

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



“Caracterización de genes de *Trichoderma* spp diferencialmente expresados durante la interacción con planta y su participación en la respuesta de defensa vegetal”

**Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias (Biología)**

Presenta:

M. C. Claudia Adriana Ramírez Valdespino

Asesor:

D. C. Vianey Olmedo Monfil

Guanajuato, Gto., Noviembre del 2017.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Guanajuato, Gto. 06 de octubre de 2017

Dr. Agustín Ramón Uribe Ramírez

Director de la División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato
Campus Guanajuato.

P R E S E N T E:

Por este medio, me permito hacer constar que el trabajo desarrollado por la **M. en C. CLAUDIA ADRIANA RAMÍREZ VALDESPINO**, para obtener el grado de Doctora en Ciencias (Biología) "*Caracterización de genes de Trichoderma spp diferencialmente expresados durante la interacción con planta y su participación en la respuesta de defensa vegetal*", es un trabajo original y realizado bajo los principios del método científico. El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Interacción Planta-Microorganismo, del Departamento de Biología de la DCNyE, Campus Guanajuato, de la Universidad de Guanajuato. El manuscrito describe los resultados obtenidos y se autoriza su impresión.

Sin otro tema adicional que tratar, me despedido de usted, agradeciendo la atención prestada y quedando a sus órdenes para cualquier aclaración.

A T E N T A M E N T E

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Vianey G. Olmedo Monfil".

Dra. Vianey G. Olmedo Monfil
Directora de Tesis

FINANCIAMIENTO:

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de la beca CB-1168612 otorgada a la D. C. Vianey Olmedo Monfil por el CONACyT, con el apoyo de la Universidad de Guanajuato convenios 527/2015, 768/2016 y CIFOREA 2016-17. Claudia Adriana Ramírez Valdespino fue becaria CONACyT (CVU/Becario: 331007/230836).

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo fueron publicados en el artículo:

Functional characterization of TvCyt2, a member of the p450 monooxygenases from *Trichoderma virens* relevant during the association with plants and mycoparasitism. Molecular Plant-Microbe Interactions.

DEDICATORIA

*No tengo palabras para agradecerte lo que has hecho por mí,
por ser mi roca, por darme la fortaleza de seguir adelante,
por enseñarme que cualquier logro o falla, tú lo usas para bien,
para mostrarme tu grandeza en mi vida y que, aunque te falle,
tú eres fiel y cumples tus promesas en tu tiempo perfecto...*

Te dedico este logro a tí, mi todo.

AGRADECIMIENTOS

Familia: papás, Pau, abuelitos, tíos, primos. Gracias por todo, por acompañarme en mis locuras y creer en mi buen juicio para hacer las cosas. Pau, eres mi inspiración, mi chaparra querida. Los quiero mucho.

Mi más sincero agradecimiento a la D. C. Vianey Olmedo M. por haber confiado en mí y aguantarme durante más de cuatro años, por sus consejos y sus enseñanzas. Gracias.

A cada uno de mis sinodales, gracias por sus comentarios y observaciones realizadas al trabajo. En especial quiero agradecer al D. C. John Délano, por las facilidades otorgadas para la realización de algunos de los experimentos y las recomendaciones hechas al trabajo.

A mi compañera de viaje, Pau, mil gracias por compartir tus conocimientos conmigo, por hacer más ligera la travesía de estos cuatro años. Valoro mucho la amistad que surgió entre nosotras.

Miembros del VOM lab, tantos que pasaron y que ya no están: Karina, Alma Olmos, Daniela, Marce, Jordan. Gracias por hacer más llevadera la estadía.

Doctor Félix Gutiérrez, gracias por sus pláticas y consejos, por permitir usar mucho del equipo de su laboratorio y por enseñarme que la ciencia puede ser divertida.

Nacho, me faltan palabras para agradecerte todo lo que me has ayudado, por tu nobleza, tus consejos, eres una persona muy especial en mi vida, nunca cambies.

Caro, ya hace tres años de tu partida, pero sigues siendo mi gemela favorita y te llevo con mucho cariño en mi corazón. Janeth, Luis Mario y Karlita, mil gracias por sus palabras de ánimo, por escucharme y aconsejarme en más de una ocasión, por su amistad que es inigualable. Innumerables personas que conocí en mi estadía en el departamento de Biología, gracias por todo.

A mi familia adoptiva Arce Torreblanca, gracias por todas sus muestras de cariño, por volverme parte de su familia y por los innumerables fines de semana que he pasado con Uds. Coffee, eres mi perro favorito. A mi otra familia adoptiva: Jacob Martínez, gracias por considerarme una hija más, Glancy, gracias por tu amistad.

A la familia Velarde, han sido una de las más grandes bendiciones en mi vida. Gracias por sus palabras, por su confianza. Les quiero.

Ale León, Rosy, Alma, Ammi, Mayra, Tania, Edith, Danni, Paty y los que me faltan, gracias por su amistad y apoyo. Mario, gracias por ser mi proveedor de artículos, te quiero muchote.

Lucero y Rogelio, gracias por ser los mejores rommies, por su apoyo en innumerables ocasiones expresado de mil y un maneras. Quién iba a decir que terminaríamos viviendo juntos. Los quiero mucho.

Biocámicos: Beris, Isa, Isaac, Elena, Victor, Fer, Ivy, Ana y Erick, gracias por todo, gracias por mostrarme que las grandes amistades perduran a pesar de los años, por ser mi escape al estrés, por ser mi segunda familia. Gracias por darme palabras de ánimo, por escucharme y aconsejarme, por llenarme de grandes alegrías. Por más de 10 años de amistad... Los quiero como no tienen idea.

RESUMEN

Entre los microorganismos que habitan el suelo se encuentran especies del género *Trichoderma*, que son hongos filamentosos usados como biocontroladores por su actividad micoparasítica. Se ha reportado que tienen la capacidad de modular el sistema de defensa de diversas plantas, posiblemente a través de proteínas tipo efector, capaces de alterar la estructura y función celular del hospedero, facilitando la interacción. A partir del secretoma de *Trichoderma*, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se seleccionaron 21 genes que codifican para posibles efectores. Se encontró que cuatro de éstos presentan una expresión diferencial en interacción con la planta *Arabidopsis thaliana*. Dentro de los candidatos a efectores seleccionados, se encuentran los productos de los genes *TaL6*, *TaCFEM5* y *TvCyt2*. Bajo nuestras condiciones *TaL6* y *TaCFEM5* mostraron un máximo de expresión a los siete días de interacción con la planta, mientras *TvCyt2* mostró una disminución en su expresión. Además, respondieron a diferentes moléculas como celulosa y quitina. Se generaron mutantes nulas y sobreexpresantes de estos genes, para conocer más acerca de su participación durante las asociaciones que establece *Trichoderma*, y los resultados sugieren la participación de estas proteínas en la modulación de la respuesta de la planta durante la interacción. Además de observar que estos candidatos son importantes para que *Trichoderma* pueda controlar al fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, sugiriendo que los productos de los genes estudiados participan activamente en las asociaciones que *Trichoderma* establece con planta y con otros hongos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Interacciones planta-microorganismo.	1
Inducción del sistema de defensa vegetal	2
Proteínas tipo efector: generalidades	4
<i>Trichoderma</i> como modelo de estudio.....	8
<i>Trichoderma</i> : organismo benéfico en interacciones planta-microorganismo.....	9
Establecimiento de un diálogo molecular entre <i>Trichoderma</i> y la planta.....	10
Moléculas tipo efector de <i>Trichoderma</i>	11
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
Selección de secuencias codificantes de posibles proteínas tipo efector de <i>T.</i> <i>virens</i> y <i>T. atroviride</i>	16
Material biológico	17
Plásmidos.....	18
Medios de cultivo.....	19
Medio Murashige-Skoog (MS) para plantas.....	19
Medio mínimo Vogel.....	19
Medio Luria Bertani (LB).....	20
Agar papa dextrosa (PDA).....	20
Caldo papa dextrosa (PDB).....	20
PDA selectivo osmoprotector	20

Agar PDA suave	20
Obtención de conidias de <i>Trichoderma</i> spp.....	20
Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Ensayos de interacción planta-hongo	21
Ensayos de expresión en medio mínimo	21
Ensayos de confrontación hongo-hongo.....	22
Aislamiento de ADN	22
Aislamiento de ARN	22
Aislamiento de ADN plasmídico	23
Síntesis de ADNc	23
Análisis de la expresión por RT-PCR	23
Análisis de la expresión por qPCR	25
Electroforesis de las muestras de ácidos nucleicos en geles de agarosa	26
Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	26
Ligación y transformación de los productos de PCR en el vector de mantenimiento	27
Construcción de las fusiones de las posibles secuencias de efectores a la proteína fluorescente mCherry.....	28
Interrupción de genes de <i>Trichoderma</i> por PCR de fusión	31
Obtención de protoplastos de <i>Trichoderma</i>	35
Verificación del reemplazo del gen de interés en las transformantes	37
Obtención de cepas sobreexpresantes de <i>Trichoderma</i>	38
Análisis de la localización de los candidatos durante la interacción planta- <i>Trichoderma</i>	40
Análisis de la secuencia promotora	40
Análisis histoquímico con GUS.....	41

Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
Selección de genes codificantes de posibles proteínas tipo efector	42
Interacciones <i>Trichoderma-Arabidopsis</i> y análisis de la expresión diferencial de posibles efectores en <i>Trichoderma spp.</i>	43
Caracterización del gen <i>TaL6</i>	48
Análisis de la expresión de <i>TaL6</i> en diferentes condiciones de cultivo	48
Determinación de la localización del efector <i>TaL6</i> durante la interacción planta- <i>Trichoderma</i>	52
Obtención de cepas sobreexpresantes del gen <i>TaL6</i>	53
Diseño de la construcción para la interrupción del gen <i>TaL6</i>	55
Obtención y selección de mutantes nulas del gen <i>TaL6</i>	57
Ensayos de interacción de las cepas mutante nula $\Delta ta/6$ y sobreexpresante <i>TaL6-OE</i> con líneas marcadoras del sistema de defensa vegetal y en confrontación con <i>Rhizoctonia solani</i>	61
Caracterización del gen <i>TaCFEM5</i>	64
Análisis de la expresión de <i>TaCFEM5</i> en diferentes condiciones de cultivo	64
Determinación de la localización del efector <i>TaCFEM5</i> durante la interacción planta- <i>Trichoderma</i>	65
Obtención de cepas sobreexpresantes del gen <i>TaCFEM5</i>	67
Diseño de la construcción para la interrupción del gen <i>TaCFEM5</i>	69
Obtención y selección de mutantes nulas del gen <i>TaCFEM5</i>	70
Interacción de cepas $\Delta tacfem5$ y sobreexpresante <i>TaCFEM-OE</i> con líneas marcadoras del sistema de defensa vegetal y en confrontación con <i>Rhizoctonia solani</i>	74

Caracterización del gen <i>TvCyt2</i>	78
Análisis de la expresión de <i>TvCyt2</i> en diferentes condiciones de cultivo	78
Análisis de la expresión de <i>TvCyt2</i> en confrontación con cepas de <i>R. solani</i>	79
Diseño de la construcción para la interrupción del gen <i>TvCyt2</i>	80
Obtención y selección de mutantes nulas del gen <i>TvCyt2</i>	82
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIÓN.....	93
PERSPECTIVAS.....	94
REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

1. Ejemplos de proteínas tipo efector de hongos y oomicetos fitopatógenos.	5
2. Organismos utilizados en el presente trabajo.....	17
3. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo	18
4. Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de RT-PCR y qPCR	24
5. Oligonucleótidos diseñados para las fusiones a mCherry.	28
6. Oligonucleótidos quiméricos para la interrupción de los genes de interés	32
7. Oligonucleótidos diseñados para realizar la interrupción de los genes de interés	33
8. Oligonucleótidos utilizados para la verificación de las interrupciones de los genes de interés	38
9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del marco de lectura abierto de los genes de interés	39
10. Candidatos a efectores seleccionados de <i>T. atroviride</i> (<i>Ta</i>) y <i>T. virens</i> (<i>Tv</i>)	43

ÍNDICE DE FIGURAS

11. Modelo de zigzag que cuantifica la respuesta inmune vegetal	2
2. Estructura de las proteínas tipo efector	8
3. Esquema de los productos de amplificación para la obtención de las fusiones de los candidatos a efectores a mCherry.....	30
4. Esquema de la PCR 1 para la interrupción del gen de interés.....	34
5. Esquema de la PCR 2 para la interrupción del gen de interés	35
6. Esquema de la PCR 3 para la interrupción del gen de interés	35
7. Representación gráfica de las amplificaciones por PCR a obtener para validar la correcta interrupción de los genes de interés	38
8. Ejemplo de la selección de genes candidatos a efectores a analizar en este trabajo..	42
9. Interacciones de <i>A. thaliana</i> con <i>Trichoderma spp.</i>	44
10. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión de genes candidatos a efectores de <i>Trichoderma</i> en interacción con <i>A. thaliana</i>	46
11. Análisis por qPCR de los patrones de expresión de genes candidatos a efectores de <i>Trichoderma</i> en interacción con <i>A. thaliana</i>	48
12. Análisis de la secuencia promotora del gen <i>TaL6</i>	49
13. Patrones de expresión del gen <i>TaL6</i> en un medio mínimo Vogel con celulosa	50
14. Patrones de expresión del gen <i>TaL6</i> en medio mínimo Vogel con exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina	51
15. Amplificación de los fragmentos de los genes de los candidatos <i>TaL6</i> y <i>mCherry</i> ...	52
16. Comprobación de la fusión de <i>TaL6</i> a mCherry.....	53
17. Amplificación del fragmento del gen <i>TaL6</i>	54

18. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las sobreexpresantes <i>TaL6</i> y su análisis densitométrico.	55
19. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen <i>TaL6</i>	56
20. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen <i>TaL6</i>	57
21. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TaL6</i>	58
22. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TaL6</i>	59
23. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las mutantes $\Delta ta16$ 4.2 y 5.2.....	60
24. Morfología de la cepas silvestre y mutante $\Delta ta16$ de <i>T. atroviride</i>	61
25. Longitud de la raíz de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 en interacción con <i>T. atroviride</i> (wt) y con la cepa $\Delta ta16$	62
26. Análisis de la participación del gen <i>TaL6</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> AG2	63
27. Análisis de la participación del gen <i>TaL6</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> AG5	63
28. Análisis de la secuencia promotora del gen <i>TaCFEM5</i>	64
29. Patrones de expresión del gen <i>TaCFEM5</i> en medio mínimo Vogel con exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina.	65
30. Amplificación de los fragmentos de los genes <i>TaCFEM5</i> y mCherry	66
31. Comprobación de la fusión <i>TaCFEM5</i> - mCherry.....	66
32. Comprobación de la transformante de <i>Trichoderma</i> que contiene la fusión <i>Tacfem5</i> - Cherry	67
33. Amplificación del gen <i>TaCFEM5</i>	68
34. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las sobreexpresantes <i>TaCFEM5</i> y su análisis densitométrico.	69
35. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen <i>TaCFEM5</i>	70

36. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen <i>TaCFEM5</i>	70
37. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TaCFEM5</i>	71
38. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TaCFEM5</i>	72
39. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las mutantes <i>Δtacfem5 1.1 y 2.1</i>	73
40. Morfología de la cepa silvestre y las mutantes <i>Δtacfem5</i> de <i>T. atroviride</i>	74
41. Análisis histoquímico de GUS para plántulas <i>pPR1:uidA</i> a los 7 días de cocultivo con <i>T. atroviride</i> y las mutantes <i>Δtacfem5</i>	75
42. Análisis histoquímico de GUS para plántulas <i>pLox2:uidA</i> a los 7 días de cocultivo con <i>T. atroviride</i> y las mutantes <i>Δtacfem5</i>	76
43. Longitud de la raíz de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 en interacción con <i>T. atroviride</i> (wt) y con las cepas mutantes <i>Δtacfem5</i>	76
44. Análisis de la participación del gen <i>TaCFEM5</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> AG2 .	77
45. Análisis de la participación del gen <i>TaCFEM5</i> de <i>T. atroviride</i> contra <i>R. solani</i> AG5.	77
46. Análisis de la secuencia promotora del gen <i>TvCyt2</i>	78
47. Patrones de expresión del gen <i>TvCyt2</i> en medio mínimo Vogel adicionado con glucosa, celulosa, exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina	79
48. Patrones de expresión del gen <i>TvCyt2</i> en medio mínimo Vogel adicionado con glucosa, celulosa, exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina	80
49. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen <i>TvCyt2</i>	81
50. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen <i>TvCyt2</i>	81
51. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TvCyt2</i>	82
52. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen <i>TvCyt2</i>	82

53. Reacciones de amplificación por qPCR de las mutantes nulas $\Delta tv\text{cyt}2$ 2.1 y 3.1 y las sobreexpresantes <i>TvCyt2OE-1</i> y 5	84
--	----

ABREVIATURAS

ABA- Ácido Abscísico.

ADN- Ácido desoxirribonucleico.

ADNc- Ácido desoxirribonucleico copia.

ARN-Ácido Ribonucleico.

Dpi- Días post-inoculación.

ET- Etileno.

HR- Respuesta hipersensible.

AJ- Ácido Jasmónico.

MAMPs- Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos.

PAMPs- Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PPRs- Receptores de Reconocimiento de Patrones.

AS- Ácido Salicílico.

RSA- Resistencia Sistémica Adquirida.

RSI- Resistencia Sistémica Inducida.

INTRODUCCIÓN

Interacciones planta-microorganismo.

Las plantas, como organismos sésiles, están expuestas a una amplia variedad de interacciones con organismos benéficos o patógenos. Para controlar dichas interacciones, las plantas presentan un sistema de defensa complejo, que les permite defenderse de sus atacantes, que pueden ser herbívoros o patógenos microbianos. El mismo sistema regula las interacciones con organismos mutualistas como hongos micorrícicos y rizobacterias (Jayaraman *et al.*, 2012; Pineda *et al.*, 2013).

Se ha descrito que las interacciones entre una planta y un patógeno implican una comunicación de dos vías, mecanismo que también se puede aplicar a las interacciones benéficas (Boyd *et al.*, 2013). No sólo se trata de que la planta pueda reconocer y si es el caso defenderse contra un potencial patógeno, sino que el microorganismo puede manipular procesos de la planta para crear el ambiente adecuado, permitiendo su crecimiento y reproducción. Ambos organismos utilizan conjuntos de genes que permiten esta comunicación.

Las interacciones patogénicas generan una supresión del crecimiento o muerte vegetal, mientras que las interacciones benéficas promueven el crecimiento vegetal, además de que pueden brindar protección contra patógenos. Sin embargo, algo que tienen en común estos dos tipos de interacciones, es que ambos generan una respuesta del sistema de defensa vegetal (Bais *et al.*, 2006).

Inducción del sistema de defensa vegetal.

El sistema de defensa vegetal le permite a la planta distinguir la presencia de otros organismos, mediante un reconocimiento de moléculas conservadas estructuralmente y comunes entre microorganismos, tales como flagelina, lipopolisacáridos o peptidoglicanos, entre otras. Estas moléculas son colectivamente llamadas Patrones Moleculares Asociados a Microbios (MAMPs o PAMPs en el caso de organismos patógenos). Jones y Dangl (2006) propusieron un modelo en *zigzag* de al menos cuatro fases para explicar la activación del sistema de defensa vegetal (Figura 1).

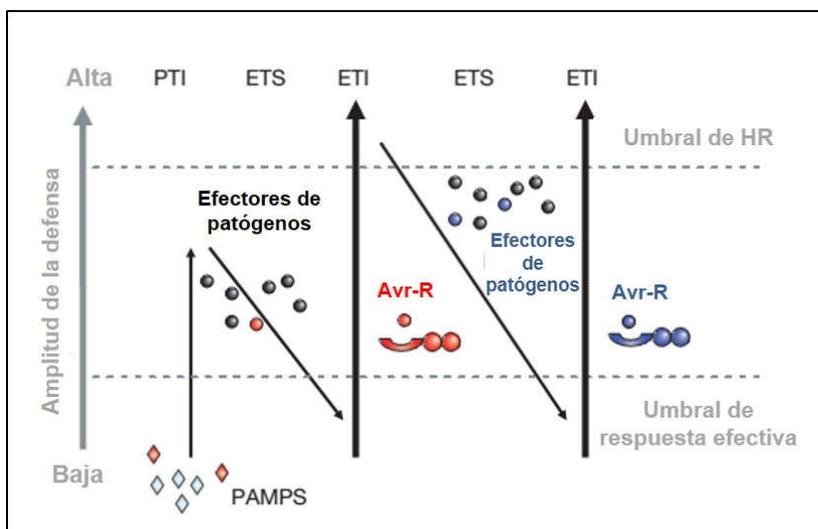


Figura 1: Modelo de zigzag que cuantifica la respuesta inmune vegetal. Esquema ilustrativo de la activación del sistema de defensa vegetal. PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos; PTI: Inmunidad activada por PAMP's; ETS: susceptibilidad activada por efectores; ETI: inmunidad activada por efectores; HR: respuesta hipersensible; Avr-R: proteínas de avirulencia-receptor de Avr. Diagrama tomado de Jones y Dangl (2006).

En la fase uno, los PAMP's, son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PPRs), resultando en la activación de la inmunidad, con una amplitud intermedia que puede impedir la colonización del patógeno. En la fase dos, los patógenos exitosos liberan efectores que

contribuyen a su virulencia. Los efectores pueden interferir con la inmunidad activada por PAMPs (PTI), resultando en una susceptibilidad activada por efectores (ETS). En la fase tres, proteínas intracelulares de la planta pueden reconocer los efectores del patógeno o sus proteínas blanco modificadas y activar una respuesta más rápida, prolongada y más amplia que en la PTI, lo que resulta en una inmunidad activada por efectores (ETI). La ETI es un acelerador y amplificador de la respuesta PTI, resultando en una resistencia a la enfermedad que usualmente involucra la muerte de las células en el sitio de la infección, evitando la dispersión del patógeno al resto de la planta; la restricción impuesta al patógeno se conoce como respuesta hipersensible (HR). En la fase cuatro, la selección natural ha permitido que diversos patógenos puedan suprimir la ETI mediante la inactivación o diversificación del efector, o bien mediante la adquisición de nuevos efectores que suprimen ETI.

Las respuestas de defensa de la planta son coordinadas por pequeñas moléculas que actúan como mensajeros y regulan la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la defensa (Ausubel, 2005). Entre estas moléculas se encuentran las fitohormonas ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS), ácido abscísico (ABA) y etileno (ET), que tienen una función clave en la defensa vegetal (Pieterse *et al.*, 2009).

En el establecimiento de las interacciones planta-microorganismo, se propone la participación de dos vías principales: la Resistencia Sistémica Inducida (RSI), que se activa en la planta frente al ataque de patógenos necrótrofos y herbívoros y que tiene como hormonas mediadoras al ácido jasmónico y etileno. La otra vía se conoce como Resistencia Sistémica Adquirida (RSA), y es mediada

por la hormona AS, cuya síntesis y acumulación es inducida por la presencia de patógenos biótropos. También se ha reportado que ésta es la principal vía de defensa que activan organismos simbiotes benéficos (Taiz y Zeige, 2006).

En este sentido, se propone que las vías de defensa vegetal deben estar finamente controladas para permitir las asociaciones benéficas (Riely *et al.*, 2004, 2006; Van Wees *et al.*, 2008). Ejemplo de ello es lo que ocurre durante la colonización de plantas de arroz por *Glomus mosseae* donde los niveles de AS se incrementan (Blilou *et al.*, 2000); en otros casos, se ha reportado que la adición de AS exógeno ha impedido que rizobacterias que comúnmente colonizan a *Pisum sativum*, formen nódulos, evitando una colonización exitosa (van Spronsen *et al.*, 2003). Como se describe en el modelo del zigzag, las moléculas tipo efector se proponen como elementos fundamentales en la modulación de las asociaciones planta-microorganismo.

Proteínas tipo efector: generalidades.

