sistèmica contra el patògen foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en planta de cogombre. Durant les primeres hores (entre 0 i 48 hores) de la interacció entre les rels de plantes de cogombre i la soca T34 de *T. asperellum*, els nivells d'àcid salicílic i àcid jasmònic i la típica activitat antipatogènica peroxidasa van augmentar als cotilèdons en diferent grau depenent de la concentració de fong aplicada ( $10^5$ ,  $10^6$  o  $10^7$  conidis  $\text{ml}^{-1}$ ). L'ús de l'electroforesi bidimensional de proteïnes i la identificació per mitjà d'espectrometria de masses ens va permetre identificar 28 proteïnes l'expressió de les quals fou afectada als cotilèdons després de la colonització de les rels per part de *Trichoderma* aplicat a altes concentracions: 17 proteïnes es trobaven regulades a l'alça i 11 a la baixa. Proteïnes implicades en l'eliminació d'espècies reactives d'oxigen, resposta a l'estrès, síntesi d'isoprenoids i etilè, així com fotosíntesi, fotorespiració i metabolisme dels carbohidrats foren regulades de forma diferenciada per *Trichoderma*. A més a més, l'aplicació d'una alta concentració de T34 a les rels va provocar la inducció de resistència a les fulles contra *P. syringae* pv. *lachrymans*. Els canvis en el proteoma trobats en aquest estudi ajuden a entendre com les plantes tractades amb *Trichoderma* esdevenen més resistents als atacs de patògens mitjançant canvis en l'expressió d'un conjunt de proteïnes orientades a la defensa que poden protegir la planta de forma directa o situar el metabolisme de la planta en un estat defensiu no assimilatori.



## **3.4 CAPÍTOL 4**

**La resistència sistèmica induïda per *Trichoderma asperellum* soca T34 en arabidopsis és similar a la ISR induïda per rizobacteris**



**La resistència sistèmica induïda per *Trichoderma asperellum* soca T34 en arabidopsis és similar a la ISR induïda per rizobacteris**

Segarra G, Van der Ent S, Trillas I and Pieterse C M J Signaling of *Trichoderma*-induced systemic resistance in *Arabidopsis* is similar to rhizobacteria-mediated ISR.

**Resum**

Certs bacteris i fongs colonitzadors de rels són capaços de produir resistència sistèmica d'ampli espectre en diverses espècies de plantes. S'ha demostrat que algunes soques de fongs del gènere *Trichoderma* són capaces d'augmentar la capacitat defensiva de diverses espècies de plantes. La via de senyalització subjacent a la resistència mediada per *Trichoderma* mostra a la vegada semblances i diferències amb la ISR induïda per rizobacteris, ja que la colonització de les rels per part d'aquest fong produeix tant efectes directes com efectes de *priming* depenent de les condicions. Per estudiar la via de transducció de la resistència induïda per *Trichoderma* vam estudiar les respostes de la planta model *Arabidopsis thaliana* al tractament amb l'agent de control biològic *Trichoderma asperellum* soca T34. La colonització de les rels per part de T34 feia que les parts aèries de les plantes d'arabidopsis fossin més resistents al patogen bacterià *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, a l'oomicet biòtrof *Hyaloperonospora parasitica* i al fong necròtrof *Plectosphaerella cucumerina*. De manera similar a la ISR mediada pel rizobacteri *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, la resistència conferida per T34 era funcional en els mutants *sid2* d'arabidopsis que tenien interrompuda la seva habilitat de produir àcid salicílic. Per contra, els mutants amb un defecte en les proteïnes MYB72 (requerida per ISR) o NPR1 (requerida per SAR i ISR) que es van tractar amb T34 no van mostrar nivells elevats de protecció contra atacs del patogen *P. syringae* pv. *tomato*. A més a més, tal com s'ha descrit en WCS417r, el pretractament amb T34 potencia l'expressió del gen de defensa *LOX2* (que respon a l'àcid jasmònic), així com la formació de dipòsits de cal·losa als llocs d'atac del patogen. En conjunt, els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que la resistència obtinguda a través de la colonització per T34 mostra un alt grau de similaritat amb la del rizobacteri WCS417r, tant a nivell de la transducció de senyals com dels mecanismes de defensa induïts.



# Signaling of *Trichoderma*-induced systemic resistance in *Arabidopsis* is similar to rhizobacteria-mediated ISR

GUILLEM SEGARRA<sup>1,†</sup>, SJOERD VAN DER ENT<sup>2,3,†</sup>, ISABEL TRILLAS<sup>1</sup> AND CORNÉ M.J. PIETERSE<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain.

<sup>2</sup>Plant-Microbe Interactions, Institute of Environmental Biology, Faculty of Science, Utrecht University, P.O. Box 800.84, 3508 TB Utrecht, the Netherlands.

<sup>3</sup>Center for Biosystems Genomics, P.O. Box 98, 6700 AB Wageningen, the Netherlands.

## SUMMARY

Selected root-colonizing bacteria and fungi trigger broad-range systemic resistance in an array of plant species. *Trichoderma* spp. have also been demonstrated to enhance the defensive capacity of various plant species. The signaling pathway underlying *Trichoderma*-mediated resistance appears to show similarities to both systemic acquired resistance (SAR) and rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR), as root colonization by this fungus induced both direct and priming effects to the plants as well as it produced changes to salicylic and jasmonic acid signaling. To unravel the signal transduction route of *Trichoderma*-induced resistance, we studied the responses of the model plant *Arabidopsis thaliana* to root colonization by *Trichoderma asperellum* T34. The fungus remained confined to the roots but rendered leaves more resistant to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, the biotrophic oomycete *Hyaloperonospora parasitica*, and the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. The induced systemic resistance against *P. syringae* pv. *tomato* was lost in the *myb72* and *npr1* mutants of *Arabidopsis* that are impaired in rhizobacteria-mediated ISR, but fully retained in the *sid2* mutant that is deficient in SAR. As reported for *P. fluorescens* WCS417r-induced ISR, treatment with T34 primed the expression of defense-related genes responsive to jasmonic acid, as well as the formation of callose-containing papillae at sites of pathogen entry. Thus, the systemic resistance induced by *T. asperellum* T34 in *Arabidopsis* is similar to rhizobacteria-mediated ISR.

## INTRODUCTION

For health and environmental reasons, there is an increasing legislative pressure to reduce reliance on pesticides for disease control in agriculture. This has raised the need to study alternatives, such as

biological control agents. *Trichoderma* spp. are cosmopolitan soil fungi, widely used to interfere with plant pathogens and pests. It is well established that their effectiveness results from different modes of action. Firstly, *Trichoderma* spp. compete with other soil micro-organisms for nutrients and space in the rhizosphere (Chet and others 1987). Secondly, they can act directly on other soil inhabitants by producing a wide range of antibiotic substances (Schirrmock and others 1994) and lytic enzymes to parasitize other fungi (Harman and others 1981; Lorito and others 1996; Woo and others 1999). Thirdly, *Trichoderma* spp. are able to inhibit or degrade pectinases and other enzymes that are essential for the invasive activity of plant-pathogenic fungi (Zimand and others 1996). Finally, apart from these direct effects on plant pathogens, recent findings suggest that *Trichoderma* spp. can systemically elevate the plant's resistance against various pathogens, including fungi and bacteria (De Meyer and others 1998; Shores and others 2005). Root colonization by some strains of *Trichoderma* spp. results in the induction of systemic resistance against different attackers in various plant species, as shown by spatial separation between biocontrol agent and plant attacker (Harman and others 2004a).

Enhancement of basal resistance levels is a common reaction of plants to biotic and abiotic stresses (Van Loon 2000), and is commonly referred to as induced resistance. The classic example is that of systemic acquired resistance (SAR) (Durrant and Dong 2004). Initial attack by a pathogen not only triggers local defense responses, but can also lead to the generation of a signal that is spread throughout the plant. Upon perception of this signal, the distal plant parts become more resistant against subsequent attack by a broad range of pathogens. SAR depends on the production of, and responsiveness to, salicylic acid (SA) (Delaney and others 1994; Mauch-Mani and Metraux 1998; Nawrath and Metraux 1999) and is associated with the induction of novel PATHOGENESIS-RELATED (PR) proteins (Van Loon and Van Strien 1999). In *Arabidopsis*, pathogen-induced SA is synthesized from isochlorogenic acid by the enzyme isochlorogenic acid synthase, which is encoded by the *SID2* (*SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2*) gene (Wildermuth and others 2001). Although SA is necessary, it is not the transported signal (Vernooij and others 1994), the nature of which is still unknown.

\*Correspondence: Tel.: +31 30 253 6887; Fax: +31 30 251 8366;

E-mail: C.M.J.Pieterse@uu.nl

<sup>†</sup>G.S. and S.E. contributed equally to this work.

Another crucial nodes in SAR signaling is the transcriptional co-activator NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PR-GENES 1) (Dong 2004). Mutant Arabidopsis *npr1* plants are incapable of transducing the SA signal, resulting in an SAR minus phenotype.

Phenotypically similar induced systemic resistance (ISR) is triggered upon colonization of plant roots by specific non-pathogenic rhizobacteria (Van Loon and others 1998). In Arabidopsis, ISR triggered by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r is regulated by a SA-independent signal transduction cascade (Pieterse and others 1996). Although functional NPR1 is also necessary for the expression of ISR, the phytohormones jasmonic acid (JA) and ethylene (ET), rather than SA signaling, are the dominant regulators of the ISR signaling pathway (Pieterse and others 1998). Even though colonization of the roots by ISR-inducing rhizobacteria enhances the plant's resistance level to a broad spectrum of pathogens (Van Loon and others 1998), no defense mechanisms become directly activated in the systemic tissue in the absence of pathogen (van Wees and others 1999; Verhagen and others 2004). Yet, these tissues activate JA- and ET-regulated genes faster and more strongly after pathogen attack (van Wees and others 1999; Hase and others 2003; Verhagen and others 2004), a phenomenon known as priming (Conrath and others 2006). Locally in the roots of Arabidopsis, WCS417r alters the expression of over 90 genes (Verhagen and others 2004). One of these root specific WCS417r-responsive genes encodes a R2R3-like MYB transcription factor (MYB72). Mutant Arabidopsis *myb72* are unable to mount an ISR response, indicating that MYB72 is crucial for the development of rhizobacteria-mediated ISR in Arabidopsis (Sjoerd van der Ent, Utrecht University, the Netherlands, *personal communication*).