Existe un gran interés por entender cómo se realizan las interacciones entre diferentes organismos, sean benéficas o perjudiciales. La conclusión en todos los casos es que debe existir un intercambio de señales entre ellos. Poco se conoce sobre la naturaleza de las moléculas que regulan las etapas tempranas de la interacción entre el microorganismo y su hospedero. Las interacciones planta-patógeno han sido más estudiadas debido a su impacto negativo sobre diversos cultivos de importancia agrícola. En dichos sistemas, se han descrito las moléculas tipo efector como elementos clave para una exitosa colonización del hospedero. Kamoun (2006, 2007) las define como moléculas que alteran la estructura y función de la célula hospedera, facilitando los procesos de infección

(factores de virulencia y toxinas) o activando las respuestas de defensa (factores de avirulencia y activadores). Las moléculas tipo efector pueden ser proteínas (Plett *et al.*, 2011; Mgbeahuruike *et al.*, 2012), metabolitos secundarios (Luo y col., 2010; Baldwin *et al.*, 1985) o incluso micro ARN (Weiberg *et al.*, 2013). En el caso de las proteínas tipo efector, se ha descrito su participación en diferentes sistemas patogénicos, en la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 1. Ejemplos de proteínas tipo efector de hongos y oomicetos fitopatógenos. Se cita la familia a la que pertenecen, función y organismos donde se han reportado.

Proteína	Función	Organismo	Cita
LysM	Inhibición quitinasas	<i>Mycosphaerella graminicola</i> <i>Cladosporium fulvum</i> ;	Marshall <i>et al.</i> , 2011; Sánchez Vallet 2013.
Hidrolasas	Degradación de pared vegetal, Activación del sistema de defensa vegetal	<i>Botrytis cinerea</i> ;	Zhang <i>et al.</i> , 2015;
CFEM	Implicado en procesos de patogenicidad	<i>Magnaporthe grisea</i>	Kulkarni, 2003.
Hidrofobinas	Implicadas en mediar la colonización del patógeno	<i>M. grisea</i> ; <i>Phlebiopsis gigantea</i> ; <i>Clonostachys rosea</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005; Mgbeahuruike <i>et al.</i> , 2012; Dubey <i>et al.</i> , 2014.
Proteínas de localización nuclear	Modificaciones a nivel transcripcional	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	Caillaud <i>et al.</i> , 2013
Cerato- platanimas	Implicado en procesos de patogenicidad	<i>B. cinerea</i> ;	Frías <i>et al.</i> , 2011;
Hipotéticas	Función desconocida	<i>Ustilago maydis</i> , <i>Blumeria graminis</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Doehlemann <i>et al.</i> , 2009; Spanu <i>et al.</i> , 2010; Zhu <i>et al.</i> , 2013.

En muchos de los efectores se han encontrado dominios o motivos característicos, dependiendo de la localización que tengan en el hospedero. En algunos casos, las proteínas son secretadas y posteriormente son internalizadas a la célula vegetal (Schornack *et al.*, 2009). Uno de los dominios más estudiados es el RXLR-dEER o RXLX, que se ha encontrado ampliamente distribuido en efectores pertenecientes a patógenos tanto de plantas como de humanos (Bhattacharjee *et al.*, 2006). Aunque existe cierta controversia, hay evidencia experimental acerca de la funcionalidad de los dominios RXLR o similares como dominios de translocación. Se propone que la interacción de este dominio con el fosfatidilinositol 3 fosfato de las membranas en las células del hospedero, permiten la internalización del efector (Kale *et al.*, 2010). Y recientemente, se ha propuesto una función principal relacionada con la secreción que como un dominio implicado en la translocación (Wawra *et al.*, 2017).

Se ha propuesto también que la presencia de los residuos de lisina proporciona un área cargada positivamente en el dominio efector, facilitando su internalización (Yaeno & Shirasu, 2013). Existen otros dominios que se ha propuesto están implicados en la translocación del efector. Entre ellos están el dominio RGD encontrado en la proteína ToxA producida por el patógeno del trigo *Pyrenophora tritici-repentis* (Manning *et al.*, 2008); los dominios LFLAK presentes en proteínas de la familia Crinkler y el CHXC, que han sido encontrados en efectores de *P. infestans* y *P. capsici* donde reportan que participan en los procesos de translocación al interior de la célula vegetal (Torto *et al.*, 2003; Kemen *et al.*, 2011).

Al comparar las secuencias de distintos efectores reportados, se ha encontrado en la mayoría de los casos un patrón consistente relacionado a la posición del dominio RXLR, localizado entre 30 y 40 aminoácidos después del péptido señal de secreción, por lo general en la región amino terminal de la proteína. Sin embargo, hay reportes de efectores funcionales que contienen este dominio en la región carboxilo terminal (Plett *et al.*, 2011), por lo que su posición puede no ser relevante. Después del dominio de translocación se encuentra una región variable, conocida como dominio efector y que determina la función particular de éste. En el caso de los efectores que no entran a la célula y se localizan en el apoplasto, se ha encontrado que varios de ellos contienen regiones ricas de cisteína, que le confieren estabilidad a la proteína (Kamoun 2006, 2007). En la Figura 2 se muestra una imagen con ejemplos estructurales de los efectores apoplásticos y citoplasmáticos. Las funciones que se han descrito son muy variadas, principalmente se han descrito para organismos patogénicos, como se mostró en la Tabla I.

Acerca de proteínas tipo efector en organismos benéficos, es poca la información con la que se cuenta. Se han reportado algunos ejemplos en especies de *Rhizobium*, donde se vio que las proteínas NopJ, NopM and NopT homólogas a la proteinasa AvrPphB de *Xanthomonas campestris*, están implicadas en procesos relacionados con la simbiosis (Kambara *et al.*, 2009). En el caso de hongos micorrícicos se pueden citar a *Laccaria bicolor* y *Glomus intrarradicens* (Plett *et al.*, 2011; Klopffholz *et al.*, 2011), en los que se ha visto que las proteínas MiSSP7 y SP7 respectivamente, son esenciales para el establecimiento y desarrollo de la asociación con las raíces. Además, se ha demostrado que ambas proteínas son

de localización nuclear. En especies del género *Trichoderma* se han descrito diversas proteínas y metabolitos secundarios con función efectora (Hermosa *et al.*, 2012). Si bien existe información en sistemas benéficos, en comparación con los sistemas patogénicos aún falta conocer qué otras moléculas efectoras están implicadas en las interacciones planta-microorganismo y si éstas actúan de manera similar a las reportadas en los sistemas patogénicos.

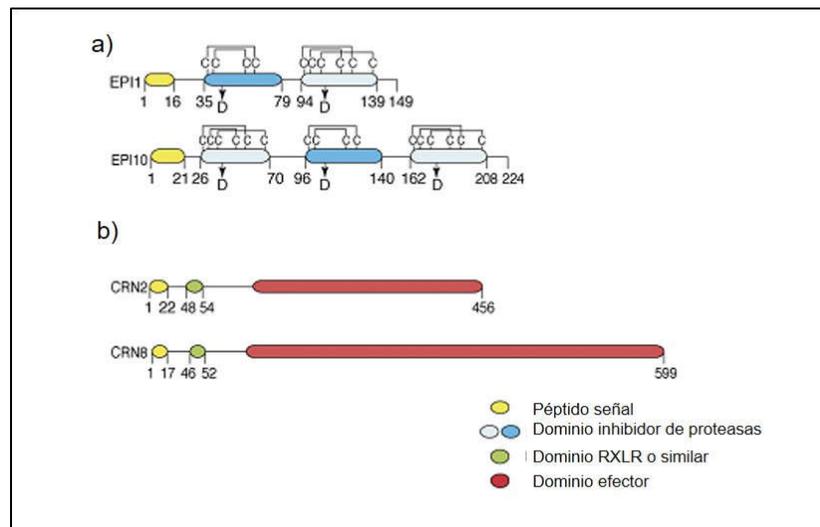


Figura 2. Estructura de las proteínas tipo efector. Ejemplos de algunas proteínas tipo efector que han sido descritas. a) Efectores apoplásticos de *Phytophthora infestans*; b) Efectores citoplasmáticos con dominios RXLR-dEER de *P. infestans* y *P. sojae*. Imagen tomada y modificada de Kamoun, 2007.

***Trichoderma* como modelo de estudio.**

Trichoderma es un género de hongos que pertenece al *phylum Ascomycota*, a la clase Sordariomycetes y a la familia *Hypocreaceae* (fase sexual). Se encuentra en diversos ambientes alrededor del mundo y puede ser encontrado en suelos ricos en compuestos orgánicos (Brewer & Taylor, 1981). El estilo de vida de los hongos pertenecientes a este género es muy variado (Druzhinina *et al.*, 2011), incluye estrategias nutricionales características de

organismos saprófitos, biotróficos y necrotrofos. Es frecuentemente aislado de suelos utilizados en la agricultura.

La adaptabilidad, fácil aislamiento y manipulación de los hongos del género *Trichoderma* ha facilitado su estudio *in vitro*, convirtiéndolo en uno de los principales modelos de estudio para diversos procesos biológicos de interés tanto científico como tecnológico. Estos hongos son oportunistas, simbiontes de plantas y pueden comportarse como parásitos y antagonistas de varios hongos fitopatógenos, protegiendo a las plantas. *Trichoderma* se sitúa entre los organismos biocontroladores más estudiados y es comercializado junto con otros biopesticidas, y biofertilizantes (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004a). Diferentes especies de *Trichoderma* pueden colonizar la rizósfera y promover efectos benéficos para las plantas. Entre los efectos se puede mencionar que favorecen un rápido establecimiento de comunidades microbianas; pueden controlar patógenos, mediante diversos mecanismos antagónicos o de micoparasitismo y pueden mejorar la salud de la planta y estimular su crecimiento radicular (Harman *et al.*, 2004b).

***Trichoderma*: organismo benéfico en interacciones planta-microorganismo.**

Estudios realizados con diversos cultivos de importancia agrícola y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* han puesto de manifiesto el efecto benéfico de *Trichoderma* (De Souza *et al.*, 2008; Contreras Cornejo *et al.*, 2009; Salas Marina *et al.*, 2011).

Es posible que el efecto que tiene *Trichoderma* sobre las plantas se deba a la producción de moléculas que le permitan interactuar con éstas, promover su

crecimiento e inducir su sistema de defensa. Al respecto, se ha reportado que *T. virens* produce compuestos tipo auxinas que inducen el crecimiento vegetal (Contreras Cornejo *et al.*, 2009). Ensayos *in vitro* han sugerido que *T. harzianum* ayuda a que la planta tenga una mayor captación de fósforo y micronutrientes como zinc y manganeso (Altomare *et al.*, 1999). Acerca de la modulación del sistema de defensa vegetal por *Trichoderma*, se sabe que moléculas tipo efector están implicadas en la activación y/o supresión de dichas vías. Cabe señalar que el efecto observado es dependiente de la planta, del aislado fúngico y del estado fisiológico de la planta (Harman *et al.*, 2004b; Tucci *et al.*, 2011).

Establecimiento de un diálogo molecular entre *Trichoderma* y la planta.

Al igual que con otros microorganismos, es indispensable que se dé una comunicación entre la planta y *Trichoderma* para establecer la asociación biológica. Algunos estudios a nivel transcripcional durante la interacción *Trichoderma*-planta, muestran cambios en la expresión de genes en ambos organismos (Samolski *et al.*, 2009; Mehrabi Koushki *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2012). En el sistema vegetal se ha reportado la inducción de genes relacionados con la resistencia sistémica, tales como PR5 de tomate, PR1, PAD3, Lox1 y proteínas de respuesta a auxinas de *A. thaliana* (Alfaro *et al.*, 2007; Salas Marina *et al.*, 2011; Morán Díez *et al.*, 2012). Se ha propuesto que el SA tiene una función crucial en la interacción de *A. thaliana* con *Trichoderma*, ya que el uso de líneas mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la síntesis de SA mostró la entrada del hongo al sistema vascular, con la consecuente muerte del tejido vegetal (Alonso Ramírez, *et al.*, 2014).

Se ha reportado que, durante la interacción con plantas de tomate y *A. thaliana*, en *Trichoderma* se incrementa el nivel de proteínas de adhesión, de proteínas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal y de proteínas implicadas en procesos de transporte y metabolitos secundarios (Woo *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2012; Lamdan *et al.*, 2015). Algunas de las moléculas producidas por *Trichoderma* son clasificadas como proteínas tipo efector ya que tienen la capacidad de inducir el sistema de defensa vegetal de una manera similar a como lo hacen los organismos patógenos, lo que ayuda a la planta a contrarrestar los efectos dañinos de éstos (Guzmán *et al.*, 2017).

Una explicación de cómo *Trichoderma* puede mejorar la respuesta ante el ataque de patógenos es descrita por Lorito *et al.* (2010), donde se propone que *Trichoderma* es capaz de incrementar la primera respuesta mediada por MAMPs, contrastando con la acción de los efectores de los patógenos conducen a la ETS. De este modo, evita que la resistencia de la planta disminuya. *Trichoderma* también puede optimizar la respuesta ETI, causando una respuesta más rápida, en un proceso denominado “priming” o activar la defensa mediante la producción de compuestos que son específicamente reconocidos por los receptores de la planta.

Moléculas tipo efector de *Trichoderma*.

Hasta ahora se han reportado al menos diez moléculas con características de efector de *Trichoderma spp.* en asociación con distintas especies vegetales. Entre ellas se encuentran metabolitos secundarios, como los peptaiboles y tricotecenos, así como proteínas pertenecientes a familias cuyos miembros han

sido reportados también en sistemas patogénicos (Viterbo *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2010).

La xilanasas Eix de *T. viride* participa en la activación de la respuesta hipersensible en plantas de tabaco (Rotblat, *et al.*, 2002). En *T. asperellum* se ha reportado una proteína tipo expansina, llamada Swoleina, que activa el sistema de defensa en pepino, brindando protección contra *B. cinerea* y *P. syringae* (Brotman *et al.*, 2008).

Los trabajos realizados con plantas de algodón y maíz indican que proteínas pertenecientes a la familia de las cerato-plataninas están implicadas en la inducción del sistema de defensa vegetal local y sistémico (Djonović *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2006; Gaderer *et al.*, 2015). La proteína Sm1 de *T. virens* y su ortólogo Epl1 de *T. atroviride* modulan diferencialmente la resistencia sistémica en plantas de tomate contra diferentes patógenos, indicando que existe más de una ruta de señalización durante la interacción planta-*Trichoderma* (Salas Marina *et al.*, 2015). En plantas de maíz, se observó que las proteínas Sm2 y Epl2 tienen un mayor impacto en la promoción de la defensa vegetal que las proteínas Sm1/Epl1, a pesar de tener un menor nivel de expresión en interacción con planta (Gaderer *et al.*, 2015).

Si bien se cuenta con reportes sobre proteínas tipo efector de *Trichoderma*, aún no se conoce la manera precisa en que esas moléculas participan, para permitir que se tenga un fino control del proceso de interacción con la planta. Además, es probable que haya otras funciones efectoras involucradas en este proceso.

Para obtener más información sobre posibles proteínas tipo efector en *Trichoderma*, en nuestro grupo de trabajo, se realizó un análisis bioinformático del secretoma de tres especies de *Trichoderma*: *T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*. Las primeras dos, comparten estilos de vida similares, ya que son endófitas de plantas y micoparásitas de hongos fitopatógenos (Kubicek *et al.*, 2011). En contraste, *T. reesei* es de vida saprobia utilizado ampliamente para la producción de enzimas líticas (Pakula *et al.*, 2000; Peterson & Nevalainen, 2012). A partir de las secuencias clasificadas como codificantes para proteínas secretadas, se realizó una búsqueda de dominios RXLR o similares. Adicionalmente se seleccionaron secuencias homólogas a las de efectores ya reportados y validados experimentalmente en otros sistemas. La lista final de candidatos a efectores fue de 233, pertenecientes a diversas familias, entre ellas: LysM, CFEM, glicósido-hidrolasas, cerato-plataninas, hidrofobinas, serin-proteasas, monooxigenasas p450 y tiorredoxinas, entre otras (Guzmán *et al.*, 2017).

Es necesario llevar a cabo la validación de esos candidatos como efectores para determinar su participación en el establecimiento de las interacciones benéficas. Esto podrá darnos más información acerca de las rutas de señalización involucradas en la correcta modulación de las vías de defensa y desarrollo, resultando en una exitosa interacción de *Trichoderma* con la planta.

JUSTIFICACIÓN

Diversas especies de *Trichoderma* tienen efectos benéficos sobre plantas, induciendo su desarrollo y capacidad de defensa hacia agentes patógenos.

A pesar de que se cuenta con los genomas secuenciados de especies de *Trichoderma*, se conoce poco sobre la participación de moléculas tipo efector en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en la modulación de respuestas de defensa. Por lo tanto, resulta interesante identificar nuevos efectores y analizar su impacto en el establecimiento de la asociación con la planta.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Caracterizar genes que codifican posibles efectores de *Trichoderma* spp, diferencialmente expresados durante la interacción con planta y determinar su participación en la respuesta de defensa vegetal.

Objetivos Particulares.

- I. Seleccionar a partir de los candidatos a proteínas tipo efector, al menos 20 secuencias para analizar su patrón de expresión en interacción con la planta.
- II. Confirmar la expresión diferencial por PCR en tiempo real de al menos 5 candidatos.
- III. Analizar los patrones de expresión de al menos dos de los genes de *Trichoderma* spp. en diferentes condiciones de cultivo.
- IV. Determinar la localización de al menos dos de los efectores candidatos durante la interacción planta-*Trichoderma*.
- V. Determinar la participación de al menos uno de los genes diferencialmente expresados, en la modulación de mecanismos de defensa y en la promoción del crecimiento en *A. thaliana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de secuencias codificantes de posibles proteínas tipo efector de *T. virens* y *T. atroviride*.

Guzmán y colaboradores (2017), analizaron el secretoma de tres especies de *Trichoderma*: *T. virens*, *T. atroviride* y *T. reesei*, usando los programas ProtComp-v9, WolfPsort, SignalPv3-NN-D, SignalPv3-HMM-S, Phobius y SignalPv4-D, obteniendo 233 candidatos a efectores. De acuerdo con las características de sus secuencias, los candidatos se agruparon en más de 10 familias, siendo las principales: repetidos de LysM, CFEM, tioredoxinas, cerato plataninas, glicósido-hidrolasas, serin proteasas, hidrofobinas, monooxigenasas p450 y metaloproteasas. También se consideró el análisis previo realizado por Alemán Duarte (Tesis de Maestría, 2014) con el programa Branchclust y la reconstrucción de filogenias para cada una de las familias. De los 233 candidatos, se seleccionaron 21 secuencias, considerando como criterio principal de selección que los candidatos estuvieran filogenéticamente más relacionados entre *T. virens* y *T. atroviride*, y más alejados de *T. reesei*, ya que presentan estilos de vida distintos. En la sección de resultados se enlistan las secuencias seleccionadas.

Material biológico.

En la Tabla 2 se enlistan los organismos utilizados en el presente trabajo:

Tabla 2. Organismos utilizados en el presente trabajo.

Cepa	Genotipo	Origen
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	Silvestre	Langebio Irapuato Dr. JPVC
<i>Arabidopsis thaliana</i> pLOX2	Línea marcadora, contiene la fusión del promotor del gen de la lipo-oxigenasa 2 (<i>LOX2</i>) con el gen reportero <i>uidA</i> (<i>GUS</i>)	IPICyT Dr. SCF
<i>Arabidopsis thaliana</i> pPR1	Línea marcadora, contiene una fusión del promotor del gen de la proteína relacionada a patogénesis <i>PR1</i> con el gen reportero <i>uidA</i> (<i>GUS</i>)	IPICyT Dr. SCF
<i>Trichoderma virens</i> Gv. 29.8	Silvestre	Langebio Irapuato Dr. AHE
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	Silvestre	Langebio Irapuato Dr. AHE
<i>Rhizoctonia solani</i>	Silvestre grupo de anastomosis AG2	Langebio Irapuato Dr. AHE
	Silvestre grupo de anastomosis AG5	Langebio Irapuato Dr. AHE
<i>Trichoderma atroviride</i> Δtal6	Mutante nula del gen <i>TaL6</i> codificante de una proteína de la familia LysM	Este trabajo
<i>Trichoderma atroviride</i> Δtacfem5	Mutante nula del gen <i>TaCFEM5</i> codificante de una proteína de la familia CFEM	Este trabajo
<i>Trichoderma atroviride</i> OE <i>TaL6</i>	Cepa sobreexpresante del gen <i>TaL6</i> codificante de una proteína de la familia LysM	Este trabajo
<i>Trichoderma atroviride</i> OE <i>TaCFEM5</i>	Cepa sobreexpresante del gen <i>TaCFEM5</i> codificante de una proteína de la familia CFEM	Este trabajo
<i>Trichoderma atroviride</i> <i>TaL6</i>-mCherry	Cepa sobreexpresante del gen <i>TaL6</i> fusionado al ORF del gen reportero mCherry	Este trabajo
<i>Trichoderma atroviride</i> <i>TaCFEM5</i>-mCherry	Cepa sobreexpresante del gen <i>TaCFEM5</i> fusionado al ORF del gen reportero mCherry	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- \emptyset 80DlacZDM15 D(lacZYA-argF) U169 reacA1 endA1 hsdR17 (r_k , m_k +) phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1.	Invitrogen

JPVC: Jean Philippe Vielle Calzada; SCF: Sergio Casas Flores; AEH: Alfredo Herrera Estrella.

Plásmidos.

Los plásmidos usados y generados en este trabajo se enlistan en la Tabla

3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Características	Origen
pJET 1.2/blunt	Vector de mantenimiento para la clonación eficiente de productos de PCR. Posee un gen letal que al clonar un fragmento queda interrumpido en el sitio de clonación. Sólo las células con plásmidos recombinantes son capaces de propagarse.	Thermo Scientific®
pCR®2.1-TOPO®	Vector de mantenimiento para la clonación eficiente de productos de PCR.	Invitrogen®
pUE08	Vector de expresión que posee un casete de resistencia al antibiótico cloranfenicol y al antibiótico higromicina; proviene del vector PCBI004, que a su vez proviene del vector pBCSK (+/-). Contiene un promotor <i>pk1</i> de expresión constitutiva y el terminador <i>trpC</i> .	Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007
pRSET B	Vector de expresión que posee un casete de resistencia al antibiótico ampicilina y que contiene la secuencia del gen codificante de la proteína roja fluorescente (mCherry). Contiene el promotor fuerte T7.	DCNE-UG Dr. JCTG
TOPO- <i>TaL6</i>	Derivado del vector pCR 2.1-TOPO conteniendo la región codificante del gen <i>TaL6</i> .	Este trabajo
pJET- <i>TaCFEM5</i>	Derivado del vector pJET 1.2/blunt conteniendo la región codificante del gen <i>TaCFEM5</i> .	Este trabajo
TOPO- <i>TaL6</i>-mCherry	Derivado del vector pCR 2.1-TOPO conteniendo la región codificante del gen <i>TaL6</i> fusionado a la proteína reportera mCherry.	Este trabajo
TOPO- <i>TaCFEM5</i>-mCherry	Derivado del vector pCR 2.1-TOPO conteniendo la región codificante del gen <i>TaCFEM5</i> fusionado a la proteína reportera mCherry.	Este trabajo
pUE08- <i>TaL6</i>	Derivado del vector pUE08 conteniendo la región codificante del gen <i>TaL6</i> .	Este trabajo
pUE08- <i>TaCFEM5</i>	Derivado del vector pUE08 conteniendo la región codificante del gen <i>TaCFEM5</i> .	Este trabajo
pUE08- <i>TaL6</i>-mCherry	Derivado del vector pUE08 conteniendo la región codificante del gen <i>TaL6</i> fusionado a la proteína reportera mCherry.	Este trabajo
pUE08- <i>TaCFEM5</i>-mCherry	Derivado del vector pUE08 conteniendo la región codificante del gen <i>TaCFEM5</i> fusionado a la proteína reportera mCherry.	Este trabajo

JCTG: Juan Carlos Torres Guzmán.

Medios de cultivo.

Medio Murashige-Skoog (MS) para plantas.

Por cada 100 mL de medio líquido, se utilizaron 0.445 g de medio MS con vitaminas (Murashige & Skoog, 1962) (*Phyto* Technology Laboratories) y 3 g de sacarosa, se ajustó a pH 5.7 - 5.8 y se esterilizó. Para la preparación de medio sólido, fue la misma composición que el medio líquido, adicionado con 0.7 % de agar bacteriológico.

Medio mínimo Vogel.

Se utilizó para determinar los niveles de expresión de los genes en respuesta a glucosa, celulosa, quitina, exudado de raíz y paredes celulares vegetales. La composición para 1 L fue la siguiente: sacarosa 15 g, 1x sales de Vogel (A partir de una solución madre 50x compuesta por: 150 g citrato de sodio.5H₂O, 250 g KH₂PO₄ anhidro, 100 g NH₄NO₃ anhidro, 10 g MgSO₄.7H₂O y 5 g CaCl₂.2H₂O), 5 mL de solución de elementos traza y 2.5 mL solución de biotina (0.1 mg/mL). La solución de elementos traza se preparó en 195 mL de agua destilada, disolviendo 5 g de ácido cítrico.H₂O, 5 g ZnSO₄.7H₂O, 1 g FeSO₄, 0.25 g CuSO₄.5H₂O, 0.05 g MnSO₄.H₂O, 0.05 g H₃BO₃ anhidro y 0.05 g Na₂MoO₄.2H₂O. En donde se indica, se modificó la fuente de carbono por celulosa al 1.5 %, exudado de raíz de *A. thaliana* al 20% (v/v), quitina al 0.75 % y paredes celulares vegetales al 0.2 % (donadas por el D. C. John P. Délano F. CINVESTAV-Irapuato). Para la utilización de este medio en forma sólida, se adicionó agar bacteriológico al 1.5 % (Vogel, 1956).

Medio Luria Bertani (LB).

Se utilizó para cultivar *E. coli* durante la propagación y obtención de plásmidos y construcciones. La composición es: NaCl 1 %, peptona biotriptasa 1 % y extracto de levadura 0.5 %. Para la utilización de este medio en forma sólida, se adicionó agar bacteriológico al 1.5 % y para los medios selectivos se utilizaron ampicilina (100 µg/mL) o cloranfenicol (34 µg/mL).

Agar papa dextrosa (PDA).

Medio de cultivo para hongos; por cada litro de medio, se utilizaron 39 g del medio agar papa dextrosa (Difco Laboratories), y se esterilizó en autoclave. Para el medio selectivo PDA-Higromicina, el antibiótico se usó a una concentración 100 µg/mL.

Caldo papa dextrosa (PDB).

Medio de cultivo para hongos; se utilizaron 24 g del medio caldo papa dextrosa (Difco Laboratories), por cada litro de agua desionizada y se esterilizó.

PDA Selectivo osmoprotector.

Se usó para la regeneración de protoplastos. Por cada 100 mL de medio: 2.4 g PDB, 18.2 g sorbitol, 0.7 g agar bacteriológico, adicionado con higromicina (Gibco® Hygromycin B) a una concentración 100 µg/mL.

Agar PDA suave.

Se usó para la regeneración de protoplastos. Por cada 250 mL de medio se utilizaron 9.75 g de PDA y 22.75 g de sorbitol.

Obtención de conidias de *Trichoderma* spp.

Placas de PDA se inocularon con 200 µL de solución de conidias y se incubaron a 28 °C por una semana. Se cosecharon raspando con una espátula de

vidrio y usando agua destilada estéril. A continuación, se contaron en cámara de Neubauer y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Esterilización de semillas de *A. thaliana*.

Se colocaron semillas de *A. thaliana* en tubos Eppendorf y se agregaron 500 µL de etanol absoluto grado reactivo, agitando el tubo para lavar las semillas; posteriormente se centrifugaron por 20 s a 14000 rpm (microcentrifuga SIGMA) y se decantó el etanol. Se repitió el lavado con etanol de 4 a 5 veces, decantando el etanol del último lavado en una campana de flujo de laminar. Los tubos se dejaron abiertos, hasta evaporar el etanol.

Ensayos de interacción planta-hongo.

Las interacciones se realizaron siguiendo lo reportado por Contreras-Cornejo (2009). De las interacciones, el micelio y las plántulas se colectaron por separado a los tres, cinco y siete días, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso. Del micelio únicamente se colectó 1 cm de la parte frontal de la colonia de *Trichoderma* más cercana a la raíz. Los experimentos se realizaron cinco veces de manera independiente con tres réplicas técnicas cada uno.

Ensayos de expresión en medio mínimo.

Para todos los casos se partió de un preinóculo de 100 mL de medio PDB inoculado con 1×10^6 conidias/mL de *Trichoderma*, que se incubó a 28 °C y 120 rpm durante 14-16 h después de las cuales se filtraron las germínulas y se pasaron a medio mínimo Vogel (sacarosa al 1.5 %) incubando por 48 h más. Pasado este tiempo, el micelio se filtró y se transfirió a medios con diferentes fuentes de carbono: celulosa 1.5 %, exudados de raíz 20 %, paredes vegetales 0.2

%, exudados de raíz 20 % o quitina al 0.75 %. Las muestras se colectaron a las 2, 6, 24 y 48 h para la posterior obtención de ARN. Los experimentos se realizaron al menos dos veces de manera independiente. Los fragmentos de paredes vegetales consisten en oligogalacturónidos obtenidos a partir de la pectina de hojas de tomate previamente esterilizadas, liofilizadas y centrifugadas a 15000 rpm, tal como lo reporta Ryan C. (1974).

Ensayos de confrontación hongo-hongo.

Las confrontaciones directas se realizaron con las diferentes cepas de *Trichoderma* y con dos grupos de anastomosis de *R. solani*, los aislados AG2 y AG5. En medio PDA, se colocó un disco de micelio de *Trichoderma* en un extremo de la placa y en el otro extremo, a una distancia de aproximadamente 5 cm, se colocó un disco de micelio del fitopatógeno. Los cultivos se incubaron a 28 °C y se siguió la confrontación hasta por 8 días.

Aislamiento de ADN.

La extracción se realizó siguiendo el protocolo reportado por Reader y Broda (1985). El DNA obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Para revisar la integridad del ADN obtenido, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Aislamiento de ARN.

La extracción de ARN total se realizó por el método reportado por Chomczynski y Sacchi (1987) utilizando un sistema comercial (TRIzol Reagent, Invitrogene). Las muestras obtenidas se almacenaron a -20 °C y para confirmar la integridad del ARN total obtenido, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Aislamiento de ADN plasmídico.

De clonas positivas obtenidas se realizó la extracción de ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Los ADNs plasmídicos que se obtuvieron se almacenaron a -20 °C y se corroboró su integridad en un gel de agarosa al 1 %.

Síntesis de ADNc.

Para la síntesis de ADNc se usó ARN total de las diferentes colectas de micelio y un kit comercial, siguiendo las indicaciones del proveedor (RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit Thermo Scientific®). Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Análisis de la expresión por RT-PCR.

Primeramente, se realizó el diseño de oligonucleótidos para cada una de las secuencias a analizar. Para ello se obtuvieron las secuencias completas de portal del JGI (del inglés Joint Genome Institute. <http://genome.jgi.doe.gov/>. Consulta realizada en septiembre del 2012) y con ayuda de la herramienta en línea OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) se realizó el diseño de los oligonucleótidos, considerando que amplificaran regiones menores a 200 pb, que el contenido de GC en el iniciador fuera mayor o igual al 50 %, que la región a amplificar contuviera un intrón en caso de ser posible, para poder diferenciar entre la amplificación a partir de ADN genómico y de ADNc, y que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias estables entre ellos. Estas características serían indispensables para después poder utilizar estos oligonucleótidos para ensayos de qPCR en caso de ser necesario. Para todos los oligonucleótidos la Tm fue de 60 °C. En la Tabla 4 se enlistan los oligonucleótidos diseñados.

Tabla 4: Oligonucleótidos diseñados para los experimentos de RT-PCR y qPCR. Se enlistan la nomenclatura dada, la familia de cada uno de los genes analizados y su ID. También se muestra el tamaño del amplicón esperado a partir de ADN genómico y de ADNc, así como las secuencias de los oligonucleótidos.

Clave	Familia	ID	Amplicón (ADN) pb	Amplicón (ADNc) pb	Secuencia de los oligonucleótidos	
					F	R
<i>TaL6</i>	LysM	297859	178	92	GGAATATGGCGAGCATGTATG	GAGATTTGACCCTGAAGAGC
<i>TaLysM3</i>	LysM	85797	191	100	AGAGCAATCCCTACAAACCTGGCT	AGAAGTCTCCAAGGGAAATGCCCA
<i>TaCFEM2</i>	CFEM	171091	135	135	TTGAAGAGGGCGACTAAGCAGGCAA	CGGCAACATCATTGCCACAGTCTT
<i>TaCFEM3</i>	CFEM	30137	215	141	CGTGAAGTGACCTGTGAAAG	GGAGTCTTGTACGGATGG
<i>TaCFEM4</i>	CFEM	252553	199	148	TCCTCTATGGCAGCTCAAG	AGGATTAAGGCTGTCCGAG
<i>TaCFEM5</i>	CFEM	300847	200	140	TCCTCGCAATTCCTTTAATCC	GCCAAAGTAAAAGAGTGACC
<i>TaGH1</i>	Glic-hid 3	80985	102	102	CCAATCCCGATGTCAATGTGCTT	CGCTGAAATCGTCATGCAAACCTT
<i>TaLp1</i>	Lipoproteína	283182	245	193	TGAGACCGACTTCAACAACGGTCA	GTTGCAAGTGTGGGAGCACTGAA
<i>TaFAD1</i>	Unión-FAD	264681	189	189	TTGGCCTAGCATCTCCGAATGGAA	TTGTTCCACGCCGCTACTAACAGGA
<i>TaDNAJ1</i>	DnaJ	32141	87	87	AGCTCCTGGACAAGAGCACAGATT	TAGTGGACTTTCGCTTGATGGGCT
<i>TaPrR1</i>	Pyr-Redox	146823	184	95	AGACTCGGCATCTGCACGATGTTA	GGTGCCGTAAGCCAGGATTTGTTT
<i>TaCup1</i>	Cupin-1	89075	194	111	TCTCACGTGCGAATTGAGGTACGA	AATGACGCCCTTGTGAGTCTCAT
<i>TaX1</i>	No-hit- S23	320112	134	134	TGCTCTTCTCCAGGACTGTGCTT	GCACGACAGCGCAAACATGAGATA
<i>TvLysM3</i>	LysM	124493	154	96	TGTATGACATTACTCCCGAGG	TCTGATCCTGAAGCTGACC
<i>TvTrx2</i>	Tiorredoxina	112058	205	144	CTCATCCCACTTACACG	GAATTCGGCGTATCGATCAG
<i>TvCFEM1</i>	CFEM	44825	211	144	GCTATTTTCATCTCTGTGCTGGC	GGACTGCAAGTGAATTTG
<i>TvCFEM2</i>	CFEM	51635	215	140	GGTTGACATATGGGTTTTGG	TGGATAAGAGACCGAAGACG
<i>TvMphos1</i>	Metalophos	211744	84	84	TGGTTCGCGACCTACAGTGACATT	GTAGAACCAGCCACCAAACGCAA
<i>TvLp1</i>	Lipoproteína	77560	167	113	ATCAACTGCGAGGACAACCTCACT	TTGCAGGTGTTGGGAGCAACAAG
<i>TvCyt1</i>	P450	46089	186	186	TCTGGAGCAGTGGGAATCAAGGT	TTTCTTGACCAAGACAGCCGAGA
<i>TvCyt2</i>	P450	190045	121	121	AAGCATCTACCCGATGGGTTTCCA	CGTTTGCCATTTGCCTCTCAACGA
<i>sm1</i>	Ceratoplatanina	110852	289	223	CTGCCCGCTCTCCGCGGACAC	TGCTGGAAGCTGCAATACAG
<i>ep1</i>		302952	254	254	GCCGAGTCTCTGCTGATAC	GGGTTTGCCAGTGGTATCT
<i>gpd</i>	Ctl de expresión	2143408	267	189	GCTGCCGATGGTGAGCTCAAGGG	GAGGTCGAGGACACGGCGGGA
<i>ech42</i>	endoquitinasa	131598	112	112	CTGGCCCTCTATCTTCAATCTC	GTTGAGGCTCCGGTTACA
<i>cbh1</i>	celobiohidrolasa	302419	105	105	CTGGCCCTCTATCTTCAATCTC	GTTGAGGCTCCGGTTACA

Adicionalmente, se utilizaron oligonucleótidos para amplificar una región correspondiente al gen que codifica para una gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gpd*), que tiene una expresión constitutiva y que se utilizó como control endógeno en los ensayos de expresión (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). También se diseñaron iniciadores para los genes *sm1* y *ep11* que codifican para cerato-plataninas de *T. virens* y *T. atroviride*, respectivamente, para ser utilizados como controles positivos de expresión en los diversos ensayos realizados. Como controles de expresión en respuesta a las fuentes de carbono se incluyeron iniciadores para los genes de *T. atroviride* *ech42* y *cbh1* que codifican para una endoquitinasa y una celobiohidrolasa, respectivamente (Carsolio *et al.*, 1994; Linger *et al.*, 2015).

Para el RT-PCR se utilizó ADNc de diferentes tiempos y condiciones de colecta; para cada reacción se tomaron 50 ng de ADNc, en un volumen total de 20 μ L, las reacciones de PCR contenían: amortiguador de reacción 1X, ADNc de cada una de las muestras, dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 2.5 μ M, Taq DNA polimerasa 1 U y los oligonucleótidos directo y reverso de cada uno de los genes a una concentración final de 2 μ M. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 25 ciclos a 95 °C/30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/1 min, y una extensión final de 72 °C/5 min.

Análisis de la expresión por qPCR.

Para los ensayos de qPCR se utilizó ADNc de diferentes tiempos y condiciones de colecta, utilizando el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Los datos obtenidos del tiempo real se analizaron por el método $2^{\Delta\Delta Ct}$, el cual permite comparar el nivel de expresión de una muestra en

una condición dada (micelio colectado en interacción con la planta) con respecto de una muestra control (micelio crecido sólo), normalizando los datos con respecto a la expresión de un gen endógeno (*gpd*).

Por disponibilidad de los equipos en los tiempos requeridos, para los genes *TaL6*, *TaCFEM5* y *TvCyt2* los ensayos se realizaron en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System y el programa StepOne Plus (Applied Biosystems) para analizar los datos de expresión. Para los candidatos *TaCFEM4* y *TaGH1*, las pruebas se realizaron en el equipo CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) y se utilizó el programa BioRad CFX Manager 3.1 (BioRad).

Electroforesis de las muestras de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a concentraciones del 0.8 % o 1 %, como a continuación se indica: un volumen de las muestras se mezcló con amortiguador de corrida (azul de bromofenol 0.25 %, xilencianol FF 0.25 % y glicerol 30 %); los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg/mL), utilizando amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 0.40 M y EDTA 1 mM). Las electroforesis se efectuaron a 90 V por 40-60 min y posteriormente los geles fueron observados en un transiluminador de luz UV. Para los análisis densitométricos de los geles, se utilizó el programa ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. <http://imagej.nih.gov/ij>).

Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.

Una vez contando con las diferentes muestras de ADN, se procedió a purificar los fragmentos de interés siguiendo las indicaciones del sistema comercial, Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific®). El

ADN purificado se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La pureza se verificó en un gel de agarosa al 1 %.

Ligación y transformación de los productos de PCR en el vector de mantenimiento.

La ligación de los fragmentos obtenidos y transformación de células *E. coli* Dh5 α se realizaron siguiendo las indicaciones de los proveedores de los vectores de mantenimiento pJET 1.2 /blunt (Thermo Scientific®) o pCR2.1-TOPO (Invitrogen®). Para el caso del vector pJET 1.2 /blunt se realizó una mezcla de ligación que contenía: 2 μL de muestra purificada de PCR, 5 μL de amortiguador de reacción 2X, 0.5 μL del vector, 0.5 μL de T4 DNA ligasa y agua necesaria para un volumen final de 10 μL . Tras una centrifugación de 30 seg, la mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente.

Para el vector pCR2.1-TOPO se realizó la mezcla de ligación que contenía: 3 μL de muestra de PCR purificada, 1 μL de solución salina y 0.5 μL de vector y el resto de agua necesaria para un volumen final de 6 μL . La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente. De las reacciones de ligación se tomaron 3 μL para transformar 25 μL de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . Las bacterias se incubaron por 20 min en hielo, seguidas de un choque térmico de 40 s a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. A las células se les adicionaron 250 μL de medio LB y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en agitación de 200 rpm durante 1 h. 50 μL de células se inocularon en medio selectivo LBA conteniendo ampicilina a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14-16 h.

Construcción de las fusiones de las posibles secuencias de efectores a la proteína fluorescente mCherry.

La estrategia se basó en la generación de cepas sobreexpresantes de los genes de interés fusionados al ORF del gen codificante de la proteína fluorescente mCherry utilizando el vector de expresión pUE08. Una vez que se tenían las secuencias de los genes de interés, se realizó el diseño de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos directos cuentan con sitios de restricción específicos y a los oligonucleótidos reversos se le adicionó una secuencia complementaria al gen mCherry. Para la amplificación del gen mCherry, se diseñó un oligonucleótido directo y los oligonucleótidos reversos cuentan con sitios de restricción específicos. La amplificación del gen mCherry se realizó a partir de la secuencia contenida en el vector pRSET B. Las características de los iniciadores permitieron realizar tres rondas de amplificación para obtener las construcciones deseadas.

En la Tabla 5 se enlistan los oligonucleótidos diseñados para este experimento.

Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados para las fusiones a mCherry. Se enlista la nomenclatura. También se muestra el tamaño del amplicón esperado y los sitios de restricción añadidos a los oligonucleótidos.

Oligo	Secuencia 5'→3'	T _m (°C)	Tamaño del fragmento	Sitio de restricción
TaL6-F	GCGGCCGCATGAAGCTGTTAACTTTCAGTC	66	2273	<i>NotI</i>
TaL-mCherry R	GTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTCTGTAACACGAGCAGCGGCAGC	76		
mCherry- F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	62	717	
mCherry R	AAGCTTCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	63		<i>HindIII</i>
TaCFEM5-F	GGATCCATGCTTCGGAGACTATCACTTG	61	1365	<i>BamHI</i>
TaCFEM5-mCherry R	GTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATTGCTTGAATAATCCACCGATTG	71		
mCherry- F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	62	717	
mCherry R	GAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	62		<i>EcoRI</i>

La PCR I consistió en amplificar por separado los marcos de lectura de los genes de interés y el del gen mCherry. Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60°C y 3 min de extensión a 68 °C, con un tiempo final de 10 min a 68 °C. Para el gen mCherry el tiempo de extensión fue de 1 min. Una vez obtenidos los fragmentos se purificaron por separado en columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific).

Para la PCR II, se utilizaron los fragmentos de la PCR I previamente purificados y analizados. Ambos fragmentos funcionan como iniciadores para obtener un producto donde quede fusionada la secuencia del gen de interés al ORF de mCherry. Se cuantificaron los fragmentos obtenidos y se utilizó una relación molecular 1:1 como templado para esta PCR. Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65°C y 4.5 min de extensión a 68°C, con un tiempo final de 10 min a 68 °C.

Para la PCR III, se utilizaron los oligonucleótidos directo del gen de interés y el reverso del gen mCherry, los cuales contienen sitios de corte para su posterior ligación en el vector de expresión pUE08. Para la reacción se utilizó como templado 2.5 µL de la reacción del PCR II, y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 6.5 min de extensión a 68 °C, y un tiempo final de 10 min a 68 °C. En la Figura 3 se esquematizan los tres pasos de amplificación realizados.

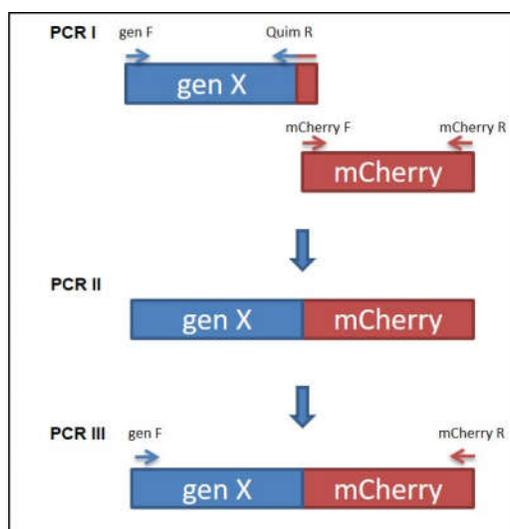


Figura 3. Esquema de los productos de amplificación para la obtención de las fusiones de los candidatos a efectores con mCherry. Se esquematizan los tres pasos de amplificación realizados y los oligonucleótidos utilizados para cada ronda.

Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific), después de lo cual fueron ligados en el vector de mantenimiento pJET 1.2 /blunt (Thermo Scientific®) o pCR2.1-TOPO (Invitrogen®), se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α (descrito a detalle en la sección IV.5.13). Mediante PCR en colonia y utilizando los iniciadores que amplifican los genes de interés, se corroboró la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina (100 μ g/mL).

Una vez hecho esto, se hizo la correspondiente purificación de ADN plasmídico (método antes descrito), el cual se digirió con las enzimas correspondientes y se purificaron los fragmentos de interés mediante geles de agarosa al 1 % para su ligación al vector pUE08. Para la ligación se siguieron las indicaciones del kit T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). Las condiciones fueron: 2 μ L de amortiguador T4 ligasa, vector pUE08 y fragmento del gen de interés en relación 1:3, T4 ligasa 0.2 μ L y agua (cbp 20 μ L), la reacción se incubó por 20 min

a temperatura ambiente para después transformar células competentes de *E. coli* DH5 α que se crecieron en medio LB suplementado con cloramfenicol (34 μ g/mL). Nuevamente se hizo la verificación de la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes. Se purificó ADN plasmídico y al menos dos de las clonas positivas se mandaron secuenciar. Una vez que se tuvo la secuencia, se realizó nuevamente una purificación de ADN plasmídico, se transformaron protoplastos de *T. atroviride* y se seleccionaron posibles transformantes.

Interrupción de genes de *Trichoderma* por PCR de fusión.

Para la interrumpir genes por la técnica de doble unión por PCR, se tomó como base lo reportado por Davidson *et al.* (2002) y por Yu *et al.* (2004), los cuales se basan en la interrupción de un gen *in vitro* usando la técnica de PCR. Se obtuvieron al menos 1.5 kb de la secuencia flanqueante al gen de interés para fusionarlos a los extremos 5' y 3' del marcador de selección, en este caso el gen *hph* que codifica una higromicina fosfotransferasa. Esto para facilitar el evento de recombinación homóloga y consecuentemente el reemplazo del gen silvestre por la construcción que porta el gen interrumpido por el marcador de selección. Las 3 rondas de amplificación se llevaron a cabo utilizando la polimerasa High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific) y se realizaron como sigue:

Para realizar la interrupción de cada uno de los genes de interés, se diseñaron 6 iniciadores, así como los oligonucleótidos HygF (5'-GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG-3') y HygR (5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG-3') que amplifican el marcador de selección, de tal manera que cuatro de éstos (denominados PF, Quimérico-F,

Quimérico-R y TR) amplifiquen sólo las regiones adyacentes al *locus* que se requiere eliminar.