*T. asperellum* isolate T203 has been shown to induce resistance in cucumber against the bacterial leaf pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Shoresh and others 2005). Upon colonization of cucumber roots by T203 no differences in host SA and ET production could be observed (Shoresh and others 2005). In addition no changes in SA or JA were observed when cucumber roots were treated with *T. asperellum* isolate T34 at the standard concentration of  $10^5$  cfu.ml<sup>-1</sup> (Segarra and others 2007). T34 is a biocontrol agent useful to control diseases produced by soilborne pathogens as *Fusarium oxysporum* (Cotxarrera and others 2002) and *Rhizoctonia solani* (Trillas and others 2006). However, in T203, blocking the action of ET or the synthesis of JA with the chemical inhibitors silver thiosulfate and diethylthiocarbamate, respectively, diminished the enhanced protective effects, suggestive of a signaling role for these hormones in *Trichoderma*-mediated systemic resistance in cucumber (Shoresh and others 2005). Contrary to the effect of biocontrol bacteria, root colonization by *Trichoderma* transiently increased peroxidase and chitinase activity in local, as well as

systemic tissues (Yedidia and others 2003). There is evidence that high doses of *Trichoderma* may activate the SAR pathway: application of high densities of T34 spores resulted in increases of JA and SA levels as well as peroxidase activity and was effective in reducing *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* growth on cucumber leaflets (Segarra and others 2007). Thus, both similarities and differences seem to exist between the signaling pathways underlying rhizobacteria- and *Trichoderma*-induced resistance. However, the results are difficult to compare, because they were obtained using different plant species.

In order to compare the systemic resistance that is mediated by *Trichoderma* spp. with that induced by rhizobacteria, we tested the ability of *T. asperellum* T34 to induce systemic resistance against various foliar diseases in the model plant Arabidopsis. Furthermore, the defense signaling pathway involved was analyzed by using Arabidopsis mutants impaired in SAR, ISR or both.

## RESULTS

### *Trichoderma*-induced resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in Arabidopsis

*Trichoderma* spp. have been demonstrated to systemically induce resistance in different dicotyledonous and monocotyledonous plants against diverse attackers (Harman and others 2004a). To determine whether root colonization by *T. asperellum* T34 can enhance resistance in Arabidopsis against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), the severity of disease inflicted by this pathogen was quantified for control and *T. asperellum* T34-treated Col-0 plants. As shown in Fig. 1, plants treated with T34 showed significantly fewer disease symptoms than those pre-treated with a control solution. The extent of the T34-mediated reduction in disease severity was larger than that conferred by the ISR-inducing *P. fluorescens* WCS417r bacteria. This difference in effectiveness could be caused by local effects if T34 would colonize Arabidopsis shoots endophytically, or be truly systemic if T34 remains confined to the roots. These two possibilities were further investigated.

### *Trichoderma*-induced resistance is expressed systemically

Rhizosphere-competent *Trichoderma* spp. are able to penetrate and colonize the epidermis and outer root cortex of cucumber seedlings (Yedidia and others 1999; Harman 2000). However, an endophytic *Trichoderma* species (*T. stromaticum*) (Evans and



others 2003) has also been described. If *T. asperellum* T34 could colonize Arabidopsis in a similar manner, the observed partial prevention of disease development (Fig. 1) could also be the result of locally induced defense mechanisms. To examine this possibility, externally sterilized sections of Arabidopsis stems were harvested at different time intervals after T34 root colonization, and placed on *Trichoderma*-specific agar medium. None of the stem sections gave rise to outgrowth of *Trichoderma* mycelium (data not shown). In contrast, T34 spores were able to germinate and grow on the same medium. These observations demonstrate that T34 treatment of Arabidopsis roots does not lead to spread of the fungus in the above-ground tissue. Hence, the observed enhanced level of protection against *Pst* DC3000 in T34-treated plants must be caused by a plant-mediated systemic defense response that is triggered by T34.

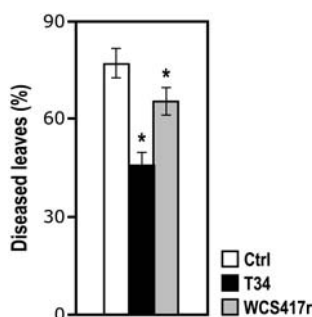


Fig. 1 *Trichoderma*-induced protection against *Pst* DC3000 in Arabidopsis. Levels of T34- and WCS417r-induced protection against *Pst* DC3000 in Arabidopsis Col-0 plants. Resistance was induced by growing the plants for 3 weeks in soil containing either T34 conidia or ISR-inducing WCS417r bacteria. Five-week-old plants were challenge inoculated with a bacterial suspension of virulent *Pst* DC3000. Four days after challenge inoculation, the percentage of diseased leaves was assessed. Asterisks indicate statistically significant differences compared to non-induced control plants (Student's *t*-test,  $\alpha=0.05$ ,  $n=20$ ).

### *Trichoderma*-induced resistance resembles rhizobacteria-mediated ISR

To elucidate whether the systemic resistance induced by T34 is similar to SAR, ISR, or both, the *sid2-2* and the *myb72-1* mutants of Arabidopsis were tested for their capacity to express T34-induced resistance against *Pst* DC3000, as well as *npr1-1* (Fig. 2). Colonization of wild-type Arabidopsis roots by T34 resulted in a 26 % reduction in disease symptoms compared to control plants. Under the same conditions, a 24 % was observed in the *sid2-2* mutant, which is unable to produce SA, whereas no significant reduction was evident in the *myb72-1* or *npr1-1* mutants that are impaired in ISR, and both ISR and SAR, respectively. Thus, the *Trichoderma*-induced systemic resistance was fully retained in the SAR mutant *sid2-2*, but lost in the ISR mutant *myb72-1*. Furthermore, treatment with T34 did not lead to induction or priming of the SAR marker gene *PR-1* (data not shown). These results demonstrate that the

systemic resistance induced by T34 is similar to rhizobacteria-mediated ISR.

### *Trichoderma*-mediated ISR is effective against different types of pathogens

To investigate whether T34-mediated ISR, like WCS417r-elicited ISR, is effective against a broad range of pathogens, disease severity of T34- or control-treated Col-0 plants was determined upon challenge inoculation with the biotrophic oomycete *Hyaloperonospora parasitica* and the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. Figure 3A shows that T34-treated plants developed significantly fewer *H. parasitica*-inflicted disease symptoms compared to the control-treated plants. Similarly, root colonization by T34 resulted in a significantly lower disease when *P. cucumerina* was used as the challenging pathogen (Fig. 3B). Together with the data on the enhanced protection against *Pst* DC3000 (Fig. 1), these results demonstrate that colonization of Arabidopsis roots by T34 triggers a systemic resistance that is effective against different types of pathogens.

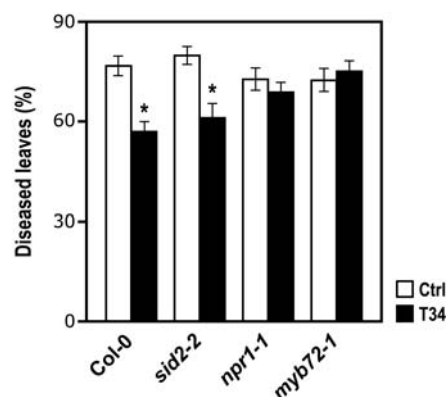


Fig. 2 *Trichoderma*-induced protection is SA-independent but requires NPR1 and MYB72. Levels of T34-induced protection against *Pst* DC3000 in wild-type Col-0 and mutant *sid2-2*, *npr1-1*, and *myb72-1* plants. Induction of resistance, pathogen challenge and disease assessment were performed as described in the legend to Figure 1. Asterisks indicate statistically significant differences compared to non-induced control plants (Student's *t*-test,  $\alpha=0.05$ ,  $n=20$ ).

### *Trichoderma*-induced priming for enhanced defense

An early defense response of Arabidopsis to attack by *H. parasitica* is the formation of callose-containing cell-wall appositions at sites of attempted penetration. Several resistance-inducing treatments have been described to boost this papillae formation, amongst which are root colonization by WCS417r bacteria (Kohler and others 2002; Ton and others 2005). To investigate whether colonization of the roots by T34 primes the Arabidopsis leaf tissue for enhanced callose deposition upon infection by *H. parasitica*, the percentage of germinating spores that are blocked by the formation of callose containing papillae was

determined in Col-0 plants. Figure 4A shows that pre-treatment with T34 also leads to a significantly higher percentage of germinating *H. parasitica* spores being blocked by the formation of callose-containing papillae. These results indicate that T34, like ISR-inducing WCS417r, systemically primes leaf tissue for augmented callose deposition at the site of pathogen entry.

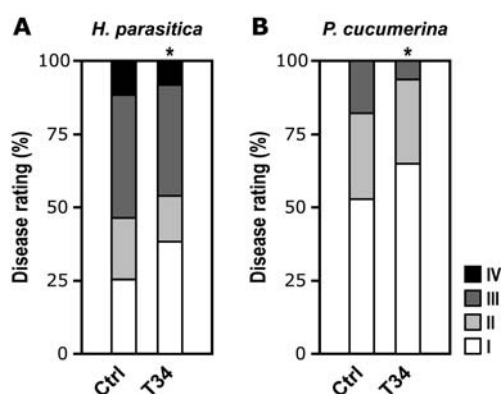


Fig. 3 *Trichoderma*-induced resistance is effective against different pathogens. (A) Quantification of ISR in Arabidopsis Col-0 against *H. parasitica*. Resistance was induced by growing the plants in soil containing T34 conidia. Plants were challenge-inoculated with *H. parasitica* when three weeks old. Disease severity was determined nine days after challenge. Disease ratings are expressed as the percentage of leaves ( $n=250$ ) in disease-severity classes: I, no sporulation; II, trailing necrosis; III, < 50% of the leaf area covered with sporangia; IV, > 50% of the leaf area covered with sporangia, with additional chlorosis and leaf collapse. (B) Quantification of T34-mediated resistance against *P. cucumerina*. ISR was induced as described above. Plants were inoculated with *P. cucumerina* when five weeks old. At seven days after challenge, disease severity was determined. Disease ratings were expressed as severity of disease symptoms on each leaf: I, no symptom; II, lesion diameter  $\leq 2$  mm; III, lesion diameter  $\geq 2$  mm. Asterisks indicate statistically significantly different distributions of the disease severity classes compared with the non-induced control treatments (Chi-square,  $\alpha=0.05$ ,  $n=120$ ).

Previously, WCS417r was demonstrated to prime systemic leaves for enhanced transcriptional activity of specific JA- and ET-responsive genes (van Wees and others 1999; Verhagen and others 2004). Notably, expression of the JA-responsive gene *LOX2* (*LIPOXYGENASE 2*) serves as a molecular marker for WCS417r-induced priming for defense in ISR (Conrath and others 2006). To investigate whether T34-induced resistance is likewise associated with priming for enhanced *LOX2* gene expression, *LOX2* mRNA levels were assessed at different time points after exogenous application of MeJA. Figure 4B shows that T34-treated plants display a faster and stronger accumulation of *LOX2* transcripts after MeJA treatment than do induced plants. Together these results indicate that analogous to WCS417r (van Wees and others 1999; Verhagen and others 2004), T34 primes Arabidopsis plants for enhanced expression of defense responses in the systemic plant parts, resulting in an augmented expression of these defenses after pathogen attack.