Para el diseño de los oligonucleótidos, se realizó una búsqueda manual de secuencias que contuvieran un porcentaje de GC mayor del 50 % y que el extremo 3' contuviera al menos dos G o C. Las secuencias se evaluaron en el programa oligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), para analizar que los oligonucleótidos no formaran dímeros o estructuras secundarias estables que interfirieran con la unión por complementariedad con las secuencias blanco. Para los oligonucleótidos quiméricos, además de la secuencia del gen que se desea eliminar, a cada uno de los oligonucleótidos se le agregaron las siguientes secuencias del ORF *hph* (Tabla 6):

Tabla 6. Oligonucleótidos quiméricos empleados para la interrupción de los genes de interés.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Quimérico-R	OligonucleótidoR-GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAGCA
Quimérico-F	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG-OligonucleótidoF

En la Tabla 7 se enlistan los oligonucleótidos diseñados para realizar la interrupción de los genes de interés.

Tabla 7. Oligonucleótidos diseñados para las interrupciones de los genes de interés.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Longitud	% GC
PF <i>TaL6</i>	GCATTGCAGTTCGATTGGCAGC	61	22	55%
TR <i>TaL6</i>	CTGGGATGACTGCTCGAAGAGG	60	22	59
<i>TaL6</i> F Nest	CGCAGCCGGTGTATCTACCG	61	20	65
<i>TaL6</i> R Nest	GACTCTTCCCATGGCGCG	59	18	67
QuimF <i>TaL6</i>	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGGCTGCCGCTGCTCGTGTTACAG	77	52	62
QuimR <i>TaL6</i>	TGCTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATCTTGATCTCTGCGCAGGCTGG	71	51	49
PF <i>TaCFEM5</i>	CGCCACAGCTGTTGGTCATG	60	20	60
TR <i>TaCFEM5</i>	CGGCGTCATTGTAAGGAGCG	60	20	60
<i>TaCFEM5</i> F Nest	CGGCTGGACGACTGTGATAGG	60	21	62
<i>TaCFEM5</i> R Nest	CGATGGATGGTGCGGGTACC	61	20	65
QuimF <i>TaCFEM5</i>	CCC AGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGGCTGTGAGTTACCGAGATGAACAT	75	55	55
QuimR <i>TaCFEM5</i>	TGCTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATCTGCTTCTGCGTTGATGGACTGCTC	71	53	47

Para la primera ronda de PCR, se amplificaron por separado los extremos 3' y 5' del gen a interrumpir y del marcador de selección (Figura 4). Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 3 min de extensión a 68 °C, con un tiempo final de 10 min a 68 °C para los extremos 5' y 3', mientras que para el marcador *hph* la temperatura de extensión fue a 72 °C. Se utilizaron los iniciadores quiméricos para esta primer PCR, que contienen secuencias complementarias al marcador de selección. Los 3 productos de PCR se purificaron por separado por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific).

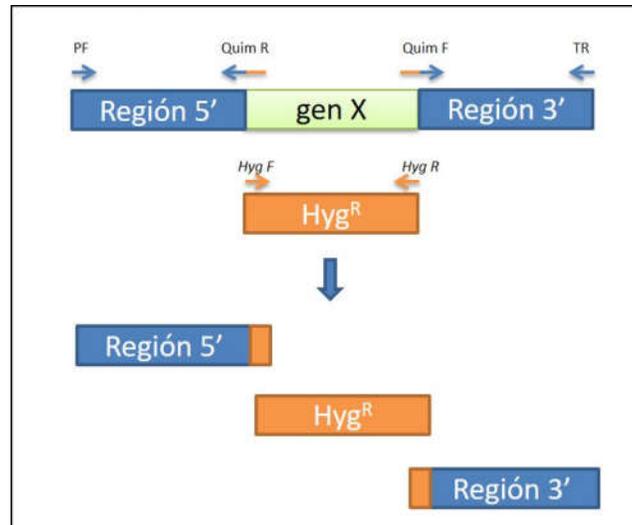


Figura 4. Esquema de la PCR 1 para la interrupción del gen de interés. Se muestra la amplificación por PCR del marcador de selección y de secuencias 5' y 3' adyacentes al locus que se requiere reemplazar.

La segunda ronda de PCR se realizó con los fragmentos de la PCR 1 previamente purificados y analizados. A esta reacción no se le adicionan oligonucleótidos, ya que los extremos 5' y 3' llevan secuencias complementarias al marcador de selección y éstas actúan como iniciadores para la polimerización y fusión de los fragmentos. Se cuantificaron los fragmentos obtenidos y se utilizó una relación molecular 1:3:1 (extremo 5': ORF *hph*: extremo 3') como templado para esta PCR. Las condiciones de amplificación fueron: 3 min a 94 °C, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 6.5 min de extensión a 68 °C, con un tiempo final de 10 min a 68 °C. En la Figura 5 se esquematiza este paso.

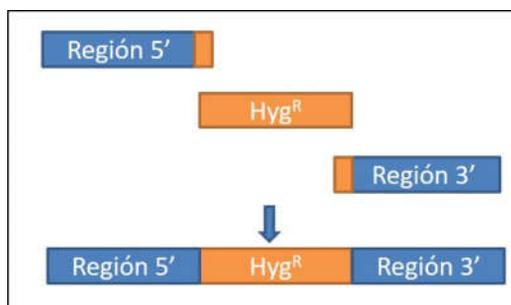


Figura 5. Esquema de la PCR 2 para la interrupción del gen de interés. Se muestra la amplificación por PCR del marcador de selección flanqueado por las secuencias 5' y 3' adyacentes al locus que se requiere reemplazar.

Finalmente se llevó a cabo la PCR 3, utilizando los oligonucleótidos anidados para cada uno de los genes seleccionados. Este paso se hizo con la finalidad de contar con una cantidad suficiente de la construcción de interrupción del gen (Figura 6). Para la reacción se utilizaron como templado 2.5 μ L de la reacción del PCR2, y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 6.5 min de extensión a 68 °C, y un tiempo final de 10 min a 68 °C. Los productos de la PCR se purificaron por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific) y se utilizaron para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

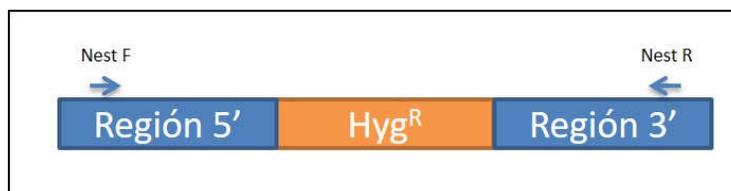


Figura 6. Esquema de la PCR 3 para la interrupción del gen de interés. Se muestra la amplificación por PCR de la construcción para la interrupción de las secuencias a reemplazar.

Obtención de protoplastos de *Trichoderma*.

Se realizó siguiendo lo reportado por Velázquez *et al.* (2011), básicamente consistió en: inocular 50 mL de PDB con 1×10^6 conidias/mL e incubar a 28 °C durante 16-20 h con agitación constante. El micelio se colectó por filtración en un

embudo con cono de tela estéril y se lavó con agua destilada estéril (50 mL). Se pesaron entre 0.2-0.5 g de micelio, se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 5 mL de solución osmótica estéril (CaCl₂ 50 mM, Manitol 0.5 M, MES 50mM, pH 5.5 ajustado con KOH) y extracto enzimático (10mg/ mL) de *Trichoderma* (Glucanex) y se mezcló en vortex. Los tubos se colocaron en un agitador orbital a 100 rpm durante 1-2 h a temperatura ambiente, monitoreando la formación de los protoplastos observando al microscopio cada 45 min.

Los protoplastos se recuperaron, filtrando sobre dos filtros de *miracloth* (de tamaño de poro de 100 y 150 μ m) y se lavaron con 2 mL de solución osmótica. El filtrado se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en el menor volumen posible de solución osmótica (aproximadamente 10 μ L). Se realizó un conteo de los protoplastos obtenidos en cámara de Neubauer, esperando obtener una concentración entre 10⁷-10⁸ de protoplastos en suspensión.

Para la reacción de transformación, se tomaron 250 μ L de la solución de protoplastos y se le adicionaron entre 10-20 mg de ADN resuspendido en solución osmótica. Para la reacción control se tomaron 250 μ L de protoplastos y se adicionó el mismo volumen de solución osmótica usado en la reacción sin ADN. Los tubos con las mezclas se colocaron en hielo por 20 min, posteriormente se les agregó el mismo volumen de PEG 8000 al 40 % (precalentado a 42 °C), se mezclaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. Los protoplastos se colocaron en 5-10 mL de agar suave y se dispersaron en una placa con PDA-Higromicina. Los protoplastos se dividieron en por lo menos 2 placas. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que aparecieron

transformantes. La reacción control se dividió en dos: una parte se dispersó sobre PDA suave para monitorear la regeneración de los protoplastos (control positivo) y otra parte se dispersó sobre PDA-Higromicina para usarlo como un control negativo del crecimiento sobre medio con higromicina.

Verificación del reemplazo del gen de interés en las transformantes.

Se realizó extracción de DNA genómico siguiendo el protocolo antes descrito, de cada una de las transformantes obtenidas de *Trichoderma*. Para verificar si la construcción con el marcador de selección se había recombinado en el *locus* correcto, se utilizaron iniciadores ubicados en los extremos 5' y 3' del gen (Tabla 8), que no estuvieran contenidos en la construcción e iniciadores contenidos en el marco de lectura abierto del marcador de selección (nombrados ctrl F y ctrl R) y oligonucleótidos que se encontraran dentro de la secuencia del gen marcador *hph* (nombrados Hyg ctrl F y Hyg ctrl R); las condiciones de amplificación para estas reacciones fueron: 3 min a 95 °C, 28 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 3 min de extensión a 72 °C, y un tiempo final de 10 min a 72 °C. También se utilizaron oligonucleótidos contenidos dentro de la región del gen a reemplazar (mismos oligonucleótidos utilizados para RT-PCR y mismas condiciones de amplificación), esperando que no hubiera amplificación, así como la amplificación del gen marcador (*hph*), cuyas condiciones de amplificación fueron: 3 min a 95 °C, 28 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1.5 min de extensión a 72 °C, y un tiempo final de 10 min a 72°C (Figura 7). En todos los casos se utilizó ADN genómico de las transformantes y el ADN de la cepa silvestre como control. Los productos de las PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Cuando se obtuvieron amplificaciones de los tamaños

esperados usando los oligos ctrl F/Hyg ctrl R, ctrl R/Hig ctrl F y la amplificación del marcador de selección *hph* se procedió a realizar los pases monospóricos correspondientes.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la verificación de las interrupciones de los genes de interés.

Nombre	Secuencia	Long (nt)	Tm	%GC
<i>TaL6</i> ctrl F	GTCGCGCGATTTGCTGACG	19	61	63
<i>TaL6</i> ctrl R	GGGTTCTCGCCACCACGATAC	21	61	62
<i>TaCFEM5</i> ctrl F	GCAAACGAGTGCACAACGGC	20	61	60
<i>TaCFEM5</i> ctrl R	GCGGCGACGGAATTTGGG	18	61	67
Hyg ctrl F	CAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG	28	65	57
Hyg ctrl R	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATC	27	56	41

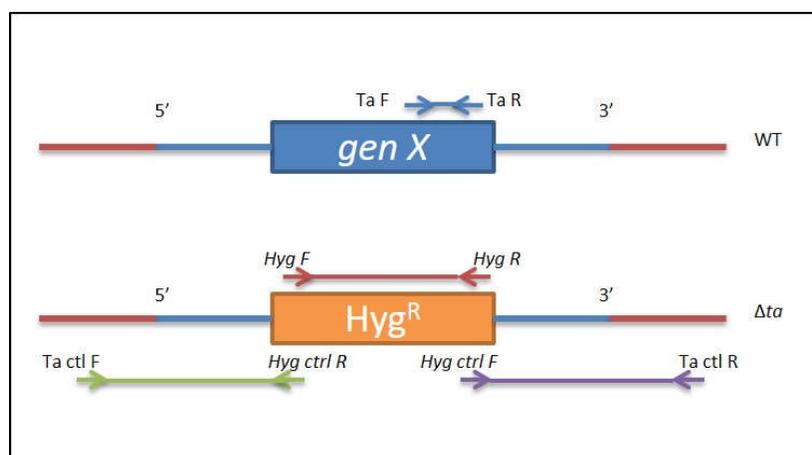


Figura 7. Representación gráfica de las amplificaciones por PCR a obtener para validar la correcta interrupción de los genes de interés. Se marcan los oligonucleótidos utilizados para cada una de las amplificaciones.

Obtención de cepas sobreexpresantes de *Trichoderma*.

Para la sobreexpresión de los genes *TaL6* y *TaCFEM5*, lo primero que se realizó fue el diseño de oligonucleótidos que amplificaran todo su marco de lectura abierto y que además contuvieran sitios de restricción para la posterior inserción en el

plásmido de expresión pUE08. En la Tabla 9 se muestran los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes y el sitio de restricción adicionado.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del marco de lectura abierto de los genes de interés.

Oligo	Secuencia 5'→3'	T _m (°C)	Tamaño fragmento	Sitio de Restricción
TaL6-pUE08 F	GCGGCCGCGAAAATTCCTGATCACGAATGTG	54	2721 pb	<i>NotI</i>
TaL6-pUE08 R	AAGCTTAATTTGTATGTGGTTATTCATTTTGC	53		<i>HindIII</i>
TaCFEM5-pUE08 F	GGATCCTGCTTTAGCAGCAAGAAGAGAGC	58	1461 pb	<i>BamHI</i>
TaCFEM5-pUE08 R	GAATTCTTTTTTTCATATGTCTGTCATGC	52		<i>EcoRI</i>

Las condiciones de amplificación para ambos genes fueron: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 6.5 min de extensión a 68 °C, y un tiempo final de 10 min a 68 °C. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % y se purificaron por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific), después de lo cual fueron ligados en el vector de mantenimiento pCR2.1-TOPO (Invitrogen®), se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α (descrito a detalle en la sección IV.5.13). Mediante PCR en colonia y utilizando los iniciadores que amplifican los genes de interés, se corroboró la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina (100 µg/mL). Una vez hecho esto se hizo la correspondiente purificación de ADN plasmídico (método antes descrito), el cual se digirió con las enzimas correspondientes y se purificaron los fragmentos de interés mediante geles de agarosa al 1 % para su ligación al vector de expresión pUE08. Para la ligación se siguieron las indicaciones del kit T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) las condiciones fueron: 2 µL de amortiguador T4 ligasa, vector pUE08 y fragmento del gen de interés en relación 1:3, T4 ligasa 0.2 µL y agua (cbp 20 µL), la reacción se incubó por 20 min a temperatura ambiente para

después transformar células competentes de *E. coli* DH5 α que se crecieron en medio LB suplementado con cloramfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nuevamente se hizo la verificación de la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes. Se purificó ADN plasmídico y al menos dos de las clonas positivas se mandaron secuenciar. Una vez que se tuvo la secuencia, se realizó nuevamente una purificación de ADN plasmídico, con el que se procedió a realizar la transformación de protoplastos de *Trichoderma* como ya se mencionó anteriormente.

Una vez que se obtuvieron las cepas sobreexpresantes, a tres de ellas, se les realizó una extracción de ADN para su posterior síntesis de ADNc y se determinó la expresión de los genes de interés mediante RT-PCR. Con las sobreexpresantes que mostraron una mayor expresión, se seleccionaron para realizar interacciones con las líneas marcadoras de *A. thaliana* antes descritas y ensayos de confrontación con las cepas de *R. solani*.

Análisis de la localización de los candidatos durante la interacción planta-*Trichoderma*.

Con las cepas obtenidas que contienen las fusiones a la proteína mCherry, se realizaron microcultivos de 48 h, se tomó micelio y se observó al microscopio confocal Zeiss.

Análisis de la secuencia promotora.

Para la búsqueda de elementos de respuesta a diferentes factores ambientales, se tomaron 1500 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) de los genes seleccionados. Se usaron las herramientas bioinformáticas TFSERCH-Searching Transcription Factor Binding Sites versión 1.3

(<http://diyhpl.us/~bryan/irc/protocol-online/protocol-cache/TFSEARCH.html>) y Cister: Cis-element Cluster Finder (<http://zlab.bu.edu/~mfrith/cister.shtml>). Para ambos programas se usaron los parámetros predeterminados. También se analizaron con el programa SnapGene® 2.5. Únicamente se consideraron como posibles elementos regulatorios aquellas secuencias que fueron encontradas utilizando más de una de las herramientas empleadas.

Análisis histoquímico de GUS.

Para el análisis histoquímico de la actividad GUS, una vez recuperadas las plántulas de *Arabidopsis* (líneas transgénicas pLox2:*uidA* y pPR1:*uidA*) de los diferentes tratamientos, se incubaron toda la noche a 37 °C en una solución de reactivo de GUS (0.5 mg/mL 2,1 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido en 100 mM de fosfato de sodio, pH 7). Las plántulas teñidas se clarearon usando el método de Malamy & Benfey (1997). Para cada línea marcadora y para cada tratamiento, se analizaron al menos 20 plantas transgénicas.

Análisis estadístico.

Puesto que los datos obtenidos no tenían una distribución normal, se procedió a realizar un análisis de Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* de Dunns para comparar los resultados obtenidos de los valores del análisis densitométrico de la expresión de las secuencias por RT-PCR y los valores obtenidos de la expresión por qRT-PCR, con un valor de significancia $p < 0.05$.

RESULTADOS

Selección de genes codificantes de posibles proteínas tipo efector.

El criterio para elegir de las secuencias a analizar a partir de la lista de 233 candidatos reportados por Guzmán y colaboradores (2017), fue seleccionar aquellas secuencias filogenéticamente más relacionadas entre *T. virens* y *T. atroviride* y más alejadas de *T. reesei*. Este criterio se basó en la consideración de que *T. virens* y *T. atroviride* tienen un estilo de vida micoparasítica y pueden interactuar con plantas a diferencia de *T. reesei* que vive principalmente como saprobio y para el cual a la fecha no hay reportes que evidencien su interacción con plantas. En la Figura 8 se muestra un ejemplo de la selección realizada.

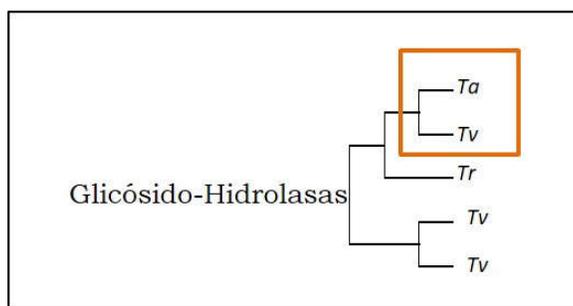


Figura 8. Ejemplo de la selección de genes candidatos a efectores a analizar en este trabajo. Árbol filogenético de los candidatos a efectores de la familia de las glicósido-hidrolasas de *Trichoderma*. En el recuadro se indica la posición de las secuencias a selección para este trabajo.

Considerando lo anterior, se obtuvieron 21 genes a estudiar, 13 de *T. atroviride* y 8 de *T. virens*, que pertenecen a once familias diferentes y uno que no presentó homología con ninguna familia conocida; doce de ellas presentan un dominio similar al RXLR. En la Tabla 10 se enlistan los candidatos seleccionados con la nomenclatura dada, la familia a la que pertenecen, su ID (www.jgi.com) y la secuencia similar al RXLR en caso de contenerla. Cabe señalar que a la

secuencia con el ID 297859 fu reportada por Seidl y colaboradores (2013) como TaL6, por ello se utiliza el nombre que ellos le asignan.

Tabla 10. Candidatos a efectores seleccionados de *T. atroviride* (Ta) y *T. virens* (Tv). En la tabla se enlista la nomenclatura dada a cada una de las secuencias, la familia a la que pertenecen, el ID (www.jgi.com) y la secuencia similar al RXLR en caso de contenerla. (Selección realizada en septiembre del 2012).

Clave	Familia	ID	Motivo
<i>TaL6</i>	LysM	297859	NA
<i>TaLysM3</i>	LysM	85797	KSLR
<i>TaCFEM2</i>	CFEM	171091	NA
<i>TaCFEM3</i>	CFEM	30137	NA
<i>TaCFEM4</i>	CFEM	252553	NA
<i>TaCFEM5</i>	CFEM	300847	NA
<i>TaGH1</i>	Glicosido-hidrolasas 3	80985	KQLR
<i>TaLp1</i>	Lipoproteína	283182	RNFK
<i>TaFAD1</i>	Unión-FAD	264681	RLLH
<i>TaDNAJ1</i>	DnaJ	32141	RSLH
<i>TaPrR1</i>	Pyr-Redox	146823	RHLH
<i>TaCup1</i>	Cupin-1	89075	REMH
<i>TaX1</i>	No-hit- S23	320112	RSFR
<i>TvLysM3</i>	LysM	124493	NA
<i>TvTrx2</i>	Tiorredoxina	112058	NA
<i>TvCFEM1</i>	CFEM	44825	NA
<i>TvCFEM2</i>	CFEM	51635	NA
<i>TvMphos1</i>	Metalfosfatasa	211744	KKLR
<i>TvLp1</i>	Lipoproteína	77560	KQLR
<i>TvCyt1</i>	P450	46089	RWLK
<i>TvCyt2</i>	P450	190045	RLLK

Interacciones *Trichoderma-Arabidopsis* y análisis de la expresión diferencial de posibles efectores en *Trichoderma* spp.

Se realizaron interacciones de *T. atroviride* y *T. virens* con plántulas de *A. thaliana* Col-0 como se describe en materiales y métodos. Las colectas de micelio

de *Trichoderma* se realizaron a los tres, cinco y siete días. En la primera colecta (3dpi) el micelio de las dos especies de *Trichoderma* aún no tocaba la raíz de *Arabidopsis*. En la segunda colecta (5dpi) el micelio *T. atroviride* comenzaba a tocar las raíces de *Arabidopsis*, mientras que para *T. virens* el micelio ya se encontraba sobre la raíz, cubriendo aproximadamente una tercera parte de su longitud. En tercera colecta (7 dpi) el micelio de ambas especies se encontraba sobre las plántulas de *Arabidopsis*. En la Figura 9 se muestran imágenes representativas de las interacciones realizadas.

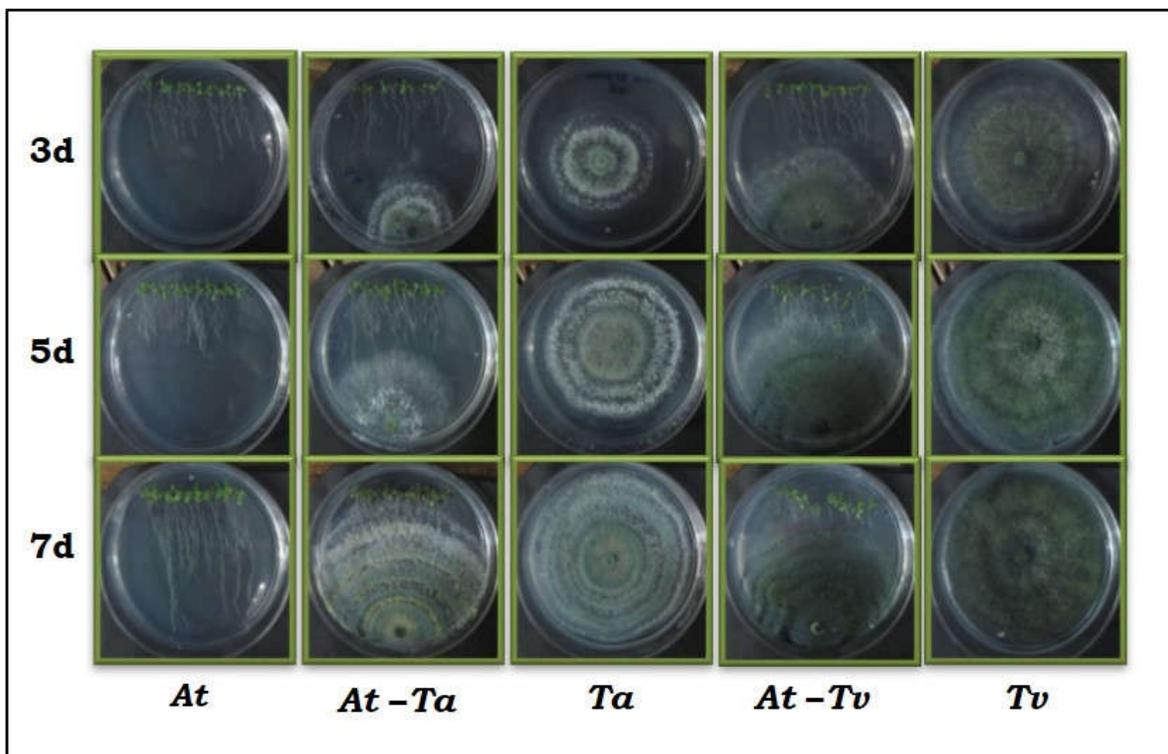


Figura 9. Interacciones de *A. thaliana* con *Trichoderma* spp. Imágenes representativas de las interacciones realizadas con plántulas de *Arabidopsis* (*At*) y *T. atroviride* (*Ta*) o *T. virens* (*Tv*) a los 3, 5 y 7 días de interacción, y de los controles de *Trichoderma* y *Arabidopsis* creciendo solos.