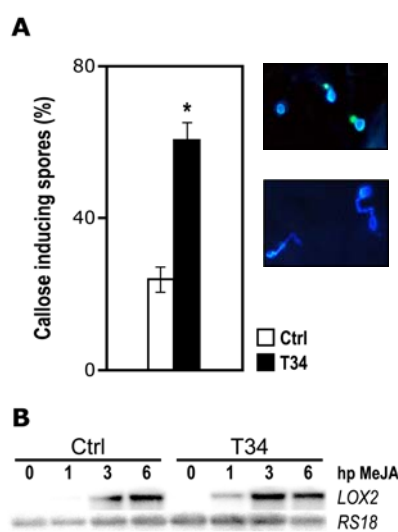


Fig. 4 *Trichoderma* primes for enhanced defense responses upon challenge inoculation. (A) Induced resistance against *H. parasitica* is associated with enhanced deposition of callose-containing papillae at sites of attempted penetration, resulting in a reduction of the number of spores that lead to successful penetration into Arabidopsis leaves. Two days after challenge with *H. parasitica*, leaves of plants of which the roots were pre-treated with water (Ctrl) or T34 were stained with calcofluor/aniline-blue and analyzed by epifluorescence microscopy (UV), and the percentage of germinating spores that led to callose deposition in the epidermal cell layer was determined. Inset shows a representative example of a germinating *H. parasitica* spore triggering callose deposition in the underlying epidermal cell. (B) *LOX2* expression in five-week-old Ctrl- and T34-treated plants at different times after treatment (hp) with 100  $\mu$ M MeJA. Equal loading of RNA samples was checked by using a probe for the constitutively expressed 18S rRNA (*RS18*).

## DISCUSSION

Bigirimana and others (1997) showed that treating soil with *Trichoderma harzianum* isolate T39 made leaves of bean plants more resistant to diseases that are caused by the fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum lindemuthianum*, even though T39 was present only on the roots and not on the foliage. Since then, several *Trichoderma* spp. have been claimed to induce local and/or systemic resistance to plant pathogens in diverse plant species, such as bean, cotton, cucumber, and maize (Bigirimana and others 1997; Howell and others 2000; Yedidia and others 2003; Harman and others 2004b; Shoshani and others 2005). Here we described that application of *Trichoderma asperellum* isolate T34 to the roots of Arabidopsis plants makes leaves of the plant more resistant to the bacterial pathogen *Pst* DC3000 (Fig. 1), the biotrophic oomycete *H. parasitica* (Fig. 3A) and the necrotrophic fungus *P. cucumerina* (Fig. 3B).

The signaling pathway by which *Trichoderma*-induced resistance is established, has not been thoroughly investigated so far. Next to a requirement of a specific *Trichoderma*-induced MAPK protein (Shoshani and others 2006), the phytohormones JA

and ET have been suggested to be involved in the induction of systemic defense by *T. asperellum* T203 against *P. syringae* pv. *lachrymans* in cucumber (Shoresh and others 2005). When the synthesis of JA or ET by the plant was inhibited, the induction of resistance by T203 was reduced or lost. Responsiveness to these hormones is also required for rhizobacteria-mediated ISR (Pieterse and others 2000). Pre-treatment of Arabidopsis plants with ISR-inducing *P. fluorescens* WCS417r primed the plants for enhanced expression of JA- and ET-regulated genes, although the levels of the hormones JA and ET were not altered (Pieterse and others 2000). Similarly, treatment of cucumber plants with T203 leads to an enhanced responsiveness of specific defense-related genes, without observable changes in ET or SA production.

Mutant *sid2-2* plants are unable to develop SAR (Nawrath and Metraux 1999), while rhizobacteria-mediated ISR is still operative in this mutant (Ton and others 2002). Pre-treatment with T34 increased resistance in *sid2-2* plants to the same level as in wild-type Col-0 (Fig. 2), demonstrating that SA production does not play a role in *Trichoderma*-induced resistance. On the contrary, we demonstrated that the MYB72 protein is required for eliciting *Trichoderma*-induced resistance against *Pst* DC3000. The transcription factor gene *MYB72* is one of over 90 genes of which the expression is altered locally upon colonization by ISR-inducing *P. fluorescens* WCS417r (Verhagen and others 2004). Transcriptional activation of this gene is required for the development of ISR in Arabidopsis, as evident from the use of the *myb72-1* and *myb72-2* mutants. These mutants are not impaired in biologically or chemically induced SAR (Sjoerd van der Ent, Utrecht University, the Netherlands, *personal communication*). Thus, the signaling pathway underlying *Trichoderma*-induced resistance resembles that of rhizobacteria-mediated ISR.

Induction of systemic resistance does not necessarily require a direct induction of defense responses upon perception of the resistance-inducing signal. Many examples indicate that defense responses can also be primed for a faster and stronger activation upon challenge (Conrath and others 2006). This phenomenon of priming has been implicated in rhizobacteria-mediated ISR. Colonization of Arabidopsis roots by *P. fluorescens* WCS417r did not result in a transcriptional reprogramming in the distal plant parts, but rather primed gene expression for enhanced responsiveness to subsequent pathogen attack (van Wees and others 1999; Verhagen and others 2004). Likewise, the WCS417r-enhanced formation of callose-containing papillae becomes apparent only after pathogen infection (Sjoerd van der Ent, Utrecht University, the Netherlands, *personal communication*). Priming of defense responses has

also been demonstrated for resistance induced by rhizobacteria other than WCS417r. Pre-treatment of Arabidopsis plants with the biocontrol agent *Pseudomonas putida* LSW17S, a strain that induces ISR in this species and in *Solanaceous* crops against various pathogens, primed the leaf tissues for enhanced formation of callose-containing papillae, generation of active oxygen species, and the expression of various defense-related genes for an augmented response after pathogen attack (Ahn and others 2007). Furthermore, *Serratia marcescens* strain 90-166- and *P. fluorescens* 89B61-induced resistance of cucumber plants against the anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare* was associated with elevated levels of phenolic compounds and callose at sites of fungal penetration (Jeun and others 2004).

*Trichoderma*-mediated ISR has been suggested to act through priming as well. Cucumber leaves of plants grown in a potting mix containing *Trichoderma hamatum* T382 did not show any difference in  $\beta$ -1,3-glucanase activity compared to controls. However, upon attack by *C. orbiculare*, activity was higher when these plants were grown in the potting mix containing T382 (Zhang and others 1998). Both direct activation and potentiation of defenses were observed upon treatment of cucumber roots with *Trichoderma asperellum* T203 (Shoresh and others 2005). In contrast to typical ISR, peroxidase and chitinase activities and mRNAs were increased transiently both locally and systemically (and  $\beta$ -1,3-glucanase locally) after inoculating the plant with this strain in the absence of pathogens (Yedidia and others 1999; Yedidia and others 2000; Shoresh and others 2005). Such a direct effect on peroxidase was not observed when cucumber plants were pre-treated with T34 at the standard concentration ( $10^5$  cfu.ml<sup>-1</sup>), although increases of peroxidase activity were observed when  $10^6$  or  $10^7$  cfu per ml were applied (Segarra and others 2007). Besides a transient direct induction of peroxidase activity, T203 treatment resulted in a primed defense reaction to pathogen attack (Shoresh and others 2005).

In our study we also observed a priming effect as a result of root colonization by T34. Like WCS417r, T34 treatment resulted in a higher percentage of germinating *H. parasitica* spores being blocked by the formation of callose-containing papillae (Fig. 4A). Furthermore, MeJA-triggered *LOX2* gene expression was augmented in T34- as compared to control-treated plants (Fig. 4B). Priming of JA-responsive genes, such as *LOX2*, is typical for rhizobacteria-mediated ISR (Verhagen and others 2004; Conrath and others 2006). Collectively, our results indicate that the signaling pathway by which *Trichoderma*-induced resistance is established is similar to the one that is active in WCS417r-induced ISR and that it leads to priming of similar defense responses.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cultivation of biocontrol agents and pathogens

*Trichoderma asperellum* strain T34 (Trillas and Cotxarrera 2003) was grown on 10 g.l<sup>-1</sup> malt agar plates for 5 days at 22°C. Conidia were collected in distilled water and resuspended to a final density of 5x10<sup>6</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>.

Non-pathogenic, rifampicin-resistant *Pseudomonas fluorescens* WCS417r bacteria were used for induction of ISR (van Wees and others 1997). WCS417r was grown for 24 h at 28°C on King's medium B (KB) agar plates (King and others 1954), collected and washed by centrifugation as described previously (Pieterse and others 1996) and resuspended to a final density of 10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>.

Virulent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Whalen and others 1991) was grown overnight at 28°C in liquid KB medium. After centrifugation for 10 min at 5,000 x g, the bacterial cells were resuspended in 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.015% (v/v) Silwet L-77 (Van Meeuwen Chemicals, Weesp, The Netherlands) to a final density of 2.5x10<sup>7</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>.

*Hyaloperonospora parasitica* strain WACO9 was maintained on susceptible Col-0 plants as described by Koch and Slusarenko (1990). Sporangia were obtained by washing leaves that were densely covered by sporangiophores in distilled water, collected by centrifugation, and resuspended in water to a final density of 5x10<sup>4</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>.

*Plectosphaerella cucumerina* (Palm and others 1995), isolated from naturally infected Arabidopsis, was grown on 19.5 g.l<sup>-1</sup> potato dextrose agar (PDA; Difco Laboratories, Detroit, USA) plates for 2 weeks at 22°C. Conidia were harvested as described by Broekaert and others (1990), and resuspended in 10 mM MgSO<sub>4</sub> to a final density of 5x10<sup>6</sup> spores.ml<sup>-1</sup>.

### Plant growth conditions

Seeds of wild-type *Arabidopsis thaliana* accession Col-0 and mutants *myb72-1* (Verhagen 2004), *npr1-1* (Cao and others 1994), and *sid2-2* (Nawrath and Metraux 1999) were sown in quartz sand. Two-week-old seedlings were transferred to 60-mL pots containing a sand-potting soil mixture that had been autoclaved for 20 min at 120°C on two consecutive days. Plants were cultivated in a growth chamber with a 9-h day (200 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> at 24°C) and a 15-h night (20°C) cycle at 70% relative humidity. Plants were watered on alternate days and once a week supplied with modified half-strength Hoagland's nutrient solution as described previously (Pieterse and others 1996).

### Induction treatments

For induced resistance bioassays, the soil was mixed with T34 conidia to a final density of 10<sup>5</sup> cfu.g<sup>-1</sup>, before transplanting the Arabidopsis seedlings. Similarly, a suspension of ISR-inducing WCS417r was mixed thoroughly through the soil to a final density of 5x10<sup>7</sup> cfu.g<sup>-1</sup>, as described previously (Pieterse and others 1996). Control soil was supplemented with an equal volume of 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

### *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 bioassays

Plants were challenged when five weeks old by dipping the leaves briefly in a solution of 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.015% (v/v) Silwet L-77, containing 2.5x10<sup>7</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> *Pst* DC3000 bacteria. One day before challenge inoculation, the plants were placed at 100% relative humidity. Four days after challenge, disease severity was assessed by determining the percentage of diseased leaves per plant. Leaves were scored as diseased when showing necrotic or water-soaked lesions surrounded by chlorosis. Based on the number of diseased and non-diseased leaves, the disease index was calculated for each plant (*n*=20) as described (Pieterse and others 1996).