Del micelio colectado a los tiempos descritos se extrajo RNA total para la posterior síntesis de cDNA y llevar a cabo el análisis semicuantitativo de expresión (explicado detalladamente en materiales y métodos) utilizando oligonucleótidos

específicos para cada una de las 21 secuencias, que amplificaban regiones de entre 80 y 200 pb y usando como control endógeno iniciadores para amplificar un fragmento del gen *gpd*.

En la Figura 10 se muestra una imagen representativa de los patrones de expresión de los 21 genes analizados y el promedio de las expresiones obtenidas. Se realizaron cinco réplicas biológicas de estos ensayos. Los candidatos *TaL6*, *TaCFEM4*, *TaCFEM5* y *TaGH1* de *T. atroviride* presentaron una expresión diferencial consistente en la interacción con la planta durante los experimentos realizados. Los candidatos *TaL6*, *TaCFEM5* y *TaGH7* alcanzaron un máximo de expresión a los siete días de interacción con la planta. El candidato *TaCFEM4* mostró una mayor expresión al quinto día de interacción. En el caso de candidatos de *T. virens*, únicamente *TvCyt2* tuvo una expresión diferencial consistente, disminuyendo su expresión durante la interacción en las muestras correspondientes a los dos primeros tiempos analizados. En el experimento se utilizaron como controles los genes *sm1* y *ep11* de *T. virens* y *T. atroviride*, respectivamente, que se sabe se inducen durante la interacción con plantas (Seidl *et al.*, 2006). Sin embargo, en nuestros ensayos no se observó el patrón descrito, probablemente a que los tiempos de interacción y edades de la planta fueron distintos.

Para los cinco candidatos que mostraron expresión diferencial consistente, se validó el comportamiento por qRT-PCR, analizando dos replicas biológicas, cada una con tres réplicas técnicas. Los candidatos *TaL6*, *TaCFEM5*, *TaGH7* y *TvCyt2* tuvieron comportamientos similares a los obtenidos por RT-PCR semicuantitativo.

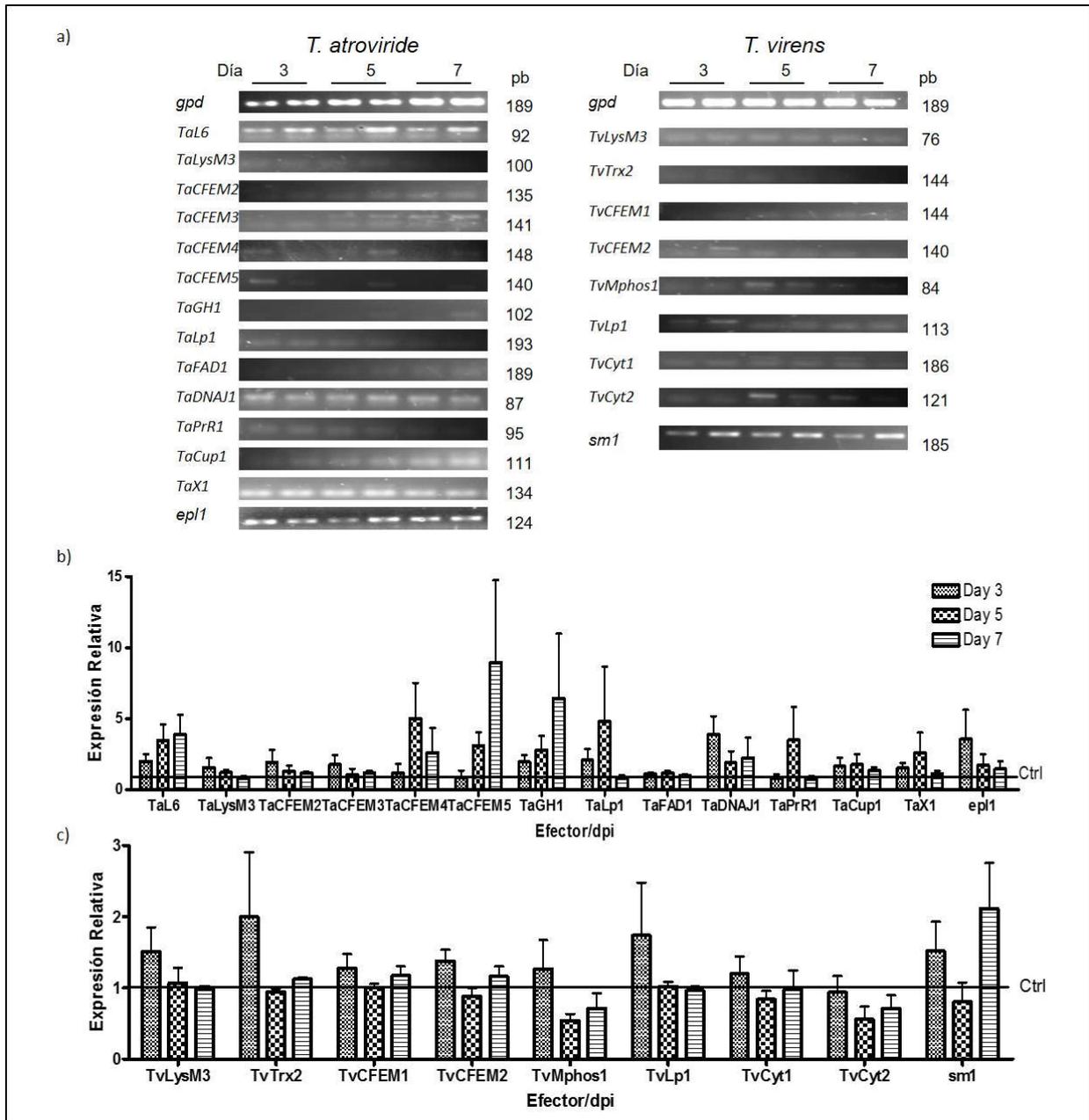


Figura 10. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión de genes candidatos a efectores de *Trichoderma* en interacción con *A. thaliana*. a) Imagen representativa de los ensayos de RT-PCR. Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de los gels de agarosa para los candidatos de *T. atroviride* (b) y *T. virens* (c) Promedio de cinco experimentos independientes. La línea control (Ctrl) corresponde a la expresión obtenida de *Trichoderma* crecido solo.

En el caso del candidato *TaCFEM4*, hubo inconsistencias entre las réplicas biológicas analizadas y con los datos obtenidos por RT-PCR semicuantitativo, por

lo que se descartó para los análisis posteriores. En la Figura 11 se muestran los patrones de expresión de los cinco candidatos validados por q-PCR.

Al realizar un análisis bioinformático de las cuatro secuencias restantes, se encontraron las siguientes características:

El candidato *TaL6* es miembro de la familia de repetidos LysM. Presenta siete motivos LysM, tiene entre un 40 y 60 % de identidad con proteínas hipotéticas LysM de *T. virens*, *Colletotrichum spp*, *Aspergillus spp* y *Fusarium spp*. Además de tener alrededor del 20 % de identidad con una proteína hipotética LysM de *Cladosporium fulvum*. De acuerdo con Seidl y colaboradores (2013), el gen se encuentra adyacente al de la quitinasa Tac6 y ambos comparten sus regiones río arriba, sugiriendo que tienen una misma regulación.

TaCFEM5, es miembro de la familia CFEM (del inglés Common Fungal Extracellular Membrane) y presenta siete regiones transmembranales comunes para esta familia. La secuencia de éste comparte 68 % de identidad con otros miembros CFEM de *T. atroviride* y *T. virens*; además comparte 36 % de identidad con proteínas homólogas en especies de *Magnaporthe*.

TaGH1 es miembro de la familia tres de las glicósido-hidrolasas (GH), que comprende diversas enzimas, entre ellas: β -glucosidasa (EC 3.2.1.21); xilan 1,4- β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) o xilobiosa; β -glucosilceramidasa (EC 3.2.1.45). *TaGH1* presenta alrededor de un 80 % de identidad con otras glicósido-hidrolasas (GH) de *T. atroviride* y de *T. virens*; un 70 % de identidad con otras GH de patógenos como *Colletotrichum* y *Fusarium*, ambas proteínas son reportadas como hipotéticas.

El candidato *TvCyt2* es miembro de la familia p450 monooxigenasas y mostró un 65 % de identidad con otras monooxigenasas de *T. virens* y *T.*

atroviride; 57 % con proteínas de especies de *Colletotrichum* y entre un 30 y 50 % con proteínas hipotéticas de *Fusarium*.

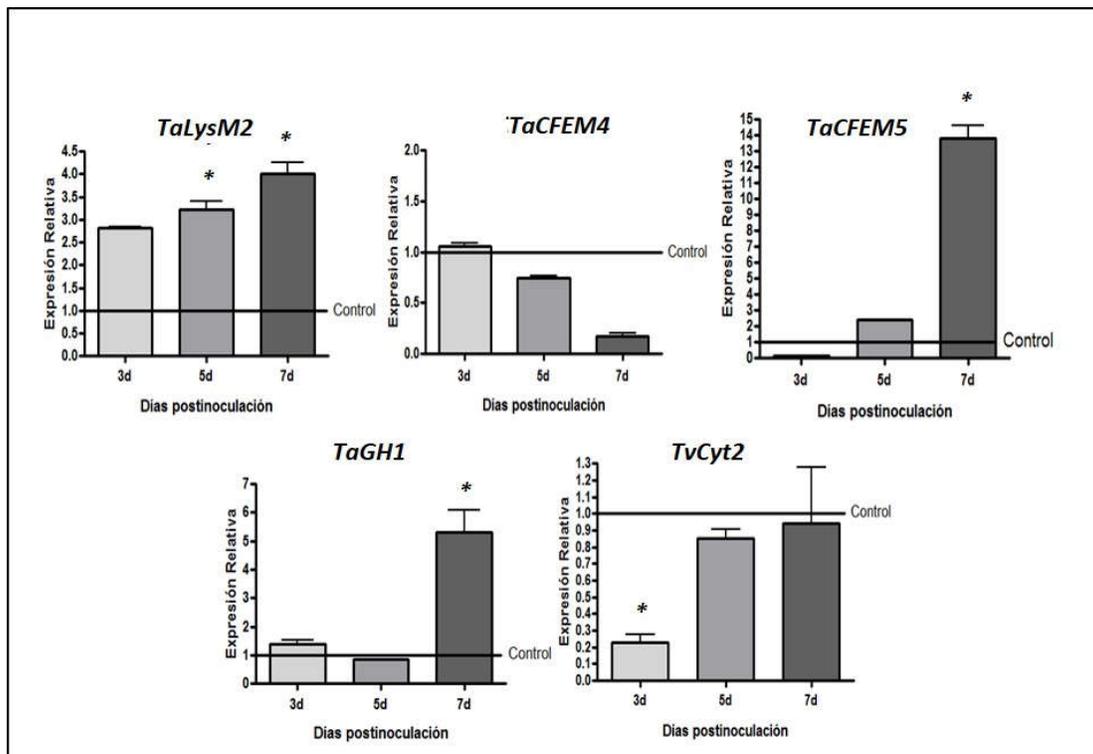


Figura 11. Análisis por qPCR de los patrones de expresión de genes candidatos a efectores de *Trichoderma* en interacción con *A. thaliana*. Las barras son el promedio de dos experimentos independientes con tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control, usando un valor de $p = 0.05$.

Considerando las funciones que tienen miembros de la familia LysM, CFEM y p450 en organismos patógenos y que hasta la fecha es poco lo que se conoce de su participación durante las interacciones benéficas planta-microorganismo, se seleccionaron los candidatos *TaL6*, *TaCFEM5* y *TvCyt2* para los análisis posteriores.

Caracterización del gen *TaL6*.

Análisis de la expresión de *TaL6* en diferentes condiciones de cultivo.

Para conocer más acerca de las moléculas o de las condiciones implicadas en regular la expresión del gen *TaL6* en interacción con la planta, se decidió

analizar su expresión en diferentes fuentes de carbono. Para ello, lo que primero se realizó fue un análisis de la región promotora. Se tomaron 1500 pb río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) y se buscaron secuencias de respuesta a glucosa (CreA) y celulosa (ACEI).

En la Figura 12a, se indica el número de secuencias encontradas: tres secuencias de respuesta a glucosa y dos a celulosa. En la Figura 12b se esquematiza la posición en la cual se encontraron. El análisis se realizó con tres diferentes programas: TF-SERCH; CISTER y SNAPGNE; y únicamente se incluyen las secuencias que se encontraron en al menos dos de ellos.

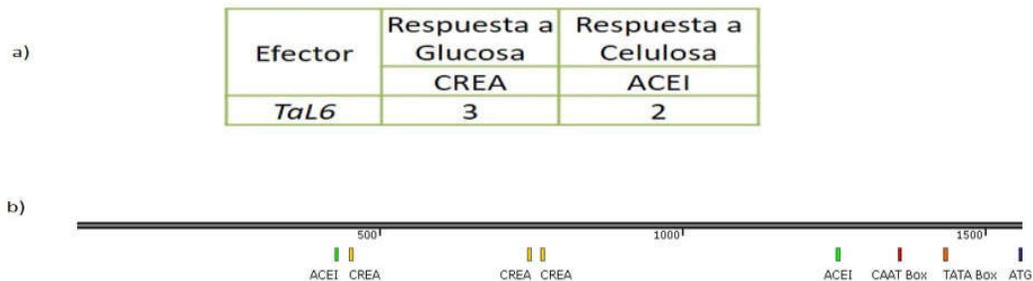


Figura 12. Análisis de la secuencia promotora del gen *TaL6*. a) Elementos de respuesta a diferentes fuentes de carbono encontrados y b) Esquema de la localización de los elementos de respuesta dentro de la región promotora. Se marca el codón de inicio de la traducción (ATG), y las posibles cajas TATA y CAAT.

Una vez realizado el análisis, se procedió a realizar ensayos con medio mínimo Vogel suplementado con celulosa. Las colectas se realizaron a las 2, 6, 24 y 48 h, usando como control los cultivos en medios suplementados con glucosa al 1.5 %, para poder comparar los resultados de expresión obtenidos con los ya reportados para el efector Sm1 de *T. virens* (Djonović *et al.*, 2006). En el caso del gen control *cbh1*, utilizado como control positivo de inducción por celulosa, únicamente se analizó su expresión a las 24 y 48 h, ya que en tiempos tempranos su expresión es indetectable.

Por ser el componente principal de la pared vegetal, primero se decidió realizar los ensayos con celulosa como posible inductor. Sin embargo, no hubo respuesta a la presencia de ésta, no así el gen de referencia *cbh1*, cuya expresión aumentó a las 48 h más de 8 veces con respecto del control (glucosa 1.5 %). En la Figura 13 se grafica la expresión relativa promedio en los experimentos realizados para el gen *TaL6*.

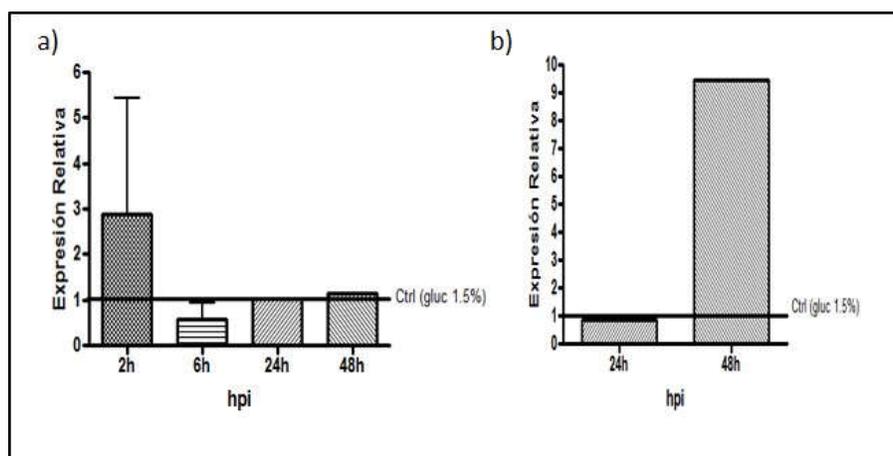


Figura 13. Patrones de expresión del gen *TaL6* en un medio mínimo Vogel con celulosa. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión del gen *TaL6* (a) y el gen control *cbh1* (b), creciendo en medio mínimo con celulosa al 1.5 %. Medio mínimo suplementado con glucosa al 1.5 % se usó como control. Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de geles de agarosa. Promedio de al menos dos experimentos independientes.

Debido a que no hubo respuesta en la inducción de la expresión del gen *TaL6*, se decidió realizar experimentos utilizando paredes celulares vegetales al 0.2 %. Se incluyó también un medio adicionado con exudados de raíz de *Arabidopsis* al 20% (v/v) que, bajo otras condiciones ya se ha probado en el grupo de trabajo que tienen un efecto sobre la expresión de los candidatos aquí analizados (Porrás Troncoso, 2014). Adicionalmente, se decidió incluir un medio con quitina, dada la función que se ha reportado para los efectores LysM en sistemas patogénicos, secuestrando oligosacáridos de quitina previniendo la

activación del sistema inmune de la planta y/o protegiendo la hifa del patógeno del ataque de las quitinasas secretadas por la planta u otros hongos (Van den Burg *et al.*, 2006; de Jonge *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2011).

La expresión del gen *TaL6* tuvo un ligero aumento en su expresión a las 6 h cuando se añadió el exudado de raíz al 20 %. Interesantemente, no hubo una respuesta en presencia de paredes vegetales ni quitina. Los resultados obtenidos para el gen control *ech42* son similares a los reportados en la literatura, al medir su expresión en medio mínimo con quitina al 0.75 % (Carsolio *et al.*, 1994). En la Figura 14 se muestra el análisis de expresión relativa descrito.

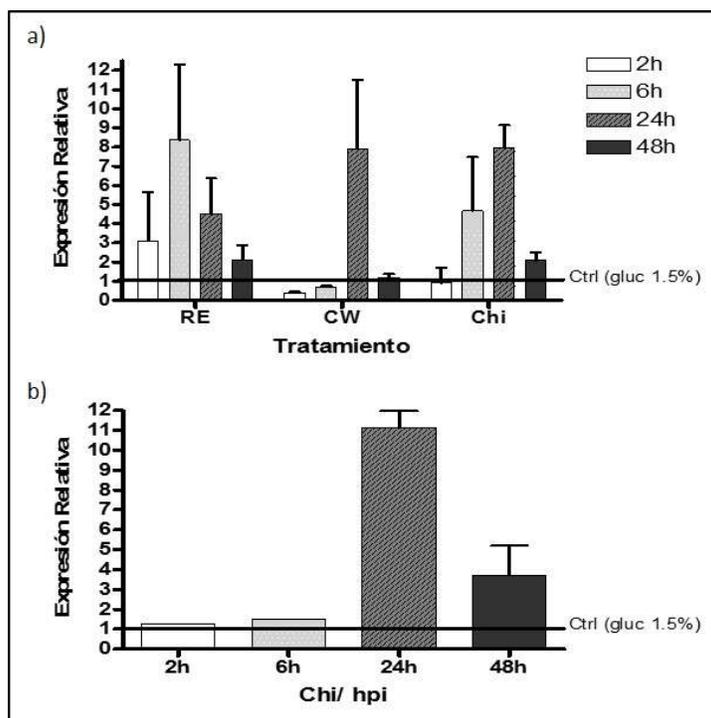


Figura 14. Patrones de expresión del gen *TaL6* en medio mínimo Vogel con exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión del gen *TaL6* (a) y *ech42* (b). Exudados de raíz (RE), paredes celulares vegetales (CW) o quitina (Chi). Promedio de al menos dos experimentos independientes. Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de geles de agarosa. El medio suplementado con glucosa se usó como control y el gen *ech42* se utilizó como control de referencia.

Determinación de la localización del efector *TaL6* durante la interacción planta-*Trichoderma*.

Para determinar la localización de la proteína codificada por el gen *TaL6* en el sistema vegetal, se planteó la estrategia de generar cepas sobreexpresantes de *Trichoderma* que contuvieran el gen de interés fusionado al ORF de la proteína fluorescente mCherry. Se realizaron tres rondas de amplificación usando como templado cDNA de *T. atroviride* y ADN plasmídico del vector pRSET-B que contiene el gen *mCherry*. La primera ronda se realizó para obtener cada uno de los fragmentos por separado. Los tamaños esperados fueron 2273 pb para *TaL6* y 717 pb para los fragmentos de mCherry. En la Figura 15, se muestran los geles donde se observan las amplificaciones antes señaladas.

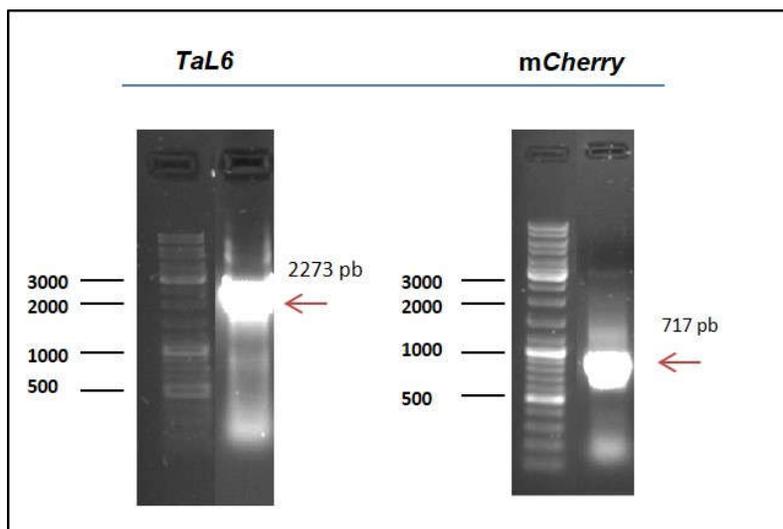


Figura 15. Amplificación de los fragmentos de los genes de los candidatos *TaL6* y *mCherry*. Patrón electroforético en gel de agarosa al 1 % de las reacciones de PCR, usando como templado cDNA para los fragmentos *TaL6* y DNA plasmídico para el fragmento mCherry. En todos los casos se usó marcador de peso molecular para corroborar el tamaño de las bandas esperadas (Gene Ruler DNA Ladder Mix. Fermentas).

Para la segunda ronda de amplificación, el tamaño esperado fue de 2990 pb para la fusión del gen *TaL6-mCherry*. Por último, usando como templado el producto de la segunda ronda, se realizó una última reacción, para obtener una

mayor cantidad de la construcción. En la Figura 16 se muestran los geles con la amplificación obtenida. El fragmento obtenido se purificó de un gel de agarosa y se procedió a ligarlo en el vector de mantenimiento pCR2.1-TOPO.