### *Hyaloperonospora parasitica* bioassays

Three-week-old plants were misted with a *H. parasitica* spore suspension containing 5x10<sup>4</sup> spores.ml<sup>-1</sup>. Inoculated plants were maintained at 17°C and 100% relative humidity for 24 h. Subsequently, humidity was lowered to ambient level to reduce the chance of secondary infections by opportunistic pathogens. Seven days after challenge inoculation humidity was again raised to 100% to induce sporulation. Disease symptoms were scored at 9 days after inoculation on about 250 leaves per treatment. Disease ratings were expressed as severity of disease symptoms and pathogen sporulation on each leaf: I, no sporulation; II, trailing necrosis; III, < 50% of the leaf area covered by sporangia; IV, > 50% of the leaf area covered with sporangia, with additional chlorosis and leaf collapse.

Quantification of callose deposition was performed as described by Ton and others (2005). In short, leaves were collected two days after inoculation and incubated overnight in 96% ethanol. Destained leaves were washed in 0.07 M phosphate buffer, pH 9, incubated for 15 min in 0.07 M phosphate buffer containing 0.005% calcofluor (fluorescent brightener; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, the Netherlands) and 0.01% aniline-blue (water blue; Merck, Darmstadt, Germany), and subsequently washed in 0.07 M phosphate buffer containing only

0.01% aniline-blue to remove excess calcofluor. Inspection was performed with an epifluorescence microscope containing a UV filter (bandpass 340 to 380 nm, long-path 425 nm). Callose depositions in response to *H. parasitica* infection were quantified by determining the average percentage of callose-inducing spores per infected leaf ( $n=15$ ).

#### *Plectosphaerella cucumerina* bioassays

Five-week-old plants ( $n=20$ ) were challenge inoculated with *P. cucumerina* by applying 6- $\mu$ L droplets containing  $5 \times 10^6$  spores.ml<sup>-1</sup> to five fully expanded leaves, as described previously (Ton and Mauch-Mani 2004). Inoculated plants were kept at 100% relative humidity. At 7 days after challenge, disease severity was determined. Disease ratings were expressed as severity of disease symptoms on each leaf: I, no symptoms; II, lesion diameter  $\leq 2$  mm; III, lesion diameter  $\geq 2$  mm.

#### MeJA treatment

Treatment with methyl jasmonate (MeJA) was performed by dipping five-week-old plants in an aqueous solution containing 100  $\mu$ M MeJA (Serva, Brunschwig Chemie, Amsterdam, the Netherlands) and 0.015% Silwet L-77 (Van Meeuwen Chemicals B.V., Weesp, the Netherlands), as described previously (Pieterse and others 1998). Leaf rosettes were harvested at 0, 1, 3 and 6 h after induction treatment and immediately frozen in liquid nitrogen.

#### Detection of *Trichoderma* in plant tissue

Sections of Arabidopsis stems were taken two and four weeks after transplanting seedlings in soil containing T34. To monitor outgrowth of T34 from above-ground plant tissue, the stem were surface-sterilized by soaking them in 96% ethanol for 1 min, then in 70% ethanol for 2 min, and finally 2 min in sterile distilled water, before placing them on *Trichoderma*-specific agar medium as described (Chung and Hoitink 1990).

#### RNA extraction and northern blot analysis

Total RNA was extracted by homogenizing frozen tissue in extraction buffer (0.35 M glycine, 0.048 M NaOH, 0.34 M NaCl, 0.04 M EDTA, 4% (w/v) SDS; 1 mL.g<sup>-1</sup> plant tissue). The homogenates were extracted with phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) and the RNA was precipitated with LiCl, as described previously (Sambrook and others 1989). For RNA gel blot analysis, 12.5  $\mu$ g RNA was denatured using

glyoxal and DMSO (Sambrook and others 1989), electrophoretically separated on a 1.5% agarose gel, and blotted onto a Hybond-N<sup>+</sup> membrane (Amersham, 's-Hertogenbosch, the Netherlands) by capillary transfer. The electrophoresis and blotting buffer consisted of 10 and 25 mM sodium phosphate (pH 7.0), respectively. RNA gel blots were hybridized with LOX2 (At3g45140)-specific probes that were labeled with  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP by random primer labeling (Feinberg and Vogelstein 1983). LOX2 probes were generated through PCR on *A. thaliana* cDNA using gene-specific primers (5'-GCATCCTCATTTCGGCTACACCA-3' and 5'-TCCGCACTTCACTCCACCATCCT-3'). A gene-specific probe for 18S rRNA (RS18) was used to check for equal loading.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. L.C. Van Loon, Dr. Eva Casanova and Dr. Jurriaan Ton for useful comments on the manuscript. This research was supported by the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació of the Government of Catalonia and the European Social Fund for Ph.D. funding, as well as for the Beca per a estada de recerca fora de Catalunya (2006 BE 00072) awarded to Guillem Segarra. This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2005-08137-C03-01), by grant CBSG A4 of the Centre for BioSystems Genomics, and by grants 865.04.002 and 863.04.019 of the Earth and Life Sciences Foundation (ALW), which is subsidized by the Netherlands Organization of Scientific Research (NWO).

#### Literature Cited

- Ahn IP, Lee SW, Suh SC. 2007. Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20(7):759-768.
- Bigirimana J, De Meyer G, Poppe J, Elad Y, Hofte M. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* 62(3B):1001-1007.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J. 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiology Letters* 69(1-2):55-60.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X. 1994. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired-resistance. *Plant Cell* 6(11):1583-1592.
- Chet I, Ordentlich A, Kless H, Oppenheim A. 1987. The potential of chitinolytic microorganisms in

- controlling soilborne plant pathogens. *Phytoparasitica* 15(2):146-147.
- Chung YR, Hoitink HAJ. 1990. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of Rhizoctonia damping-off in a bark compost-amended container medium. *Phytopathology* 80(1):73-77.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B. 2006. Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(10):1062-1071.
- Cotxarrera L, Trillas-Gay MI, Steinberg C, Alabouvette C. 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress Fusarium wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* 34(4):467-476.
- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, Höfte M. 1998. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104:279-286.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gutrella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J. 1994. A central role of salicylic acid in plant-disease resistance. *Science* 266(5188):1247-1250.
- Dong XN. 2004. NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* 7(5):547-552.
- Durrant WE, Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185-209.
- Evans HC, Holmes KA, Thomas SE. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress* 2(2):149-160.
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *analytical biochemistry* 132(1):6-13.
- Harman GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4):377-393.
- Harman GE, Chet I, Baker R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology* 71(6):569-572.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004a. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2(1):43-56.
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J. 2004b. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94(2):147-153.
- Hase S, van Pelt JA, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2003. Colonization of Arabidopsis roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62(4):219-226.
- Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90(3):248-252.
- Jeun YC, Park KS, Kim CH, Fowler WD, Kloepper JW. 2004. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological control* 29(1):34-42.
- King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44(2):301-307.
- Koch E, Slusarenko A. 1990. Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* 2(5):437-445.
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology* 128(3):1046-1056.
- Lorito M, Woo SL, D'Ambrosio M, Harman GE, Hayes CK, Kubicek CP, Scala F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(3):206-213.
- Mauch-Mani B, Metraux JP. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82(5):535-540.
- Nawrath C, Metraux JP. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11(8):1393-1404.
- Palm ME, Gams W, Nirenberg HI. 1995. *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. *Mycologia* 87(3):397-406.
- Pieterse CMJ, van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Van Loon LC. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(3):123-134.
- Pieterse CMJ, van Wees SCM, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits N, Weisbeek PJ, Van Loon LC. 1998. A novel signaling pathway controlling

- induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10(9):1571-1580.
- Pieterse CMJ, vanWees SCM, Hoffland E, vanPelt JA, vanLoon LC. 1996. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8(8):1225-1237.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisanatac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60(12):4364-4370.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena MA, Oliveira E, Trillas I. 2007. Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics in press*.
- Shoresh M, Gal-On A, Leibman D, Chet I. 2006. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance. *Plant Physiology* 142(3):1169-1179.
- Shoresh M, Yedidia I, Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95(1):76-84.
- Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Metraux JP, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2002. Characterization of Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant Journal* 29(1):11-21.
- Ton J, Jakab G, Toquin V, Flors V, Iavicoli A, Maeder MN, Metraux JP, Mauch-Mani B. 2005. Dissecting the beta-aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. *Plant Cell* 17(3):987-999.
- Ton J, Mauch-Mani B. 2004. Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *Plant Journal* 38(1):119-130.
- Trillas I, Cotxarrera L, inventors; 2003. Substrates containing a *Trichoderma asperellum* strain for biological control of *Fusarium* and *Rhizoctonia*. WO 03/000866 A1
- Trillas MI, Casanova E, Cotxarrera L, Ordovas J, Borrero C, Aviles M. 2006. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological control* 39(1):32-38.
- Van Loon LC. 2000. Systemic induced resistance. In: Slusarenko AJ, Fraser RSS, Van Loon LC, eds. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p 521-574.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2):85-97.
- van Wees SC, Luijendijk M, Smoorenburg I, Van Loon LC, Pieterse CM. 1999. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* 41(4):537-549.
- van Wees SC, Pieterse CM, Trijssenaar A, Van 't Westende YA, Hartog F, Van Loon LC. 1997. Differential induction of systemic resistance in Arabidopsis by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(6):716-724.
- Verhagen BWM. 2004. *Transcriptomics and knockout mutant analysis of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in Arabidopsis*. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University. 185 p.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(8):895-908.
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditzjawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6(7):959-965.
- Whalen MC, Innes RW, Bent AF, Staskawicz BJ. 1991. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell* 3(1):49-59.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414(6863):562-565.
- Woo SL, Donzelli B, Scala F, Mach R, Harman GE, Kubicek CP, Del Sorbo G, Lorito M. 1999. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma*

- harzianum* P1. Molecular Plant-Microbe Interactions 12(5):419-429.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol 65(3):1061-1070.
- Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiology and Biochemistry 38(11):863-873.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Appl Environ Microbiol 69(12):7343-7353.
- Zhang W, Han DY, Dick WA, Davis KR, Hoitink HAJ. 1998. Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and Arabidopsis. Phytopathology 88(5):450-455.
- Zimand G, Elad Y, Chet I. 1996. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology 86(11):1255-1260.



## **4. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ**



## 4. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 Reducció de la malaltia foliar produïda per *Botrytis cinerea* en plantes de cogombre cultivades en substrats formulats a base de composts

Les plantes de cogombre cultivades en substrats de torba van mostrar un major grau de la malaltia produïda per *B. cinerea* a mesura que progressava el bioassaig que en aquelles cultivades en substrats formulats a base de compost. A més a més, la incidència de la malaltia ens va permetre definir dos grups dins dels composts: els més supressius (procedents de residus de la indústria del suro, de l'oli i de residus del cultiu de xampinyó) i aquells que a vegades no diferien de les torbes (procedents de brossa orgànica de recollida selectiva amb restes de poda urbanes i residus de la indústria de les begudes alcohòliques). Aquests resultats donen suport a l'assumpció de què l'ús de certs composts com a substrat de cultiu redueix la intensitat de les malalties que es produeixen a les parts aèries de les plantes com a conseqüència de l'atac de patògens foliars (Abbasi et al., 2002; Miller et al., 1997; Tränkner, 1992). Tanmateix, en Krause et al. (2003) van informar que la supressió de la malaltia foliar produïda per *Xanthomonas campestris* en rave mitjançant l'ús de substrats a base de composts era un fenomen rar: dels 79 composts que van assajar només un va ser capaç de reduir la gravetat de les lesions. Per contra, tots cinc composts assajats en el nostre estudi van reduir la malaltia en comparació amb les torbes. L'efecte supressiu d'un substrat format amb un 10% de compost de fems de vaca davant de *B. cinerea* s'havia descrit amb anterioritat malgrat que no s'estudiaren els mecanismes relacionats amb la supressió (Horst et al., 2005).

### 4.2 Mecanismes implicats en la supressivitat dels composts

Els nostres resultats mostren que l'estat nutricional de les fulles de cogombre està relacionat amb la gravetat de la podridura gris produïda per *B. cinerea*. El contingut de Ca, Mo i Si a les fulles va presentar correlacions negatives amb el grau de malaltia. La implicació del Ca en la resistència a malalties ha estat àmpliament estudiat, alguns exemples es descriuen a continuació. D'acord amb Wojcik i Lewandowski (2003), el tractament foliar amb  $\text{CaCl}_2$  va portar a l'augment de Ca a les fulles i va ser efectiu contra la *Botrytis* en el fruit i les fulles de maduixera. A més a més, l'Elad et al. (1993), van informar que la incidència de la malaltia es

reduïa al 50% quan s'aplicaven suplementes de Ca al substrats de cultiu. Els ions de Ca són claus en la producció d'àcid salicílic que és un senyal relacionat amb la resistència sistèmica adquirida (Schneidermuller et al., 1994). Els ions de Ca també es troben implicats en la producció de cal·losa (Trillas et al., 2000) i fitoalexines (Vogeli et al., 1992). Aquests ions a la vegada actuen com a elements connectors entre molècules de pectina, cosa que pot conduir a un reforç de la paret cel·lular (Carpita i McCann, 2000). Diversos informes han associat el Mo amb la resistència de les malalties a les plantes (de Jesus et al., 2004; Graham, 1983). Tot i així, la manera en què el Mo afecta la protecció de la planta roman velada. Del Mo es coneix, però, que és requerit pel metabolisme del N (Marschner, 1995). La correlació negativa entre el Si foliar i el grau de la malaltia es podria relacionar amb la deposició de Si a la superfície de les parets cel·lulars, tot reforçant-les (Epstein, 1999). D'altra banda, Fawe et al. (1998) van descriure que el tractament de les plantes de cogombre amb Si conduïa a la producció de fitoalexines després de la inoculació amb *Sphaerotheca fuliginia* i proposaven que es tractava d'un fenomen relacionat amb la resistència sistèmica adquirida. Malgrat que en el nostre estudi es van observar diferències significatives en l'estat nutricional de les fulles de cogombre segons el tractament, la major part dels elements es trobaven dins dels nivells òptims (Fox i Valenzuela, 1992), amb l'excepció del K i del Ca que a les plantes cultivades en les torbes es trobaven per sota dels nivells òptims, tot i que aquests substrats s'havien esmenat amb  $4 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ . Diversos estudis parlen de la importància d'elements específics en la incidència de malalties. Tanmateix, la millora de l'estat nutricional de les plantes per part dels composts s'omet en els estudis de supressió de malalties.

Malgrat tot, no està clar si l'activació dels mecanismes que condueixen a la supressió està relacionada amb una millora de la nutrició de la planta (Murray i Walters, 1992) o un estrès produït per les sals minerals (Mucharromah i Kuc, 1991). Basant-nos en els nivells proposats per Warncke i Krauskopf (1983), els nostres resultats de conductivitat elèctrica mostren que els substrats de torba tenien un nivell de sals molt baix, els composts procedents de residus de la indústria de l'alcohol i del suro tenien nivells òptims de sals, i el contingut de sals dels composts procedents de residus de la indústria de l'oli, de brossa orgànica de recollida selectiva amb restes de poda urbanes i de residus del cultiu de xampinyó eren lleugerament alt, alt i greument alt, respectivament. Malgrat tot, les plantes de tots els tractaments semblaven sanes i no es va

observar cap marçiment o cremada marginal a les fulles. La conductivitat elèctrica va correlacionar-se negativament amb la gravetat de la malaltia. Aquests resultats suggereixen que un nivell baix d'un estrès persistent pot conduir a un estat de resistència induïda, tal com van proposar Mucharromah i Kuc (1991).

La correlació negativa entre l'activitat microbiològica dels substrats i la gravetat de la malaltia suggereix que els microorganismes dels substrats participen en el procés que condueix a una reducció d'aquesta malaltia foliar, tal com van proposar Krause et al. (2003) per *X. campestris* en rave.

#### **4.3 Optimització d'un mètode per quantificar SA i JA de manera simultània en extractes vegetals**

D'entre les diverses condicions cromatogràfiques provades, el pH àcid (gradient de 0.05% àcid acètic en aigua/acetonitril) i l'ús d'una columna Discovery C<sub>18</sub> 150x201 mm, 5µm (Supelco, Bellefonte, EEUU) van donar els millors resultats en termes de sensibilitat i forma dels pics. Els temps de retenció en aquestes condicions foren 4.0 minuts per l'SA i 6.6 pel JA. Aquestes condicions permeteren la injecció d'un gran nombre de mostres en un temps curts (fins a 100 mostres diàries). Els límits de detecció basats en una relació senyal-soroll de 3:1 foren 0.45 i 0.47 ng g<sup>-1</sup> per l'SA i el JA, respectivament. Aquest mètode presenta un límit de detecció per l'SA millor que l'obtingut per Meuwly i Metraux (1993) en fulles de cogombre, que fou de 4ng g<sup>-1</sup> pes fresc, i un límit de detecció lleugerament més bo pel JA que l'obtingut per Rakwal et al. (2002), que fou d'1 pg.

#### **4.4 Efecte de la inoculació del substrat de cultiu amb *Rhizoctonia solani* o *Trichoderma asperellum* T34 sobre els nivells d'SA i JA de les plantes de cogombre**

La incidència de la malaltia provocada per *R. solani* set dies després de la sembra fou del 100% en les plantes de cogombre inoculades amb el patogen (tractament Rs) i del 0% en les plantes del tractament control i del tractament inoculat amb 10<sup>5</sup> unitats formadores de colònies per ml de la soca T34 de *T. asperellum* (tractament T34). Els cotilèdons de les plantes de cogombre malaltes (tractament Rs) mostraren nivells endògens superiors d'SA i JA (fins a 2 i 13 vegades superiors, respectivament) que les plantes sanes (control i T34) 72 hores després

de la sembra. De manera similar, les rels de les plantes malaltes mostraren nivells endògens superiors d'SA i JA (fins a 2 i 2.5 vegades superiors, respectivament) que les plantes sanes 72 hores després de la sembra. Els resultats mostren un increment d'SA i JA local (rels) i sistèmic (cotilèdons) en les plantes malaltes. L'increment de l'SA en plantes després de l'atac d'un patogen ha estat àmpliament descrit (Molders et al., 1996; Coquoz et al., 1995; Malamy et al., 1990; Metraux et al., 1990). L'augment local i sistèmic del JA en aràbidopsis després de la inoculació amb *Alternaria brassicola* també ha estat descrit (Penninckx et al., 1996). El fet que els increments de JA trobats als cotilèdons fossin superiors als d'SA, suggereix una major implicació d'aquella hormona en el moment de l'estudi d'aquesta interacció planta-patogen. Aquesta observació és consistent amb el fet que la resistència basal contra els patògens necròtrofs es basa en mecanismes dependents del JA (Thomma et al., 1998), mentre que la defensa basal contra biòtrofs o hemibiòtrofs es basa en mecanismes dependents de l'SA (Kachroo et al., 2000; Delaney et al., 1994). El fet que 72 hores després de la sembra els nivells d'SA no augmentessin en les plantes inoculades amb T34 està d'acord amb un altre estudi en què es va estudiar la concentració d'aquesta hormona entre 0 i 96 hores després de la inoculació amb  $10^5$  unitats formadores de colònies per ml de la soca T203 també de *T. asperellum* (Shoresh et al., 2005). Tanmateix, en l'article citat els autors demostren de manera indirecta que el JA té un paper en la inducció de resistència per part de T203, mentre que en el nostre treball no es va observar cap augment de JA com a conseqüència de l'aplicació de T34 en el moment estudiat, de manera similar al que es descriu a l'apartat 4.6.

#### **4.5 Inducció de resistència sistèmica en planta de cogombre mitjançant altes concentracions de *Trichoderma asperellum* soca T34**

La soca T34 de *T. asperellum* aplicada a les rels a una concentració de  $10^7$  conidis per ml fou capaç de reduir la proliferació del patogen foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* als cotilèdons de cogombre, indicant que s'havia produït inducció de resistència sistèmica. La inducció de resistència sistèmica per part de soques de *T. virens*, *T. asperellum*, *T. harzianum* i *T. atroviride* ha estat descrita amb anterioritat en diverses espècies de plantes contra patògens com *P. syringae* pv. *lachrymans*, *B. cinerea*, *X. campestris* i *A. solani*, entre d'altres (Harman et al., 2004a). A aquesta concentració, el tractament amb *T. asperellum* soca T34 també va

provocar increments en els nivells d'SA i JA, en l'activitat peroxidasa i va afectar l'expressió de diverses proteïnes (vegeu apartats 4.6 i 4.7).

#### **4.6 Efecte de la inoculació amb diverses concentracions de *Trichoderma asperellum* soca T34 en l'activitat peroxidasa i els nivells d'SA i JA de les plantes de cogombre**

L'activitat peroxidasa als cotilèdons de les plantes de cogombre tractades amb T34 a  $10^5$  conidis per ml (tractament  $10^5$ ) no va ser diferent del control. L'activitat peroxidasa en el tractament de  $10^6$  va augmentar significativament passades 12 h i va augmentar gradualment fins assolir un màxim passades 48 hores després de la interacció amb T34, en comparació amb el tractament control i  $10^5$ . L'activitat peroxidasa al tractament  $10^7$  va augmentar significativament 6 hores després de la interacció en comparació amb la resta dels tractaments i va assolir el seu màxim a les 12 hores. A les 48 hores no hi havia diferència entre els tractaments  $10^6$  i  $10^7$ . La concentració d'SA als cotilèdons del tractament  $10^5$  no va ser diferent del control al llarg del període estudiat. La concentració d'SA al tractament  $10^6$  fou significativament superior a les 24 hores i encara més alt a les 48 hores després de la interacció amb T34 que la resta de tractaments. La concentració d'SA al tractament  $10^7$  va augmentar de forma significativa 3 hores després de la interacció assolint una concentració 20 vegades superior a la del control i retornant als nivells basals a les 24 hores. La concentració de JA als cotilèdons dels tractaments  $10^5$  i  $10^6$  no va ser diferent del control. La concentració de JA al tractament  $10^7$  va augmentar significativament 1 hora després de la interacció assolint una concentració 6 vegades més alta que la del control i va retornar als nivells basals a les 6 hores.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que el T34 afecta el metabolisme de la planta de forma depenent de la concentració. A concentracions baixes ( $10^5$  conidis per ml) no hi ha efectes sobre la concentració d'hormones (SA i JA) o l'activitat peroxidasa, cosa que és consistent amb la típica ISR que es produeix en cas de la colonització de les rels per part de rizobacteris no patogènics (Van Loon et al., 1998). Tanmateix, aquest no és el cas de la soca T203 de *T. asperellum*, que indueix un augment transitori de l'activitat i l'expressió del gen de la peroxidasa a les fulles 72 i 48 hores, respectivament, després de la inoculació de *Trichoderma* a  $10^5$  conidis per ml (Shoresh et al., 2005; Yedidia et al., 1999). De manera similar a T34, no es

van observar increments d'SA a les fulles quan el T203 es va inocular a aquesta concentració (Shoresh et al., 2005). En el nostre estudi vam observar que quan T34 s'aplicava a mitges i altes concentracions ( $10^6$  i  $10^7$  conidis per ml) es produïa una resposta de tipus resistència sistèmica adquirida (SAR) amb el típic augment d'SA i activitat peroxidasa. Anàlogament al pic de JA observat en les primeres hores de contacte amb T34, es coneix que els nivells de JA augmenten ràpidament i de manera transitòria en resposta al tractament amb elicitors (Rakwal et al., 2002; Creelman i Mullet, 1997), però d'una manera més lenta i sostinguda després de la colonització per fongs micorízics (Hause et al., 2002).