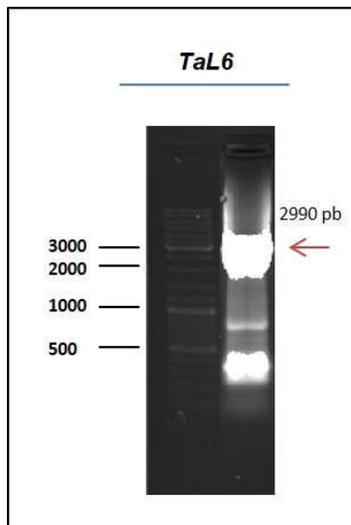


Figura 16. Comprobación de la fusión de *TaL6* a *mCherry*. El fragmento esperado se indica con una flecha.

Por PCR en colonia se analizaron diez clonas, sin embargo, no fue posible obtener clonas que contuvieran el inserto, por lo cual se descartó obtener la construcción.

Obtención de cepas sobreexpresantes del gen *TaL6*.

Para obtener cepas sobreexpresantes del gen *TaL6* de *Trichoderma* se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes, incluyendo sitios de restricción para permitir su ligación al vector de expresión pUE08. Con estos iniciadores se realizó la amplificación correspondiente usando como templado cDNA de *T. atroviride*. El tamaño esperado era de 2721 pb. En la Figura 17 se muestra el gel con el producto obtenido.

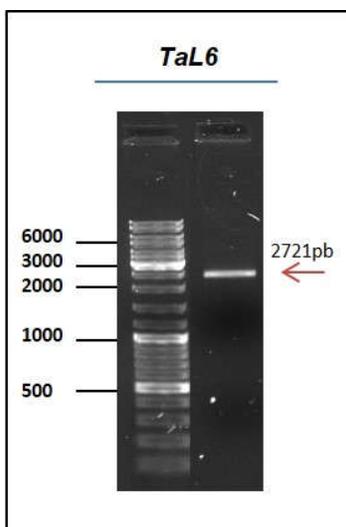


Figura 17. Amplificación del fragmento del gen *TaL6*. Se utilizó cDNA de *T. atroviride* como templado.

El fragmento obtenido se purificó de un gel de agarosa y se procedió a ligarlo en el vector de mantenimiento pCR2.1-TOPO. Por PCR en colonia se analizaron diez clonas y se seleccionó una colonia para extraer DNA plasmídico y mediante una restricción con las enzimas antes citadas, obtener el fragmento de interés para clonarlo en el vector de expresión pUE08. Una vez secuenciado, el plásmido con la construcción se purificó y se utilizó para para transformar protoplastos de *Trichoderma* y obtener la cepa sobreexpresante .

Se obtuvieron tres transformantes independientes denominadas: *TaL6-OE* 1.1, 2.2 y 3.2. Las transformantes 1.1 y 3.2 no mostraron diferencias fenotípicas con respecto a la cepa silvestre, sin embargo, la cepa 2.2 mostró un crecimiento más retardado y aberrante en comparación a la cepa silvestre, cuando se creció en medios mínimos. A las tres sobreexpresantes se les realizaron al menos dos pases monospóricos y se realizó un RT-PCR. Se encontró que la sobreexpresante con una mayor cantidad de transcrito es la cepa 1.1, con un aumento en la expresión del gen de más de dos veces, con respecto a la cepa silvestre. Le siguió

la cepa 3.2 y por último la 2.2, cuyos niveles de sobreexpresión son de menos de 0.5 veces, con respecto a la cepa silvestre. En la Figura 18 se muestran los resultados antes descritos.

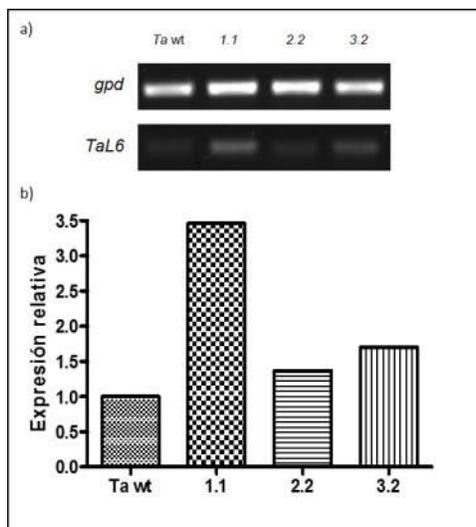


Figura 18. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las sobreexpresantes *TaL6* y su análisis densitométrico. a) Amplificación obtenida a partir de cDNA de muestras de micelio de *Trichoderma* crecido en PDA. Las reacciones se llevaron a 25 ciclos de amplificación. El gen *gpd* se utilizó como control de carga. b) Análisis densitométrico de las cepas sobreexpresantes *TaL6*. Se grafica el análisis densitométrico de una réplica biológica.

Diseño de la construcción para la interrupción del gen *TaL6*

La técnica de doble fusión reportada por Davidson *et al.* (2002) y por Yu *et al.* (2004) fue la utilizada para la generación *in vitro* de las construcciones para, obtener la mutante nula del gen *TaL6*, mediante doble recombinación homóloga.

Para esta técnica se necesita de la amplificación por separado de regiones 5' y 3' flanqueantes al gen de interés, y de una secuencia correspondiente a un marcador de selección, en este caso fue el gen *hph*, codificante de la enzima higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia a higromicina.

La primera ronda de PCR consistió en amplificar dichos fragmentos por separado, utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de las

secuencias, en este caso, el tamaño esperado fue de aproximadamente 1950 pb. En la Figura 19 se muestran las amplificaciones obtenidas.

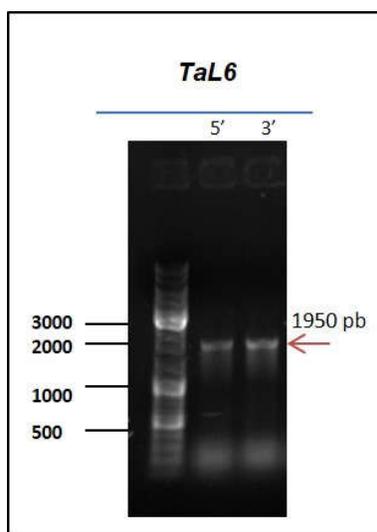


Figura 19. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen *TaL6*. Los fragmentos esperados se indican con una flecha.

El fragmento se purificó y se usó como templado para la PCR II, donde no fue necesaria la adición de oligonucleótidos, ya que las secuencias 5' y 3' amplificadas contenían secuencias complementarias al marcador de selección. A su vez, el producto de la PCR II sirvió como templado para la PCR III, donde se utilizaron los iniciadores denominados Nest para obtener una buena cantidad del casete de interrupción.

El tamaño de la construcción de *TaL6* fue de 5004 pb. En la Figura 20 se muestra la amplificación obtenida. El fragmento se purificó y se procedió a transformar protoplastos de *T. atroviride*.

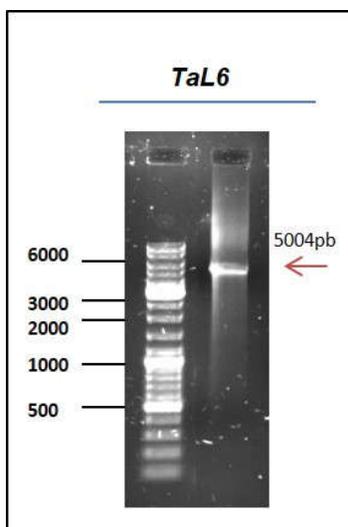


Figura 20. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen *TaL6*. El fragmento esperado se indica con una flecha.

Obtención y selección de mutantes nulas del gen *TaL6*.

Una vez transformados protoplastos de *T. atroviride* con la construcción para la interrupción del gen *TaL6*, se obtuvieron 28 transformantes independientes. Las transformantes presentaron crecimiento en placas de medio selectivo (PDA con higromicina 100 µg/ml). De cada una de las transformantes se obtuvieron conidias, que se cultivaron en PDA para obtener micelio y se extrajo DNA genómico. Mediante PCR con oligonucleótidos control, se determinó en cuáles transformantes se había reemplazado el gen nativo. Se realizaron cuatro reacciones de PCR: la primera amplificación fue de una región correspondiente al gen *hph*, indicando la presencia de la fusión generada, en las siguientes dos reacciones de PCR se esperaba obtener amplificación en caso de que la construcción se hubiera integrado en el sitio deseado, ya que los iniciadores abarcan regiones 5' y 3' fuera de la construcción obtenida. La cuarta reacción consistió en la amplificación de un fragmento interno del gen a interrumpir, de tal manera que la obtención de un amplicón indicaría la presencia del gen silvestre.

En la Figura 21 se muestra un esquema representando las reacciones control realizadas, así como los tamaños esperados para cada una de éstas.

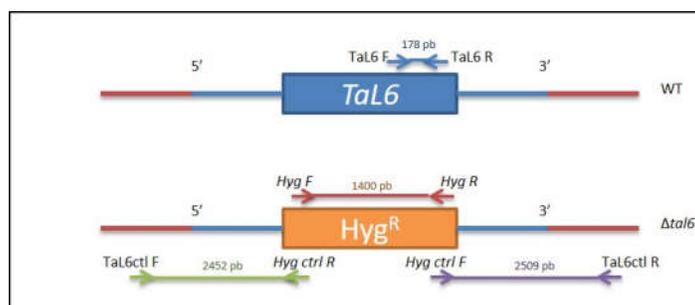


Figura 21. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TaL6*. Esquema representativo de las amplificaciones realizadas para la validación de la correcta interrupción del gen *TaL6*. Se indican los fragmentos esperados en la mutante del gen *tal6*, así como la amplificación esperada en caso de no tener una correcta interrupción (wt).

En las Figura 22 se muestran imágenes representativas de las amplificaciones control de las transformantes obtenidas. En el panel a) muestran los productos obtenidos a partir de cinco transformantes iniciales. En el panel b) se muestran las amplificaciones obtenidas de dos transformantes que fueron seleccionadas para ser sometidas a los pases monospóricos. En el panel c) se muestran los productos obtenidos de las transformantes seleccionadas después de haber realizado al menos cuatro pases monospóricos, donde se observa que las cepas transformantes ya no presentan amplificación del fragmento interno del gen silvestre (carriles 16 y 20).

De los resultados obtenidos se dedujo que algunas de las transformantes obtenidas contenían integraciones ectópicas de la construcción, ya que éstas presentaban resistencia a higromicina, pero no amplificaron las dos reacciones positivas (carriles 2 y 7 de la Figura 22).

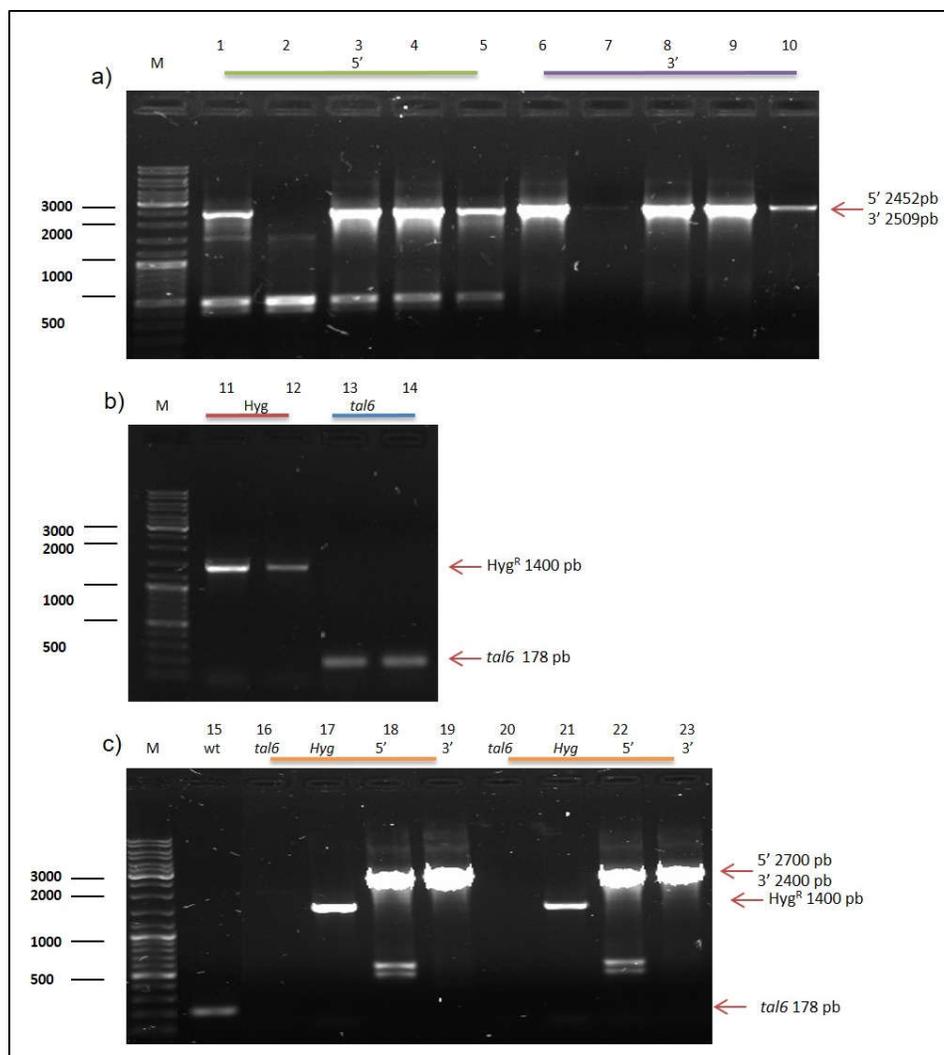


Figura 22. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TaL6*. a) Análisis de la amplificación de los extremos 5' y 3' (reacciones control positivo) de cinco transformantes independientes: T-1 (carriles 1 y 6), T- 2 (carriles 2 y 7), T-3 (carriles 3 y 8), T-4 (carriles 4 y 9) y T-5 (carriles 5 y 10). b) Análisis de la amplificación de los genes *hph* y *TaL6* de dos transformantes independientes: T-3 (carriles 11 y 13), T- 5 (carriles 12 y 14). c) Amplificaciones control de dos transformantes independientes después de al menos cuatro pases monospóricos: amplificación *TaL6* wt (carril 15), T-3 (carril 16) y T-4 (carril 20); *hph* T-3 y T-4 (carriles 17 y 21, respectivamente); oligo 5' (carriles 18 y 22) y oligo 3' (carriles 19 y 23).

Para todos los casos las reacciones de PCR se realizaron a 28 ciclos. Únicamente se obtuvieron dos mutantes, la cual se denominaron $\Delta taL6$ 4.2 y 5.2. Con la finalidad de asegurar la ausencia de mensajeros correspondientes a los genes, se realizó un RT-PCR semicuantitativo, utilizando 35 ciclos en la reacción.

En la Figura 23, se muestran imágenes de las amplificaciones obtenidas para cada uno de los genes con ADNc obtenido de las mutantes.

Sólo la mutante 4.2 presentó ausencia total de mensajero, la mutante 5.2 aún presentó mensajero, por lo cual se descartó para análisis posteriores. Con la cepa mutante 4.2, se procedió a hacer los análisis de interacción con planta y confrontaciones con hongos fitopatógenos.

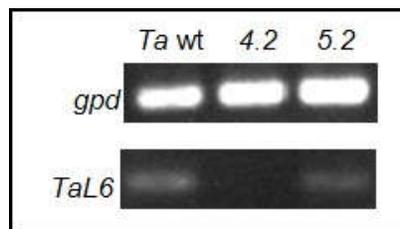


Figura 23. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las mutantes $\Delta tal6$ 4.2 y 5.2. Amplificación obtenida a partir de cDNA de muestras de micelio de *Trichoderma* en interacción con *A. thaliana*. Las reacciones se llevaron a 35 ciclos de amplificación. El gen *gpd* se utilizó como control de carga.

Después de haber seleccionado la mutante independiente $\Delta tal6$ 4.2, se realizaron cultivos en medio mínimo (MM) y PDA, para determinar si había cambios fenotípicos en las mutantes obtenidas con respecto a la cepa silvestre de *T. atroviride*. En ambos medios, las mutantes mostraron un retardo en el crecimiento colonial y en la conidiación con respecto a la cepa silvestre. En la Figura 24 se muestra una imagen representativa de la mutante $\Delta tal6$ 4.2 creciendo en MM.

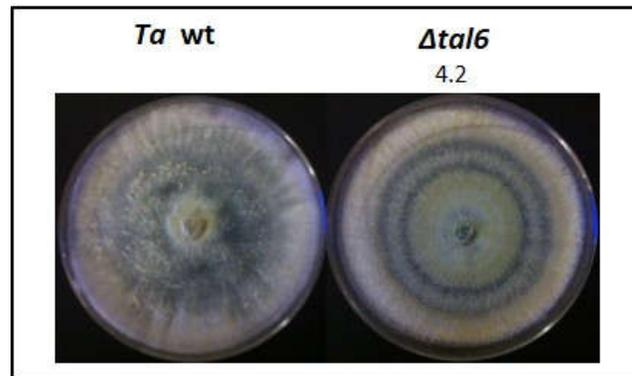


Figura 24. Morfología de la cepas silvestre y mutante $\Delta tal6$ de *T. atroviride*. Morfología de la transformante obtenida para el gen *tal6* en comparación con la cepa silvestre de *T. atroviride* wt. Imágenes tomadas a los 11 días de crecimiento en MM.

Ensayos de interacción de las cepas mutante nula $\Delta tal6$ y sobreexpresante *TaL6-OE* con líneas marcadoras del sistema de defensa vegetal y en confrontación con *Rhizoctonia solani*.

Para determinar la participación del efector *TaL6* en la modulación del sistema de defensa vegetal, se realizaron interacciones de la cepa $\Delta tal6$ 4.2 y con las líneas marcadoras *pLox2* como un indicador de la activación de la Resistencia Sistémica Inducida mediada por JA y la línea *pPR1* como una estrategia de monitorear la activación de la Resistencia Sistémica Adquirida mediada por SA. Lamentablemente, hubo problemas con el reactivo Gus a utilizar y con la germinación de las semillas, por lo que no se reportan estos datos.

Por otro lado, se realizó la medición de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* Col-0 control y en interacción con *T. atroviride* wt y la cepa $\Delta tal6$ 4.2 para determinar el posible impacto en la promoción del crecimiento vegetal. No se encontraron cambios entre la cepa $\Delta tal6$ 4.2 y la cepa silvestre, éstas tuvieron una disminución en su longitud con respecto a las plantas control creciendo

axénicamente (Figura 25). En el grupo de trabajo se han obtenido resultados similares y contrarios a lo ya reportado (Contreras Cornejo *et al.*, 2009).

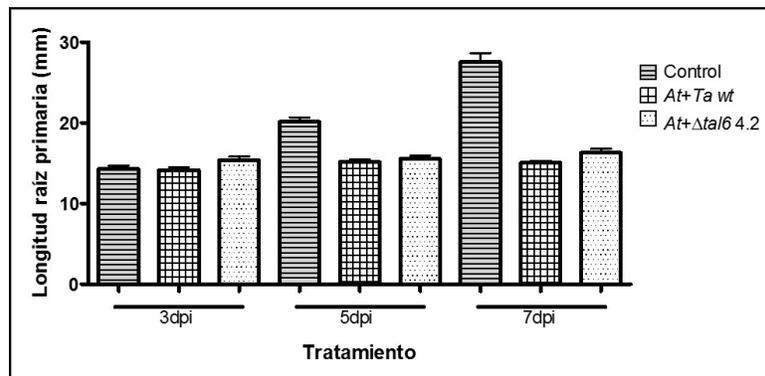


Figura 25. Longitud de la raíz de plantas de *A. thaliana* Col-0 en interacción con *T. atroviride* (wt) y con la cepa $\Delta tal6$. Los datos son resultado de al menos 10 plántulas.

Para evaluar la posible participación de los efectores seleccionados en la capacidad de *Trichoderma* para actuar como un biocontrolador, se realizaron ensayos de confrontación de las cepas obtenidas con los dos grupos de anastomosis AG2 y AG5 de *R. solani*. Se trabajó con las cepas sobreexpresante *TaL6-OE* 1.1, que mostró la mayor expresión y la cepa mutante $\Delta tal6$ 4.2.

En las confrontaciones se observó que la cepa mutante baja su eficiencia antagónica contra los dos grupos de anastomosis de *R. solani*, con respecto a la cepa de *T. atroviride* silvestre. De manera interesante, se observó que la cepa sobreexpresante tuvo un mejor desempeño que la cepa silvestre, patrón que se observó más marcadamente desde los cuatro días de confrontación y se mantuvo hasta los ocho días en los ensayos con AG2 (Figura 26) y AG5 (Figura 27). Estos resultados sugieren que el producto del gen *TaL6* está participando en procesos asociados a la capacidad antagónica de *Trichoderma*, ya sea inactivando las quitinasas del fitopatógeno o protegiendo las hifas de *Trichoderma*.

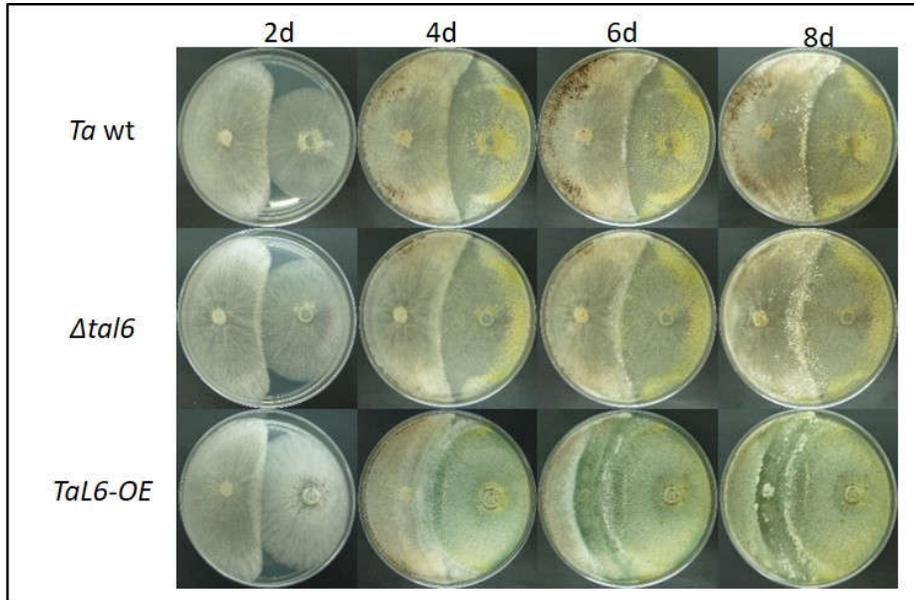


Figura 26. Análisis de la participación del gen *TaL6* de *T. atroviride* contra *R. solani* AG2. Confrontaciones directas de cada una de las cepas de *Trichoderma* contra el fitopatógeno *R. solani* AG2. *T. atroviride* cepa silvestre (*Ta wt*), $\Delta tal6$ 4.2 y *TaL6-OE* 1.1. Los ensayos se realizaron por triplicado, en medio PDA y se tomaron fotografías a los 2, 4, 6 y 8 días. Se muestran imágenes representativas.

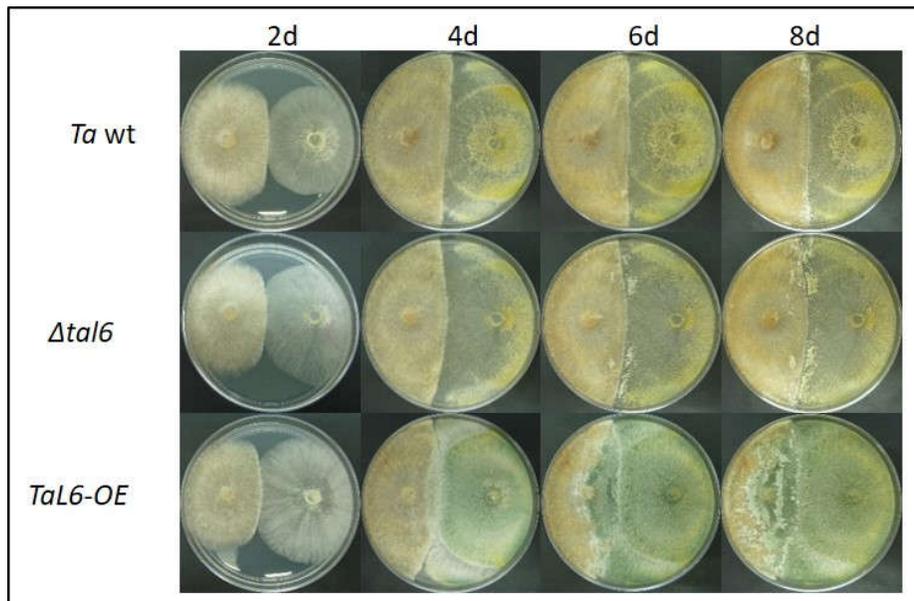


Figura 27. Análisis de la participación del gen *TaL6* de *T. atroviride* contra *R. solani* AG5. Confrontaciones directas de cada una de las cepas de *Trichoderma* contra el fitopatógeno *R. solani* AG5. *T. atroviride* cepa silvestre (*Ta wt*), $\Delta tal6$ 4.2 y *TaL6-OE* 1.1. Los ensayos se realizaron por triplicado, en medio PDA y se tomaron fotografías a los 2, 4, 6 y 8 días. Se muestran imágenes representativas.

Caracterización del gen *TaCFEM5*.

Análisis de la expresión de *TaCFEM5* en diferentes condiciones de cultivo.

Al realizar el análisis de la secuencia promotora del candidato *TaCFEM5*, se encontraron siete secuencias de respuesta para glucosa y celulosa. El análisis se realizó con los mismos programas que se usaron para el gen *TaL6*. En la Figura 28a, se indica el número de secuencias encontradas para el gen *TaCFEM5* y en la Figura 28b se esquematiza la posición en la cual se encontraron.

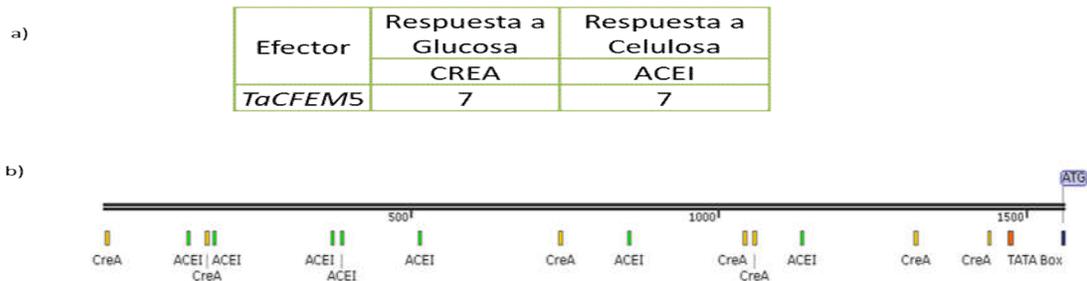


Figura 28. Análisis de la secuencia promotora del gen *TaCFEM5*. a) Elementos de respuesta a diferentes fuentes de carbono encontrados y b) Esquema de la localización de los elementos de respuesta dentro de la región promotora. Se marca el codón de inicio de la traducción (ATG), y las posibles cajas TATA y CAAT.

De igual manera que con el gen *TaL6*, primero se realizaron pruebas en un medio mínimo adicionado con celulosa, donde tampoco hubo respuesta en la expresión del gen *TaCFEM5*. Por ello, se realizaron ensayos utilizando paredes celulares vegetales al 0.2 % y también con un medio adicionado con exudados de raíz de *Arabidopsis* al 20% (v/v). También se hicieron pruebas en un medio con quitina, ya que se ha visto que proteínas CFEM están ligadas a receptores de membrana y transductores de señales implicadas en interacciones patógeno-hospedero y procesos de micoparasitismo (Rocha *et al.*, 2002; Kulkani *et al.*,

2003). Se observó que *TaCFEM5* respondió a los tres medios utilizados. Para el exudado de raíz la respuesta fue a las 6 h, para las paredes vegetales y quitina la inducción fue a las 24 h. El gen *ech42* fue usado como control para los ensayos en medio mínimo con quitina al 0.75 % (Carsolio *et al.*, 1994). En la Figura 29 se muestra el análisis de expresión relativa para los genes descritos.

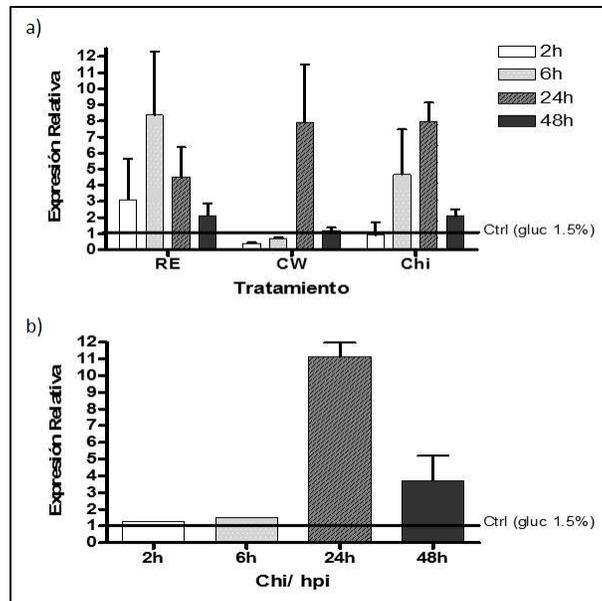


Figura 29. Patrones de expresión del gen *TaCFEM5* en medio mínimo Vogel con exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión del gen *TaCFEM5* (a) y *ech42* (b). Exudados de raíz (RE), paredes celulares vegetales (CW) o quitina (Chi). Promedio de al menos dos experimentos independientes. Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de geles de agarosa. El medio suplementado con glucosa se usó como control y el gen *ech42* se utilizó como control de referencia.

Determinación de la localización del efector *TaCFEM5* durante la interacción planta-*Trichoderma*.

La obtención de cepas sobreexpresantes de *Trichoderma* que contuvieran la fusión *TaCFEM5-mCherry* también se realizó en tres rondas de amplificación. En la Figura 30, se muestran los geles de la primer ronda, donde se observan los tamaños esperados de 1365 pb para *TaCFEM5* y 717 pb para el fragmento de *mCherry*.

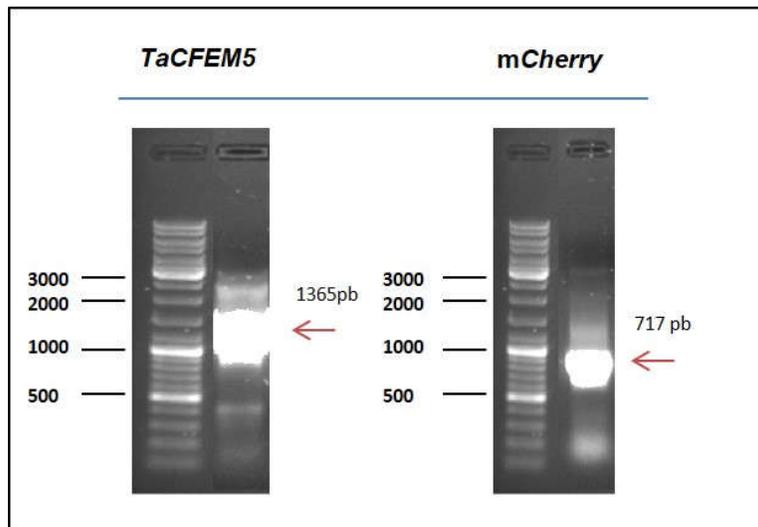


Figura 30. Amplificación de los fragmentos de los genes *TaCFEM5* y *mCherry*. Patrón electroforético en gel de agarosa al 1 % de las reacciones de PCR, usando como templado cDNA para amplificar el gen *TaCFEM5* y DNA plasmídico para el fragmento *mCherry*. En todos los casos se usó marcador de peso molecular para corroborar el tamaño de las bandas esperadas (Gene Ruler DNA Ladder Mix. Fermentas).

El tamaño de la fusión *TaCFEM5*-*mCherry* fue de 2109 pb. En la Figura 31 se muestra la amplificación obtenida en un gel de agarosa. El fragmento se purificó y se ligó al vector pJET 1.2 /blunt.

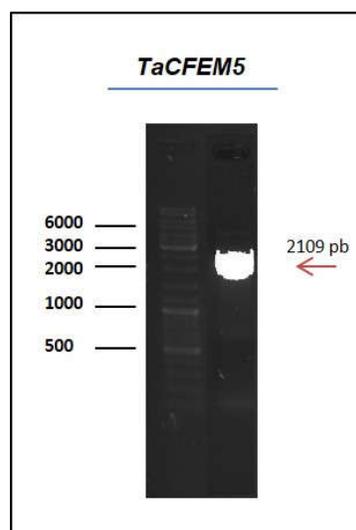


Figura 31. Comprobación de la fusión *TaCFEM5*- *mCherry*. El fragmento esperado se indica con una flecha.

Por PCR en colonia se analizaron diez clonas y se seleccionó una colonia positiva para extraer ADN plasmídico y mediante una restricción, obtener el fragmento de interés para clonarlo en el vector de expresión pUE08. Se obtuvieron colonias positivas que contenían la fusión *TaCFEM5*-mCherry, de una de ellas se extrajo ADN plasmídico y se procedió a transformar protoplastos de *Trichoderma* y obtener la cepa deseada.

Se recuperó una transformante de *Trichoderma* y por PCR se validó que contuviera la construcción deseada (Figura 32), sin embargo, no se logró observar fluorescencia cuando se hicieron los ensayos.

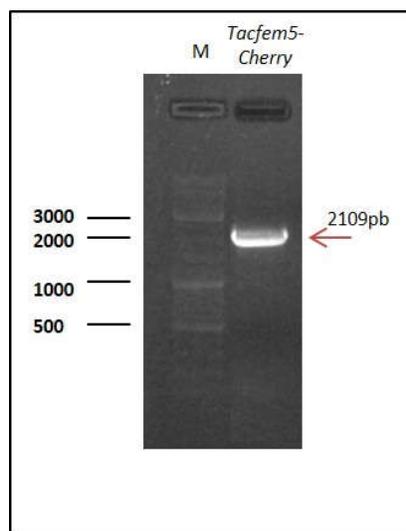


Figura 32. Comprobación de la transformante de *Trichoderma* que contiene la fusión *Tacfem5-Cherry*. El tamaño del fragmento esperado se indica con la flecha.

Obtención de cepas sobreexpresantes del gen *TaCFEM5*.

Para obtener cepas sobreexpresantes del gen *TaCFEM5* de *Trichoderma*, se realizó una amplificación del marco de lectura abierto del gen, usando como templado ADNc de *T. atroviride* y oligonucleótidos que incluían sitios de restricción para permitir su ligación al vector de expresión pUE08. En la Figura 33 se muestra un gel con la amplificación esperada de 1461 pb.

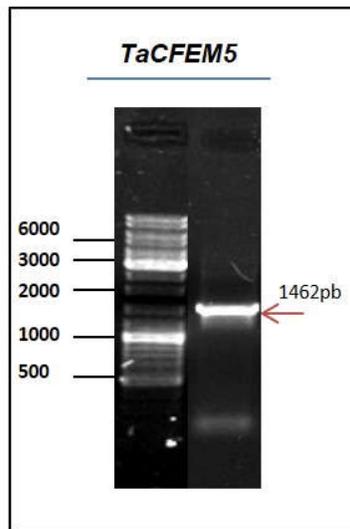


Figura 33. Amplificación del gen *TaCFEM5*. Se utilizó cDNA de *T. atroviride* como templado.

El fragmento obtenido se purificó de un gel de agarosa y se procedió a ligar en el vector de mantenimiento pJET 1.2 /blunt para *TaCFEM5*. Por PCR en colonia se analizaron diez clonas y se seleccionó una colonia para extraer DNA plasmídico y mediante una restricción con las enzimas antes citadas, obtener el fragmento de interés para clonarlo en el vector de expresión pUE08. Se purificó ADN plasmídico con la construcción obtenida y una vez secuenciado se procedió a transformar protoplastos de *Trichoderma* y obtener las cepas deseadas.

Las transformantes obtenidas para *TaCFEM5*, fueron dos, denominadas *TaCFEM5* 1.1 y 3.1. No mostraron diferencias fenotípicas con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, no se observó un aumento en la cantidad de transcrito con respecto al control (Figura 34), por lo que no se usaron para análisis posteriores.

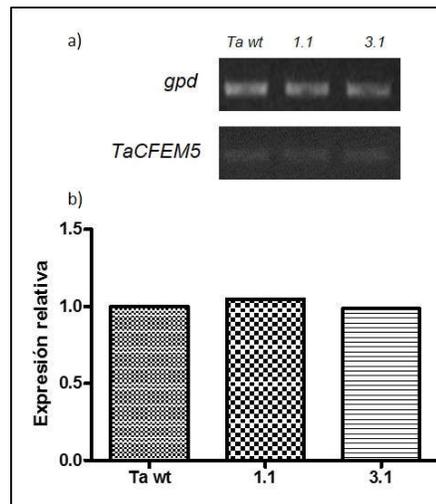


Figura 34. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las sobreexpresantes *TaCFEM5* y su análisis densitométrico. a) Amplificación obtenida a partir de cDNA de muestras de micelio de *Trichoderma* crecido en PDA. Las reacciones se llevaron a 25 ciclos de amplificación. El gen *gpd* se utilizó como control de carga. b) Análisis densitométrico de las cepas sobreexpresantes *TaCFEM5*. Se grafica el análisis densitométrico obtenido de una réplica biológica.

Diseño de la construcción para la interrupción del gen *TaCFEM5*.

Igualmente que con *Tal6*, se usó la técnica de doble fusión (Davidson *et al.*, 2002; Yu *et al.* 2004). Primero, se amplificaron por separado de regiones 5' y 3' flanqueantes al gen, y de la secuencia correspondiente al marcador de selección, *hph*, que confiere resistencia a higromicina. En la primera ronda de PCR los tamaños esperados fueron de aproximadamente de 2100 pb para los fragmentos flanqueantes a *TaCFEM5* (Figura 35). Los fragmentos se purificaron y sirvieron como templado para la PCR II. A su vez, el producto de la PCR II sirvió como templado para la PCR III, utilizando los iniciadores Nest para obtener una buena cantidad del casete de interrupción.

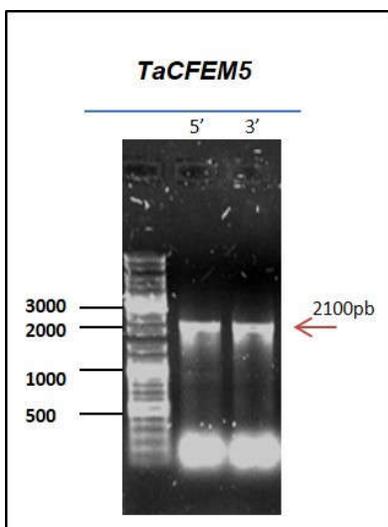


Figura 35. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen *TaCFEM5*. Los fragmentos esperados se indican con una flecha.

La construcción obtenida tuvo un tamaño de 5325 pb y se muestra en la Figura 36. El fragmento se purificó y se procedió a transformar protoplastos de *T. atroviride*.

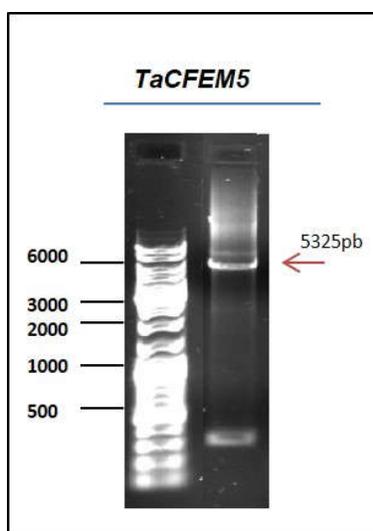


Figura 36. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen *TaCFEM5*. El fragmento esperado se indica con una flecha.

Obtención y selección de mutantes nulas *TaCFEM5*.

Una vez transformados protoplastos de *T. atroviride*, se obtuvieron 43 transformantes independientes. De cada una de las transformantes se extrajo

DNA genómico. Mediante PCR con oligonucleótidos control, se determinó en cuales transformantes se había reemplazado el gen nativo. Se realizaron cuatro reacciones de PCR: la primera de una región del gen *hph*, indicando la presencia de la fusión generada, en las siguientes dos reacciones de PCR se esperaba obtener amplificación en caso de que la construcción se hubiera integrado en el sitio deseado, ya que los iniciadores abarcan regiones 5' y 3' fuera de la construcción obtenida. La cuarta reacción consistió en la amplificación de un fragmento interno del gen *TaCFEM5*, de tal manera que la obtención de un amplicón indicaría la presencia del gen silvestre. En la Figura 37 se muestra un esquema representando las reacciones control realizadas, así como los tamaños esperados para cada una de éstas.

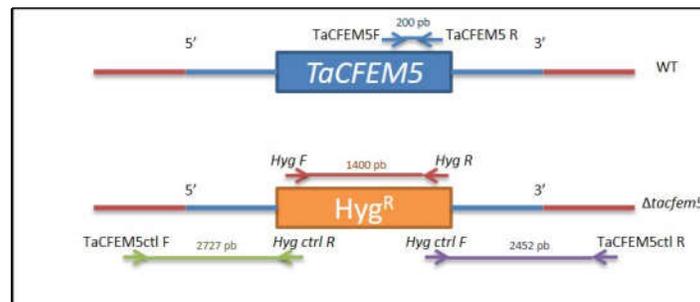


Figura 37. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TaCFEM5*. Esquema representativo de las amplificaciones realizadas para la validación de la correcta interrupción del gen *TaCFEM5*. Se indican los fragmentos esperados en las mutantes del gen *tacFEM5*, así como la amplificación esperada en caso de no tener una correcta interrupción (wt).

En la Figura 38 se muestran imágenes representativas de las amplificaciones control para la interrupción de *TaCFEM5*. En el panel a) se muestra los productos obtenidos a partir de cinco transformantes iniciales. En el panel b) las amplificaciones obtenidas de dos transformantes que fueron seleccionadas para ser sometidas a los pases monospóricos. En el panel c) se muestran los productos obtenidos de las transformantes seleccionadas después

de haber realizado al menos cuatro pases monospóricos, donde se observa que las cepas transformantes ya no presentan amplificación del fragmento interno del gen silvestre (carriles 16 y 20). De los resultados obtenidos se dedujo que algunas de las transformantes obtenidas contenían integraciones ectópicas de la construcción, ya que éstas presentaban resistencia a higromicina, pero no amplificaron las dos reacciones positivas (carriles 4, 5, 9 y 10 de la Figura 38).

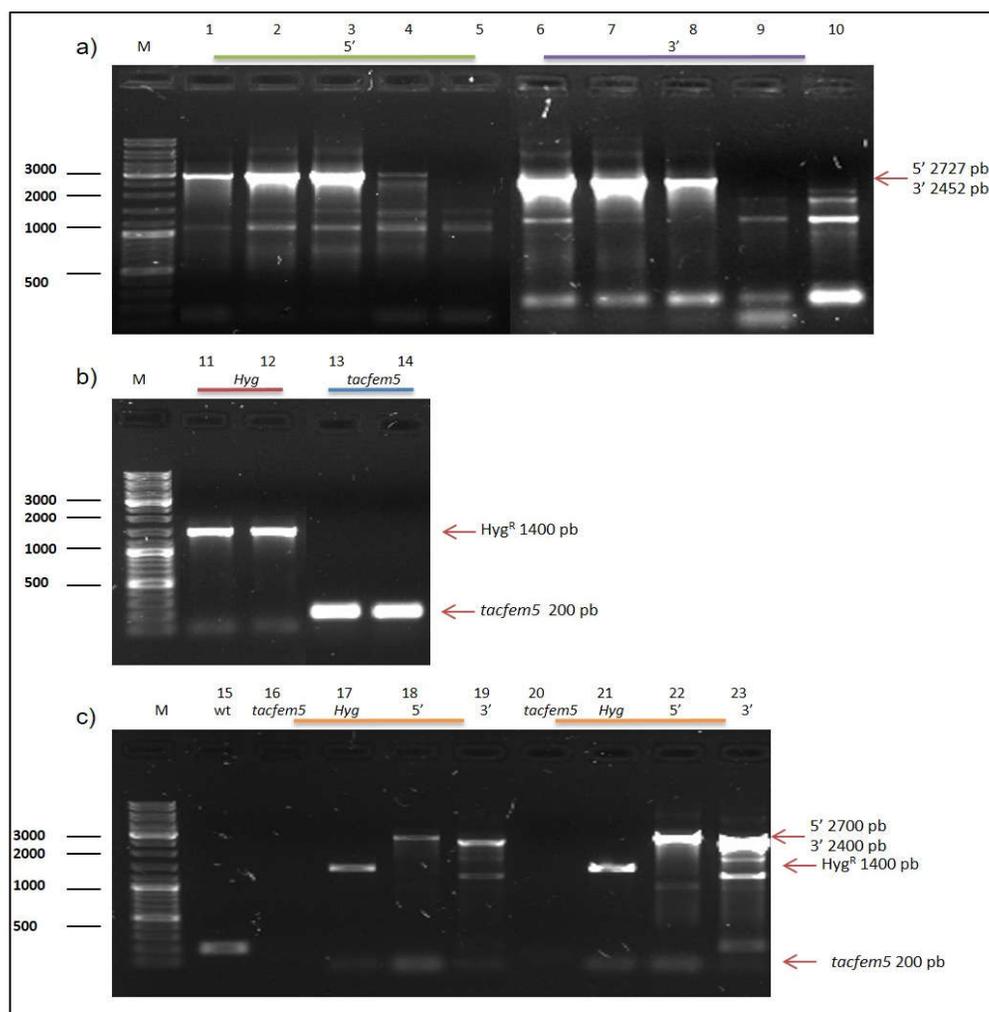


Figura 38. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TaCFEM5*. a) Análisis de la amplificación de los extremos 5' y 3' (reacciones control positivo) de cinco transformantes independientes: T-1 (carriles 1 y 6), T-2 (carriles 2 y 7), T-3 (carriles 3 y 8), T-4 (carriles 4 y 9) y T-5 (carriles 5 y 10). b) Análisis de la amplificación de los genes *hph* y *TaCFEM5* de dos transformantes independientes: T-3 (carriles 11 y 13), T-5 (carriles 12 y 14). c) Amplificaciones control de dos transformantes independientes después de cuatro pases monospóricos: amplificación *TaCFEM5* wt (carril 15), T-3 (carril 16) y T-4 (carril 20); *hph* T-3 y T-4 (carriles 17 y 21, respectivamente); oligo 5' (carriles 18 y 22) y oligo 3' (carriles 19 y 23).

Las reacciones de PCR se realizaron a 28 ciclos y las mutantes seleccionadas se denominaron $\Delta tacfem5$ 1.1 y 2.1. Se realizó un RT-PCR semicuantitativo, utilizando 35 ciclos en la reacción. En la Figura 39, se muestran imágenes de las amplificaciones obtenidas con ADNc obtenido de las mutantes. Ambas mutantes presentaron total ausencia de mensajero. Con estas cepas, se procedió a hacer los análisis de interacción con planta y confrontaciones con hongos fitopatógenos.

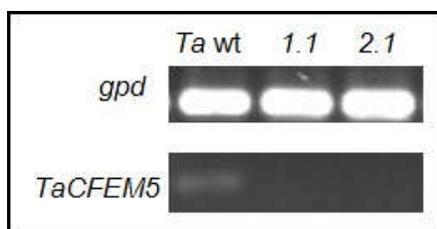


Figura 39. Reacciones de amplificación por RT-PCR de las mutantes $\Delta tacfem5$ 1.1 y 2.1. Amplificación obtenida a partir de cDNA de muestras de micelio de *Trichoderma* en interacción con *A. thaliana*. Las reacciones se llevaron a 35 ciclos de amplificación. El gen *gpd* se utilizó como control de carga.