#### **4.7 Efecte de la inoculació de les rels amb una alta concentració de *Trichoderma asperellum* soca T34 en el proteoma dels cotilèdons de planta de cogombre**

L'ús de l'electroforesi bidimensional i l'espectrometria de masses ens van permetre analitzar els canvis en el proteoma de les plantes inoculades amb T34 a alta concentració ( $10^7$  conidis per ml). De les 28 proteïnes identificades, 17 es van trobar regulades a l'alça i 11 regulades a la baixa en les plantes tractades amb T34 en comparació amb les plantes control. Les proteïnes identificades es van classificar en quatre grups segons s'havia descrit anteriorment: proteïnes de defensa i relacionades amb la malaltia, d'energia i metabolisme, del metabolisme secundari i de síntesi i plegament de proteïnes (Bevan et al., 1998).

##### **4.7.1 Proteïnes de defensa i relacionades amb la malaltia**

De les proteïnes expressades de forma diferencial en aquest grup, la peroxidasa és la més induïda (30 vegades) per la inoculació amb T34 en comparació amb els controls. Això està d'acord amb l'increment de l'activitat peroxidasa observat als cotilèdons de plantes tractades amb  $10^7$  conidis  $\text{ml}^{-1}$  de T34 en comparació amb els controls (apartat 4.6). L'expressió de diversos enzims que actuen eliminant les espècies reactives d'oxigen induïdes tant en estressos biòtics com els abiòtics es va veure afectada per la inoculació amb T34. L'1-aminociclopropà-1-carboxilat oxidasa es va trobar regulada a l'alça a les plantes tractades amb T34 i està involucrada en la síntesi d'ET des d'1-aminociclopropà-1-carboxilat. En molts casos, la infecció per microorganismes patògens porta a l'augment de la producció d'aquesta hormona i de l'expressió d'una gran llista de gens relacionats amb la defensa (Schenk et al., 2000). La



proteïna de xoc tèrmic (*heat shock protein*, HSP) 70 també es va trobar regulada a l'alça. Les HSP són xaperones que participen en el plegament i muntatge de les proteïnes immadures, faciliten el transport i la degradació de les proteïnes danyades, i prevenen l'agregació de proteïnes desnaturalitzades per la calor o altres processos desnaturalitzants (Feder i Hofmann, 1999).

#### **4.7.2 Proteïnes d'energia i metabolisme, metabolisme secundari i síntesi i plegament de proteïnes**

El tractament amb T34 va afectar l'expressió de proteïnes involucrades en la fotorespiració, el metabolisme del nitrogen, el manteniment de la reserva d'hexoses fosfat, la síntesi d'àcids grassos, el metabolisme del malat, la glucòlisi, la síntesi d'ATP, el transport electrònic i la regulació de la rubisco.

La 1-desoxixil·lulosa 5-fosfat reductoisomerasa es trobava regulada a l'alça a les plantes tractades amb T34. Aquest enzim està implicat en la biosíntesi de isopentenil difosfat independent de mevalonat, que és la unitat fonamental en la síntesi d'isoprenoids. La ruta de síntesi d'isoprenoids és induïble per jasmonats (Suzuki et al., 2002). Malgrat que la majoria d'isoprenoids es relaciona amb la defensa de la planta, els nivells del transcrit d'aquest enzim s'han trobat augmentats a les rels colonitzades per fong micorízics beneficiosos (Strack i Fester, 2006).

El factor Tu d'elongació de la transcripció i la ciclofilina es van trobar regulades a la baixa a les plantes tractes amb T34.

#### **4.8 Inducció de resistència sistèmica en arabidopsis mitjançant *Trichoderma asperellum* soca T34**

L'aplicació de *T. asperellum* soca T34 a les rels de plantes d'arabidopsis a una concentració de  $10^5$  conidis per ml va fer que les fulles de les plantes fossin més resistents al patògen bacterià *P. syringae* pv. *tomato*, a l'oomicet biòtrof *Hyaloperonospora parasitica* i al fong necròtrof *Plectosphaerella cucumerina*. Bigirimana et al. (1997) van demostrar que tractar el sòl amb *T. harzianum* soca T39 feia les fulles de mongetera més resistents als atacs de *B. cinerea* i *Colletotrichum lindemuthianum*, encara que T39 era present només a les rels i no al fullatge.

Des de llavors s'ha demostrat que diversos *Trichoderma* spp. indueixen resistència local i/o sistèmica en plantes com cotó, cogombre i blat de moro (Harman et al., 2004b; Yedidia et al., 2003; Howell et al., 2000). Actualment els mecanismes d'inducció de resistència per part de *Trichoderma* només es coneixen de manera parcial. A més del requeriment funcional d'una proteïna MAPK (Shoresh et al., 2006), s'ha suggerit que les hormones JA i ET estan involucrades en la inducció de la defensa sistèmica per part de *T. asperellum* T203 contra *P. syringae* pv. *lachrymans* en cogombre ja que quan la síntesi de JA o ET era inhibida, la inducció de resistència per part de T203 es perdia (Shoresh et al., 2005). La capacitat de les plantes de respondre a aquestes hormones també és necessària per la ISR induïda per rizobacteris (Pieterse et al., 2000). El pretractament d'arabidopsis amb el rizobacteri inductor d'ISR *P. fluorescens* WCS417r condiciona la planta a tenir una expressió potenciada de gens regulats per JA i ET, malgrat que el nivell d'aquestes hormones no es troba alterat (Verhagen et al., 2004; Pieterse et al., 2000). Tampoc s'han trobat canvis en els nivells d'SA i JA en tractar plantes de cogombre amb  $10^5$  conidis per ml de T34 (vegeu apartats 4.4 i 4.6).

#### **4.9 Estudi de les vies de senyalització de la resistència sistèmica induïda per *Trichoderma asperellum* soca T34 mitjançant mutants d'arabidopsis**

El pretractament amb T34 va augmentar la resistència contra *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 de les plantes *sid2* al mateix nivell que les salvatges Col-0, demostrant que la producció d'SA no juga un paper en la inducció de resistència per part de *Trichoderma*. Les plantes mutants *sid2* han perdut la capacitat de desenvolupar SAR (Nawrath i Metraux, 1999), mentre que la ISR induïda per rizobacteris hi és operativa (Ton et al., 2002). En canvi, les plantes *npr1*, incapaces d'expressar SAR o ISR, no van mostrar un augment de la resistència. D'altra banda, vam demostrar que cal que la proteïna MYB72 sigui funcional perquè es pugui activar la resistència contra *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 induïda per *Trichoderma*. El gen d'aquest factor de transcripció és un dels 90 gens l'expressió del qual es troba augmentada localment per la colonització de les rels per part de l'inductor d'ISR *P. fluorescens* WCS417r (Verhagen et al., 2004). L'activació transcripcional d'aquest gen és necessària per la generació d'ISR en arabidopsis tal com es dedueix del treball amb els mutants *myb72* (Sjoerd van der Ent,

Universitat d'Utrecht, Països Baixos, comunicació personal). Aquest mutants no es troben impeditos per desenvolupar SAR induïda químicament o biològica.

#### **4.10 El *priming* en la inducció de resistència sistèmica per *Trichoderma asperellum* soca T34**

El pretractament amb T34 va resultar en un major percentatge d'espores en germinació d' *H. parasitica* bloquejades per la formació de dipòsits de cal·losa. La generació de resistència sistèmica no sempre requereix una inducció directa dels mecanismes de defensa en el moment de percepció de la senyal inductora. Hi ha nombrosos exemples que mostren que, en el cas de la inducció de resistència sistèmica, les respostes de defensa es troben condicionades a activar-se més ràpidament i forta en el moment de l'atac (Conrath et al., 2006). Aquest fenomen anomenat *priming* és el que es troba en la ISR induïda per rizobacteris. Per exemple, la colonització de les rels d'arabidopsis per *P. fluorescens* WCS417r no condueix a la formació de dipòsits de cal·losa fins el moment de l'atac del patogen (Sjoerd van der Ent, Universitat d'Utrecht, Països Baixos, comunicació personal).

L'expressió del gen *LOX2* desencadenada pel tractament amb metil-JA també va ser potenciada en les plantes que havien estat tractades amb T34 comparades amb les control. El *priming* de gens que responen a JA, com el *LOX2*, és típic de la ISR induïda per rizobacteris (Conrath et al., 2006; Verhagen et al., 2004). La colonització de les rels d'arabidopsis per *P. fluorescens* WCS417r no condueix a una reprogramació transcripcional de les parts aèries de la planta sinó que condiciona la planta a expressar gens de manera potenciada en el moment de la percepció de l'atac (van Wees et al., 1999). El *priming* de les respostes defensa s'ha demostrat en diversos rizobacteris, a més a més de WCS417r (Ahn et al., 2007; Jeun et al., 2004).

També s'ha proposat que el *priming* és la base de la inducció de resistència per part d'altres fongs del gènere *Trichoderma*. Les fulles de les plantes de cogombre cultivades en un substrat que contenia *T. hamatum* soca T382 no mostraren diferències en l'activitat  $\beta$ -1,3-glucanasa en comparació amb els controls, però després de l'atac de *C. orbiculare*, aquesta activitat fou superior en les que havien crescut en el substrat que contenia T382 (Zhang et al., 1998). En el cas del tractament de les rels de les plantes de cogombre amb *T. asperellum* soca T203 es van

observar tant efectes directes com efectes de *priming* (Shoresh et al., 2005). En contrast amb la típica ISR, es va observar que les activitats peroxidasa i quitinasa i els mRNA corresponents es trobaven augmentats de forma transitòria, localment i sistèmica (i la  $\beta$ -1,3-glucanasa localment), després d'inocular les rels amb T203 en absència de patogen (Shoresh et al., 2005; Yedidia et al., 2000; Yedidia et al., 1999). Aquest efecte directe no es va observar quan les plantes de cogombre es van tractar amb T34 a la mateixa dosi ( $10^5$  conidis per ml), malgrat que sí que es van observar augments de l'activitat peroxidasa en tractar les plantes amb concentracions elevades de T34 ( $10^6$  i  $10^7$  conidis per ml) (apartat 4.6). En el cas de T203, a més de l'esmentat efecte directe, es va observar *priming* en l'expressió potenciada dels gens de la peroxidasa, quitinasa i  $\beta$ -1,3-glucanasa (Shoresh et al., 2005).

En conjunt, els resultats indiquen que la via de senyalització per la que s'estableix la resistència sistèmica induïda per *Trichoderma* és similar a la ISR activada pel rizobacteri *P. fluorescens* WCS417r i que condueix al *priming* de respostes de defensa similars.

#### 4.11 Síntesi dels mecanismes d'inducció de resistència sistèmica per *Trichoderma asperellum* soca T34

A continuació es presenta, en forma de taula, un resum dels resultats obtinguts en la inducció de resistència sistèmica per *Trichoderma asperellum* soca T34 contra diversos patògens foliaris on es pot observar l'estudi dels nivells d'hormones SA i JA, l'efecte sobre el proteoma, l'activitat peroxidasa, la inducció de *priming*, la via de senyalització que es desprèn del treball amb plantes mutants i la similitud amb tipus de resistència sistèmica coneguts en funció de la concentració de T34 aplicada a les rels.

Tractament amb <i>T. asperellum</i> soca T34	Inducció de resistència sistèmica	Hormones (SA i JA)	Proteïnes	Activitat peroxidasa	<i>Priming</i>	Via de senyalització	Tipus de resistència sistèmica
<b>10<sup>5</sup> conidis per ml</b>	Efectiva contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Hyaloperonospora parasitica</i> i <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	No hi ha efecte	No s'ha estudiat	No hi ha efecte	Potenciació de l'expressió del gen <i>LOX2</i> i del dipòsit de cal·losa després de l'atac del patogen	Necessita les proteïnes NPR1 i MYB72. Independent d' SA	<b>Similar a ISR</b>
<b>10<sup>6</sup> conidis per ml</b>	No s'ha estudiat	Augment d' SA	No s'ha estudiat	Augment	No s'ha estudiat	No s'ha estudiat	
<b>10<sup>7</sup> conidis per ml</b>	Efectiva contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	Augment d' SA i JA	Efecte directe en l'expressió de proteïnes	Augment	No s'ha estudiat	No s'ha estudiat	<b>Similar a SAR</b>



## **5. CONCLUSIONS**





## 5. CONCLUSIONS

1. Els cinc composts estudiats (procedents de brossa orgànica de recollida selectiva amb restes de poda urbanes, de residus de la indústria de les begudes alcohòliques, de l'oli i del suro, així com de residus del cultiu de xampinyó), emprats com a substrat de cultiu van ser capaços de reduir la malaltia produïda a les fulles de cogombre (*Cucumis sativus*) pel patogen *Botrytis cinerea* en comparació amb les plantes cultivades en torba, essent els tres darrers composts els més supressius.

2. La notable reducció de la malaltia produïda per *B. cinerea* en plantes de cogombre cultivades en els composts es va relacionar amb el subministre d'elements químics específics (Ca, Mo i Si) i cert grau d'estrès salí a la planta i amb l'alta activitat microbiològica dels composts.

3. El mètode basat en la cromatografia líquida acoblada a la detecció per espectrometria de masses, desenvolupat per quantificar de manera simultània l'àcid salicílic i l'àcid jasmònic d'extractes crus de plantes de cogombre, és a la vegada ràpid, altament sensible i evita qualsevol pas de purificació o derivatització.

4. *Trichoderma asperellum* soca T34 aplicat a les rels afecta el metabolisme (àcid salicílic, àcid jasmònic i activitat peroxidasa) dels cotilèdons de les plantes de cogombre de forma dependent de la concentració.

5. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a concentracions de  $10^5$  conidis per ml no té efectes sobre la concentració de les hormones àcid salicílic i àcid jasmònic o l'activitat peroxidasa als cotilèdons de planta de cogombre.

6. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a  $10^5$  conidis per ml indueix una resistència sistèmica en aràbidopsis que es basa en el *priming* i comparteix la mateixa via de senyalització que la resistència sistèmica induïda (ISR) produïda per rizobacteris.

7. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a  $10^5$  conidis per ml indueix una resistència sistèmica contra els patògens foliars *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Plectosphaerella cucumerina* i *Hyaloperonospora parasitica* en aràbidopsis similar a la ISR.

8. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a concentracions de  $10^6$  i  $10^7$  conidis per ml produeix una resposta de tipus resistència sistèmica adquirida (SAR) amb el típic augment d'àcid salicílic i activitat peroxidasa als cotilèdons de planta de cogombre.

9. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a una concentració de  $10^7$  conidis per ml provoca canvis en el proteoma dels cotilèdons de les plantes de cogombre; concretament, en l'expressió d'un conjunt de proteïnes orientades a la defensa que poden protegir la planta de forma directa o situar el metabolisme de la planta en un estat defensiu no assimilatori.

10. *T. asperellum* soca T34 aplicat a les rels a una concentració de  $10^7$  conidis per ml és capaç de reduir la proliferació del patògen foliar *P. syringae* pv. *lachrymans* als cotilèdons de cogombre a través de la inducció d'una resistència sistèmica similar a la SAR.

**6. BIBLIOGRAFIA**  
**(de la Introducció i del Resum**  
**dels resultats i discussió)**



**6. BIBLIOGRAFIA (de la Introducció i del Resum dels resultats i discussió)**

- Abawi G S i Widmer T L (2000) Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. *Applied Soil Ecology* 15: 37-47.
- Abbasi P A, Al-Dahmani J, Sahin F, Hoitink H A J i Miller S A (2002) Effect of compost amendments on disease severity and yield of tomato in conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86: 156-161.
- Agrios G N (1997) *Plant pathology*. Academic Press, San Diego.
- Ahn I P, Lee S W i Suh S C (2007) Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 759-768.
- Altman J i Rovira A (1989) Herbicide-pathogen interactions in soil-borne root diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* 11: 166-172.
- Aryantha I P, Cross R i Guest D I (2000) Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. *Phytopathology* 90: 775-782.
- Baker K F i Snyder W C (1965) *Ecology of soil-borne plant pathogens: Prelude to biological control*. University of California Press, Berkeley.
- Baker K F i Cook R J (1974) Biological control of plant pathogens. En: A Kelman i L Sequeira (ed.) *The biology of plant pathogens* (pp 280-285) W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Benitez T, Rincon A M, Limon M C i Codon A C (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C et al. (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 391: 485-488.
- Bigirimana J, De Meyer G, Poppe J, Elad Y i Hofte M (1997) Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* 62: 1001-1007.
- Borrero C, Trillas M I, Ordovas J, Tello J C i Aviles M (2004) Predictive factors for the suppression of fusarium wilt of tomato in plant growth media. *Phytopathology* 94: 1094-1101.
- Brimner T A i Boland G J (2003) A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100: 3-16.
- Bull D (1982) *A growing problem. Pesticides and the third world poor*. Oxfam, Oxford.
- Cameron R K, Paiva N L, Lamb C i Dixon R A (1999) Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 121-130.
- Cao H, Bowling S A, Gordon A S i Dong X (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired-resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592.

- Carpita N i McCann M (2000) The cell wall. En: B Buchanan, W Gruissem i R Jones (ed.) Biochemistry and molecular biology of plants (pp 52-108) American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Carson R (1962) Silent spring. Houghton Mifflin, Boston.
- Chang Y i Hudson H (1967) Fungi of wheat straw compost .I. Ecological Studies. Transactions of the British Mycological Society 50: 649-666.
- Conrath U, Beckers G J M, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F et al. (2006) Priming: Getting ready for battle. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 1062-1071.
- Cook J i Baker K F (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, Saint Paul.
- Cook J, Bruckart W L, Coulson J R, Goettel M S, Humber R A, Lumsden R D et al. (1996) Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: A framework for scientific evaluation. Biological control 7: 333-351.
- Coquoz J L, Buchala A J, Meuwly P i Metraux J P (1995) Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. Phytopathology 85: 1219-1224.
- Cordier C, Pozo M J, Barea J M, Gianinazzi S i Gianinazzi-Pearson V (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 1017-1028.
- Coscollá R (2004) Introducción a la protección integrada. Phytoma-España, València.
- Cotxarrera L, Trillas-Gay M I, Steinberg C i Alabouvette C (2002) Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress fusarium wilt of tomato. Soil Biology & Biochemistry 34: 467-476.
- Creelman R A i Mullet J E (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355-381.
- De Ceuster T J J i Hoitink H A J (1999) Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases. Compost Science & Utilization 7: 6-15.
- de Jesus W C, Vale F X R, Coelho R R, Hau B, Zambolim L i Berger R D (2004) Management of angular leaf spot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with molybdenum and fungicide. Agronomy Journal 96: 665-670.
- De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y i Höfte M (1998) Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104: 279-286.
- Debertoldi M, Vallini G, Pera A i Zucconi F (1982) Comparison of 3 windrow compost systems. Biocycle 23: 45-&.
- Delaney T P, Friedrich L i Ryals J A (1995) Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 6602-6606.
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D et al. (1994) A central role of salicylic acid in plant-disease resistance. Science 266: 1247-1250.

- Druzhinina I, Kopchinskiy A i Kubicek C (2006) The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Durrant W E i Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185-209.
- Eilenberg J, Enkegaard A, Vestergaard S i Jensen B (2000) Biocontrol of pests on plant crops in Denmark: Present status and future potential. *Biocontrol Science and Technology* 10: 703-716.
- Elad Y, Yunis H i Volpin H (1993) Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant, and pepper crops to *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* 71: 602-608.
- Epstein E (1999) Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 641-664.
- Fawe A, bou-Zaid M, Menzies J G i Belanger R R (1998) Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* 88: 396-401.
- Feder M E i Hofmann G E (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243-282.
- Fox R L i Valenzuela H (1992) Vegetables grown under tropical/subtropical conditions. En: W Wichmann (ed.) IFA World fertilizer manual (pp 293-337) International Fertilizer Industry Association, Paris.
- Fravel D, Olivain C i Alabouvette C (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.
- Graham R D (1983) Effect of nutrient stress on susceptibility of plants to diseases with particular reference to the trace elements. *Advances in botanical research* 10: 221-276.
- Harman G E, Howell C R, Viterbo A, Chet I i Lorito M (2004a) *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Harman G E i Kubicek C P (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2. Taylor and Francis, London.
- Harman G E, Petzoldt R, Comis A i Chen J (2004b) Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147-153.
- Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R i Strack D (2002) Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130: 1213-1220.
- Heil M (2002) Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 345-350.
- Hoitink H, Stone A i Han D (1997) Suppression of plant diseases by composts. *Hortscience* 32: 184-187.
- Hoitink H A J i Boehm M J (1999) Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446.
- Hoitink H A J, Schmitthener A F i Herr L J (1975) Composted bark for control of root rot in ornamentals. *Ohio reports* 60: 25-26.

- Horst L E, Locke J, Krause C R, McMahon R W, Madden L V i Hoitink H A J (2005) Suppression of botrytis blight of begonia by *Trichoderma hamatum* 382 in peat and compost-amended potting mixes. *Plant Disease* 89: 1195-1200.
- Howell C R (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10.
- Howell C R, Hanson L E, Stipanovic R D i Puckhaber L S (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.
- Jeun Y C, Park K S, Kim C H, Fowler W D i Kloepper J W (2004) Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological control* 29: 34-42.
- Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner H K i Klessig D F (2000) Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12: 677-690.
- Kauss H, Theisingerhinkel E, Mindermann R i Conrath U (1992) Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired-resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. *Plant Journal* 2: 655-660.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E et al. (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32: 439-459.
- Khan J, Ooka J J, Miller S A, Madden L V i Hoitink H A J (2004) Systemic resistance induced by *Trichoderma hamatum* 382 in cucumber against phytophthora crown rot and leaf blight. *Plant Disease* 88: 280-286.
- Knoester M, Pieterse C M J, Bol J F i Van Loon L C (1999) Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 720-727.
- Kohler A, Schwindling S i Conrath U (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology* 128: 1046-1056.
- Krause M S, De Ceuster T J J, Tiquia S M, Michel F C, Madden L V i Hoitink H A J (2003) Isolation and characterization of rhizobacteria from composts that suppress the severity of bacterial leaf spot of radish. *Phytopathology* 93: 1292-1300.
- Kuc J (1982) Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32: 854-860.
- Kuc J (1995) Systemic acquired resistance. *Aspects in Applied Biology* 42: 235-242.
- Kullnig C M, Krupica T, Woo S L, Mach R L, Rey M, Benitez T et al. (2001) Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* 105: 770-772.
- LaMondia J A, Gent M P N, Ferrandino F J, Elmer W H i Stoner K A (1999) Effect of compost amendment or straw mulch on potato early dying disease. *Plant Disease* 83: 361-366.
- Litterick A M, Harrier L, Wallace P, Watson C A i Wood M (2004) The role of uncomposted materials, composts, manures, and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production - A review. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 453-479.



- Lodha S i Burman U (2000) Efficacy of composts on nitrogen fixation, dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) intensity and yield of legumes. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 70: 846-849.
- Loschinkohl C i Boehm M J (2001) Composted biosolids incorporation improves turfgrass establishment on disturbed urban soil and reduces leaf rust severity. *Hortscience* 36: 790-794.
- Lumsden R D, Lewis J A i Millner P D (1983) Effect of composted sewage-sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology* 73: 1543-1548.
- Malamy J, Carr J P, Klessig D F i Raskin I (1990) Salicylic acid - A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Mandelbaum R i Hadar Y (1990) Effects of available carbon source on microbial activity and suppression of *Pythium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology* 80: 794-804.
- Marois J J, Mitchell D J i Sonoda R M (1981) Biological control of fusarium crown rot of tomato *Lycopersicon esculentum* under field conditions. *Phytopathology* 71: 1257-1260.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, UK. pp. 379.
- Metraux J P, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyssbenz M, Gaudin J et al. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Meuwly P i Metraux J P (1993) Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *analytical biochemistry* 214: 500-505.
- Migheli Q (2001) Genetically modified biocontrol agents: Environmental impact and risk analysis. *Journal of Plant Pathology* 83: 47-56.
- Miller S A, Sahin F, Krause M S, Al-Dahmani J, Stone A i Hoitink H A J (1997) Control of bacterial leaf spot of radish in compost-amended planting mixes. *Phytopathology* 87: S66.
- Mills D J, Coffman C B, Teasdale J R, Everts K L i Anderson J D (2002) Factors associated with foliar disease of staked fresh market tomatoes grown under differing bed strategies. *Plant Disease* 86: 356-361.
- Molders W, Buchala A i Metraux J P (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiology* 112: 787-792.
- Mucharromah E i Kuc J (1991) Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. *Crop Protection* 10: 265-270.
- Murray D C i Walters D R (1992) Increased photosynthesis and resistance to rust infection in upper, uninfected leaves of rusted broad bean (*Vicia faba* L). *New Phytologist* 120: 235-242.
- Nawrath C i Metraux J P (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11: 1393-1404.
- Nelson E B (1990) Exudate molecules initiating fungal responses to seeds and roots. *Plant and Soil* 129: 61-74.

- Nelson E B, Kuter G A i Hoitink H A J (1983) Effect of compost maturity on the induction of suppression to rhizoctonia damping-off of radish by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 73: 822.
- Paulitz T C i Belanger R R (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.
- Penninckx I A M A, Eggermont K, Terras F R G, Thomma B P H J, DeSamblanx G W, Buchala A et al. (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8: 2309-2323.
- Pieterse C M J, van Pelt J A, Ton J, Parchmann S, Mueller M J, Buchala A J et al. (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 123-134.
- Pieterse C M J, van Wees S C M, Ton J, van Pelt J A i Van Loon L C (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 4: 535-544.
- Pieterse C M J, van Wees S C M, van Pelt J A, Knoester M, Laan R, Gerrits N et al. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580.
- Pieterse C M J, vanWees S C M, Hoffland E, vanPelt J A i vanLoon L C (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* 8: 1225-1237.
- Pimentel D (1985) Insect pest management. *Antenn* 9: 168-171.
- Pimentel D (1996) Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of the Total Environment* 188: S86-S98.
- Pozo M J, Van Loon L C i Pieterse C M J (2004) Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 211-222.
- Press C M, Loper J E i Kloepper J W (2001) Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. *Phytopathology* 91: 593-598.
- Rakwal R, Tamogami S, Agrawal G K i Iwahashi H (2002) Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295: 1041-1045.
- Reuveni R, Dor G, Raviv M, Reuveni M i Tuzun S (2000) Systemic resistance against *Sphaerotheca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protection* 19: 355-361.
- Roberts D P, Lohrke S M, Meyer S L F, Buyer J S, Bowers J H, Baker C J et al. (2005) Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. *Crop Protection* 24: 141-155.
- Ross A (1961) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.
- Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y i Hunt M D (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.

- Samuels G J, Lieckfeldt E i Nirenberg H I (1999) *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51: 71-88.
- Schenk P M, Kazan K, Wilson I, Anderson J P, Richmond T, Somerville S C et al. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 11655-11660.
- Schneidermuller S, Kurosaki F i Nishi A (1994) Role of salicylic acid and intracellular Ca<sup>2+</sup> in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 101-109.
- Schuler C, Pikny J, Nasir M i Vogtmann H (1993) Effects of composted organic kitchen and garden waste on *Mycosphaerella pinodes* (Berk and Blox) Vesterg, causal organism of foot rot on peas (*Pisum sativum* L). *Biological Agriculture & Horticulture* 9: 353-360.
- Shoresh M, Gal-On A, Leibman D i Chet I (2006) Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance. *Plant Physiology* 142: 1169-1179.
- Shoresh M, Yedidia I i Chet I (2005) Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95: 76-84.
- Stephens C T, Herr L J, Hoitink H A J i Schmitthenner A F (1981) Suppression of rhizoctonia damping-off by composted hardwood bark medium. *Plant Disease* 65: 796-797.
- Sticher L, MauchMani B i Metraux J P (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.
- Stone A G, Vallad G E, Cooperband L R, Rotenberg D, Darby H M, James R V et al. (2003) Effect of organic amendments on soilborne and foliar diseases in field-grown snap bean and cucumber. *Plant Disease* 87: 1037-1042.
- Strack D i Fester T (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist* 172: 22-34.
- Stracke R, Werber M i Weisshaar B (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda S P T i Dixon R A (2002) A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* 32: 1033-1048.
- Thomma B P H J, Eggermont K, Penninckx I A M A, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue B P A et al. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 15107-15111.
- Thulke O i Conrath U (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant Journal* 14: 35-42.
- Ton J, Davison S, van Wees S C, Van L L i Pieterse C M (2001) The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiology* 125: 652-661.
- Ton J, De Vos M, Robben C, Buchala A, Metraux J P, Van Loon L C et al. (2002) Characterization of *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant Journal* 29: 11-21.

- Tränkner A (1992) Use of agricultural and municipal organic wastes to develop suppressiveness to plant pathogens. En: E C Tjamos, G C Papavizas i R J Cook (ed.) Biological control of plant diseases (pp 35-42) Plenum Press, New York.
- Trillas I, Aviles M, Ordovas J, Bello A i Tello J C (2002) Using compost as a methyl bromide alternative. *Biocycle* 43: 64-68.
- Trillas I i Cotxarrera L Substrates containing a *Trichoderma asperellum* strain for biological control of *Fusarium* and *Rhizoctonia*. Patent WO 03/000866 A1. 2003.
- Trillas M I, Casanova E, Cotxarrera L, Ordovas J, Borrero C i Aviles M (2006) Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings. *Biological control* 39: 32-38.
- Trillas M I, Cotxarrera L, Casanova E i Cortadellas N (2000) Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 107-116.
- Trillas-Gay M I, Hoitink H A J i Madden L V (1986) Nature of suppression of fusarium wilt of radish in a container medium amended with composted hardwood bark. *Plant Disease* 70: 1023-1027.
- Tuitert G, Szczech M i Bollen G J (1998) Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made from organic household waste. *Phytopathology* 88: 764-773.
- van Hulten M, Pelser M, Van Loon L C, Pieterse C M J i Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5602-5607.
- Van Loon L C, Bakker P A H M i Pieterse C M J (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483.
- van Wees S C, Luijendijk M, Smoorenburg I, Van Loon L C i Pieterse C M (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology* 41: 537-549.
- van Wees S C, Pieterse C M, Trijssenaar A, Van 't Westende Y A, Hartog F i Van Loon L C (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 716-724.
- Verhagen B W M . Transcriptomics and knockout mutant analysis of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in *Arabidopsis*. 1-185. 2004. Utrecht, The Netherlands, Utrecht University.
- Verhagen B W M, Glazebrook J, Zhu T, Chang H S, Van Loon L C i Pieterse C M J (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 895-908.
- Vogeli U, Vogelilange R i Chappell J (1992) Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell suspension cultures by calcium calmodulin antagonists. *Plant Physiology* 100: 1369-1376.
- Ward E R, Uknes S J, Williams S C, Dincher S S, Wiederhold D L, Alexander D C et al. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired-resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094.

- Warncke D D i Krauskopf D M (1983) Greenhouse growth media: Testing and nutrition guidelines. Michigan State University Cooperative Extension Service Bulletin E-1736.
- WHO/UNEP (1989) Public health impact of pesticides used in agriculture. World Health Organization / United Nations Environment Programme, Geneva.
- Wildermuth M C, Dewdney J, Wu G i Ausubel F M (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Wojcik P i Lewandowski M (2003) Effect of calcium and boron sprays on yield and quality of "Elsanta" strawberry. *Journal of Plant Nutrition* 26: 671-682.
- Yedidia I, Benhamou N i Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.
- Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y i Chet I (2000) Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 863-873.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y i Chet I (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7343-7353.
- Zhang W, Dick W A i Hoitink H A J (1996) Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to pythium root rot and anthracnose. *Phytopathology* 86: 1066-1070.
- Zhang W, Han D Y, Dick W A, Davis K R i Hoitink H A J (1998) Compost and compost water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and Arabidopsis. *Phytopathology* 88: 450-455.