Después de haber seleccionado mutantes nulas, se realizaron cultivos en medio mínimo (MM) y PDA, para determinar si había cambios fenotípicos en las mutantes obtenidas con respecto a la cepa silvestre de *T. atroviride*. En ambos medios, las mutantes mostraron un retardo en el crecimiento colonial y en la conidiación con respecto a la cepa silvestre. En la Figura 40 se muestran imágenes representativas de las transformantes obtenidas creciendo en MM.

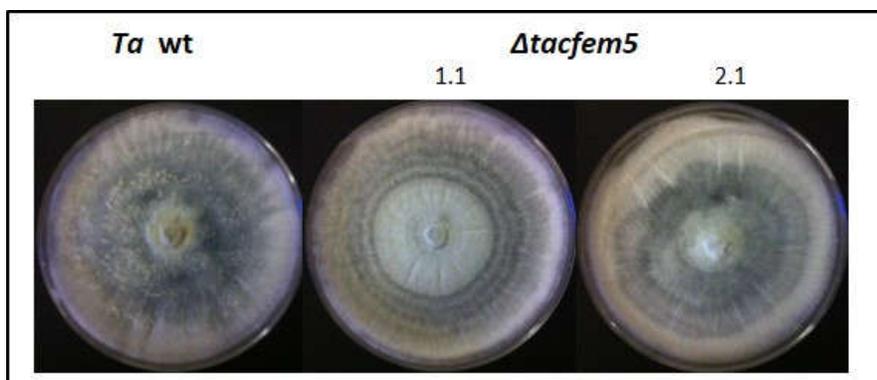


Figura 40. Morfología de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tacfem5$ de *T. atroviride*. Morfología de las transformantes obtenidas para el gen *tacfem5* (transformantes 1.1 y 2.1) en comparación con la cepa silvestre de *T. atroviride* wt. Imágenes tomadas a los 11 días de crecimiento en MM.

Interacciones de cepas $\Delta tacfem5$ y *TaCFEM5*-OE con líneas marcadoras del sistema de defensa vegetal y en confrontación con *Rizoctonia solani*.

Para determinar la participación de *TaCFEM5* en la modulación del sistema vegetal, se realizaron interacciones de las mutantes nulas $\Delta tacfem5$ 1.1 y 2.1 con las líneas marcadoras pLox2 como un indicador de la activación de la Resistencia Sistémica Inducida mediada por JA y la línea pPR1 como una estrategia de monitorear la activación de la Resistencia Sistémica Adquirida mediada por SA. Se tomaron muestras de las plantas a los 3, 5 y 7 días, sin embargo, únicamente en el tiempo 7 fue donde se observaron diferencias con respecto a las interacciones con la cepa silvestre de *T. atroviride* y son las que se muestran.

Los resultados que se presentan son preliminares. En la Figura 41 se muestran los resultados con las mutantes *tacfem5* 1.1 y 2.1 y la línea pPR1 a los 7 días de interacción, no observando cambios entre las mutantes y la cepa silvestre de *Trichoderma*, únicamente se pudo observar una mayor inducción del sistema

de defensa vegetal en las plantas que estuvieron en interacción que con respecto a las plantas control.

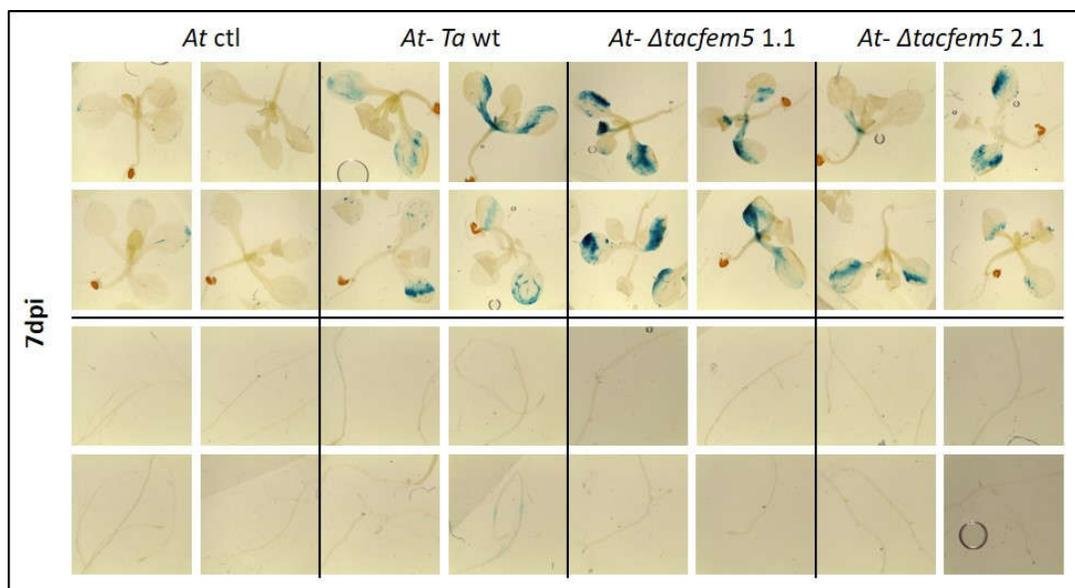


Figura 41. Análisis histoquímico de GUS para plántulas *pPR1:uidA* a los 7 días de cocultivo con *T. atroviride* y las mutantes $\Delta tacfem5$. *At ctrl*: plántulas creciendo axénicamente. *At-Ta wt*: plántulas cocultivadas con la cepa silvestre. $\Delta tacfem5$ 1.1 y 2.1: plántulas co-cultivadas con las cepas transformantes. Para todos los casos se muestran imágenes representativas de tejido aéreo y de las raíces. Las fotografías son de una muestra representativa de al menos 20 plántulas teñidas.

En cuanto a las interacciones con las mutantes *tacfem5* 1.1 y 2.1 y la línea marcadora *pLox2*, se observó que hubo una mayor inducción del sistema de defensa vegetal en las plantas que estuvieron en interacción con las dos mutantes, esto con respecto a la cepa silvestre (Figura 42). Sin embargo, es necesario repetir estos experimentos para confirmar los resultados obtenidos.

Por otro lado, se realizó la medición de la raíz principal de plantas de *A. thaliana* Col-0 control y en interacción con *T. atroviride* wt y las cepas mutantes para determinar el posible impacto en la promoción del crecimiento vegetal (Figura 43). No se encontraron cambios, al igual que con las cepas mutantes del gen *TaL6*.

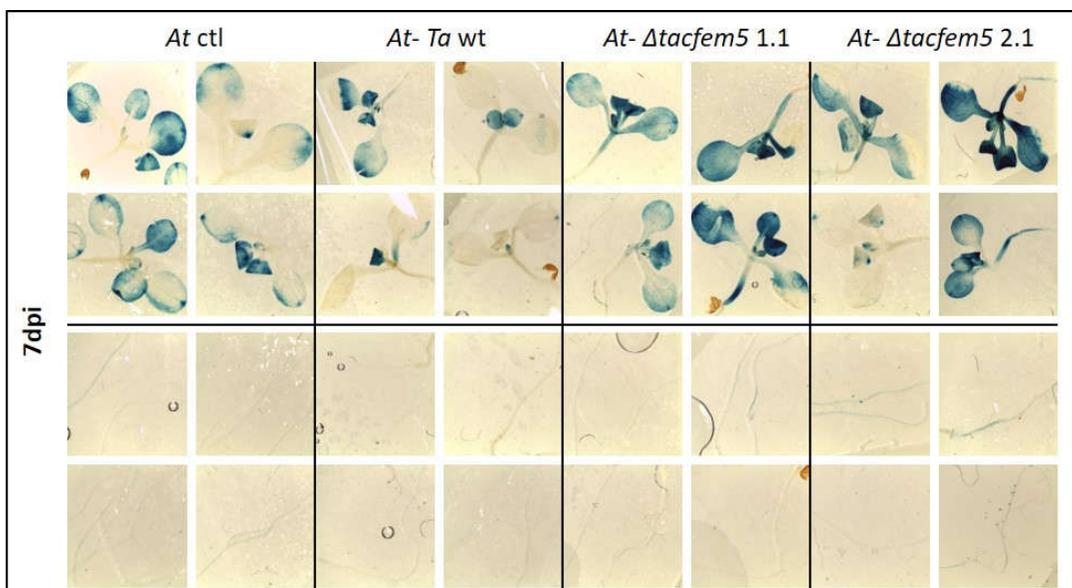


Figura 42. Análisis histoquímico de GUS para plántulas *pLox2:uidA* a los 7 días de cocultivo con *T. atroviride* y las mutantes $\Delta tacfem5$. *At ctrl*: plántulas creciendo axénicamente. *At-Ta wt*: plántulas cocultivadas con la cepa silvestre. $\Delta tacfem5$ 1.1 y 2.1: plántulas co-cultivadas con las cepas transformantes. Para todos los casos se muestran imágenes representativas de tejido aéreo y de las raíces. Las fotografías son de una muestra representativa de al menos 20 plántulas teñidas.

Como anteriormente se mencionó, los resultados son preliminares, sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento indican que la disminución en la expresión del gen *TaCFEM5* es suficiente para modificar la respuesta inmune de la planta mediada por ácido jasmónico.

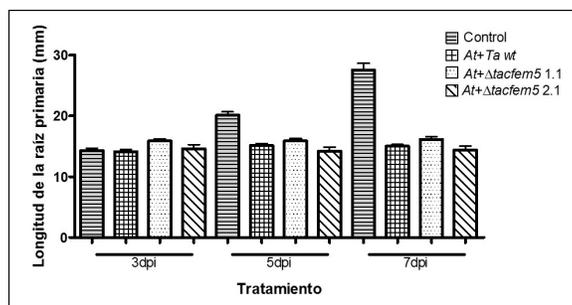


Figura 43. Longitud de la raíz de plantas de *A. thaliana* Col-0 en interacción con *T. atroviride* (wt) y con las cepas mutantes $\Delta tacfem5$. Los datos son resultado de al menos 10 plántulas.

Para evaluar la posible participación de los efectores seleccionados en la capacidad de *Trichoderma* para actuar como un biocontrolador, se realizaron

ensayos de confrontación de las cepas obtenidas con los dos grupos de anastomosis AG2 y AG5 de *R. solani*.

Las confrontaciones con la cepa mutante $\Delta tacfem5$ 1.1 y *R. solani* AG2 (Figura 44) y AG5 (Figura 45) no mostraron cambios con respecto a la cepa control de *T. atroviride*. Este comportamiento fue similar cuando se realizaron ensayos con la mutante *tacfem5* 2.1 (datos no mostrados), lo cual sugiere que el gen *TaCFEM5* no está implicado en la capacidad antagónica de *T. atroviride*.

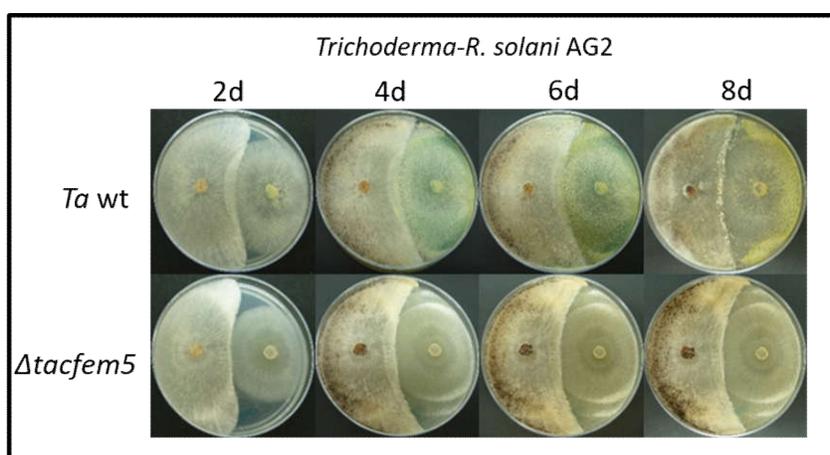


Figura 44. Análisis de la participación del gen *TaCFEM5* de *T. atroviride* contra *R. solani* **AG2**. Confrontaciones directas de cada una de las cepas de *Trichoderma* contra el fitopatógeno *R. solani* AG2. *T. atroviride* cepa silvestre (*Ta wt*) y *tacfem5* 1.1. Los ensayos se realizaron por triplicado, en medio PDA y se tomaron fotografías a los 2, 4, 6 y 8 días. Se muestran imágenes representativas.

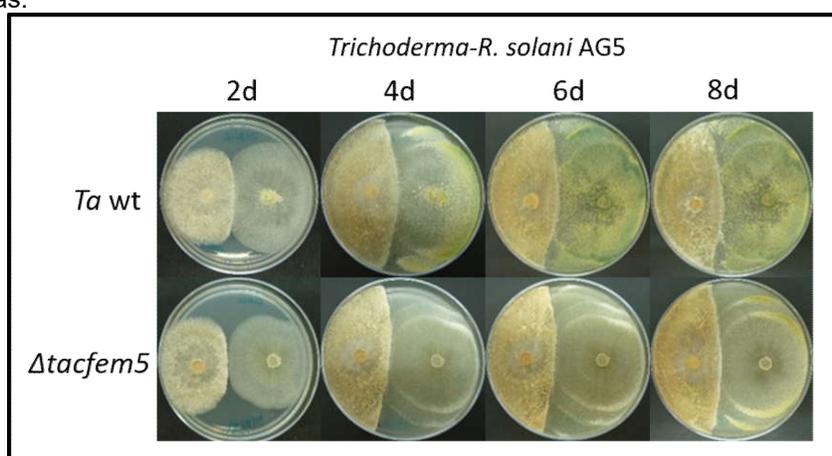


Figura 45. Análisis de la participación del gen *TaCFEM5* de *T. atroviride* contra *R. solani* **AG5**. Confrontaciones directas de cada una de las cepas de *Trichoderma* contra el fitopatógeno *R. solani* AG5. *T. atroviride* cepa silvestre (*Ta wt*) y *tacfem5* 1.1. Los ensayos se realizaron por triplicado, en medio PDA y se tomaron fotografías a los 2, 4, 6 y 8 días. Se muestran imágenes representativas.

Caracterización del candidato *TvCyt2*.

Análisis de la expresión de *TvCyt2* en diferentes condiciones de cultivo.

La secuencia promotora del gen *TvCyt2* se analizó con los mismos programas antes mencionados. Se encontraron dos elementos de respuesta a glucosa y dos a celulosa. En la Figura 46a, se indica el número de secuencias encontradas para el gen *TvCyt2* y en la Figura 46b se esquematiza la posición en la cual se encontraron.

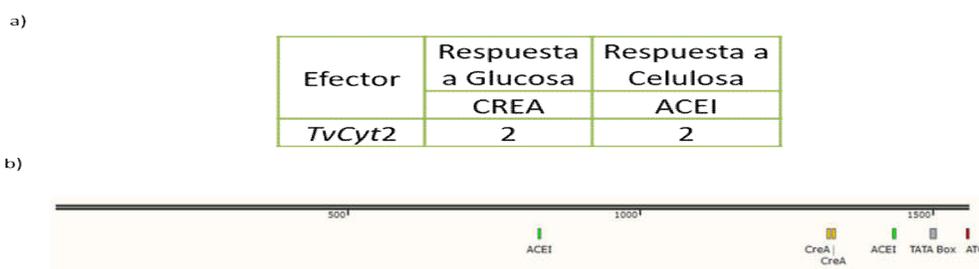


Figura 46. Análisis de la secuencia promotora del gen *TvCyt2*. a) Elementos de respuesta a diferentes fuentes de carbono encontrados y b) Esquema de la localización de los elementos de respuesta dentro de la región promotora. Se marca el codón de inicio de la traducción (ATG), y las posibles cajas TATA y CAAT.

Después del análisis de la región promotora, se procedió a realizar ensayos en medio Vogel adicionado con diferentes fuentes de carbono: glucosa, celulosa, exudados de raíz, paredes celulares vegetales y quitina. Un medio adicionado con sacarosa al 1.5 % se usó como control. Los tiempos analizados fueron a las 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h. Al realizar el análisis densitométrico se observó que, en los medios adicionados con glucosa, celulosa, exudados de raíz y paredes celulares vegetales hubo una ligera disminución en la expresión del gen. Interesantemente, en el medio adicionado con quitina, hubo un aumento en la expresión con respecto al control en el primer tiempo de colecta. Estos resultados son preliminares, sin

embargo, correlacionan con la expresión obtenida de *TvCyt2* obtenida en interacción con planta. En la Figura 47 se muestra la gráfica con los resultados del análisis densitométrico de los ensayos de RT-PCR.

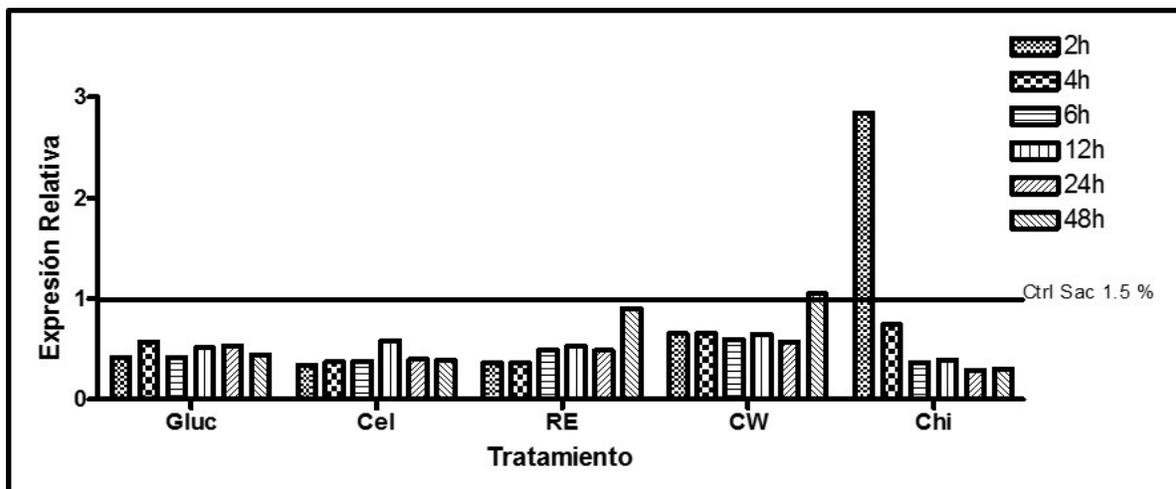


Figura 47. Patrones de expresión del gen *TvCyt2* en medio mínimo Vogel adicionado con glucosa, celulosa, exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión del gen *TvCyt2*. Glucosa (Glu), Celulosa (Cel), exudados de raíz (RE), paredes celulares vegetales (CW) o quitina (Chi). Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de geles de agarosa. El medio suplementado con sacarosa (Sac 1.5 %) se usó como control.

Análisis de la expresión de *TvCyt2* en confrontación con cepas de *R. solani*

Ya que se observó que el gen *TvCyt2* respondía a la presencia de quitina, se decidió analizar su expresión diferencial en ensayos de confrontación con dos grupos de anastomosis de *R. solani*: AG2 y AG5. Se consideraron tres tiempos para el análisis: Antes del contacto entre *T. virens* y las cepas de *R. solani* (BC); cuando comienza a haber un contacto entre las dos cepas (C) y cuando ya hay un sobrecrecimiento de entre las dos cepas (OG). La expresión diferencial se analizó por qPCR, usando como control ADNc de *T. virens* creciendo solo. Para la confrontación con *R. solani* AG2, se observó que la expresión disminuye

ligeramente con respecto al control (Figura 48a), mientras que con el grupo de anastomosis AG5, se observó un aumento en la expresión en el segundo tiempo de colecta, cuando empieza a haber un contacto entre las dos cepas, disminuyendo al tercer tiempo, pero manteniendo niveles por encima del control (Figura 48b), sugiriendo que el gen *TvCyt2* participa en procesos asociados a micoparasitismo.

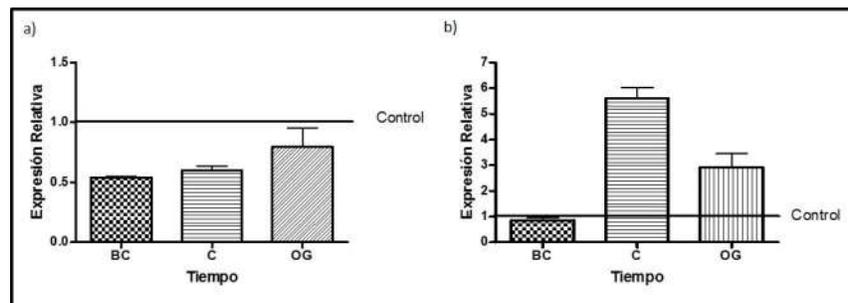


Figura 48. Patrones de expresión del gen *TvCyt2* en medio mínimo Vogel adicionado con glucosa, celulosa, exudados de raíz, paredes celulares vegetales o quitina. Análisis semicuantitativo de los patrones de expresión del gen *TvCyt2*. Glucosa (Glu), Celulosa (Cel), exudados de raíz (RE), paredes celulares vegetales (CW) o quitina (Chi). Expresión relativa obtenida a partir del análisis densitométrico de geles de agarosa. El medio suplementado con sacarosa (Sac 1.5 %) se usó como control.

Diseño de la construcción para la interrupción del gen *TvCyt2*.

Al igual que con los genes anteriormente descritos, se usó la técnica de doble fusión (Davidson *et al.* 2002; Yu *et al.* 2004). En la primera ronda de PCR los tamaños esperados fueron de aproximadamente de 2050 pb para los fragmentos flanqueantes a *TvCyt2*. En la Figura 49 se muestran las amplificaciones obtenidas. Los fragmentos se purificaron y se realizó la PCR II, usándolos como templado y la reacción obtenida se usó para la PCR III, utilizando los iniciadores Nest correspondientes.

La construcción obtenida tuvo un tamaño de 5523 pb. En la Figura 50 se muestra la amplificación obtenida y el fragmento se purificó y se procedió a transformar protoplastos de *T. atroviride*.

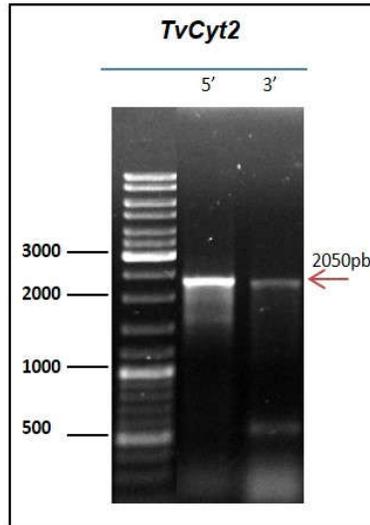


Figura 49. Amplificación de las secuencias flanqueantes del gen *TvCyt2*. Los fragmentos esperados se indican con una flecha.

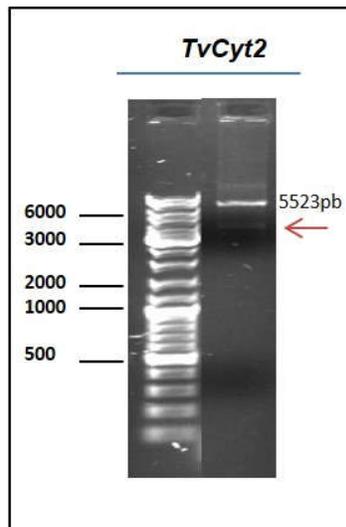


Figura 50. Amplificación de la construcción para la interrupción del gen *TvCyt2*. El fragmento esperado se indica con una flecha.

Obtención y selección de mutantes nulas *TvCyt2*.

Una vez transformados protoplastos de *T. virens*, se obtuvieron 24 transformantes independientes. Mediante PCR con oligonucleótidos control y usando DNA de cada una de las transformantes, se determinó en cuáles se había reemplazado el gen nativo. Se realizaron las mismas cuatro reacciones de PCR indicadas en los genes anteriores para la corroboración de las mutantes obtenidas. En la Figura 51 se muestra un esquema representando las reacciones control realizadas, así como los tamaños esperados para cada una de éstas.

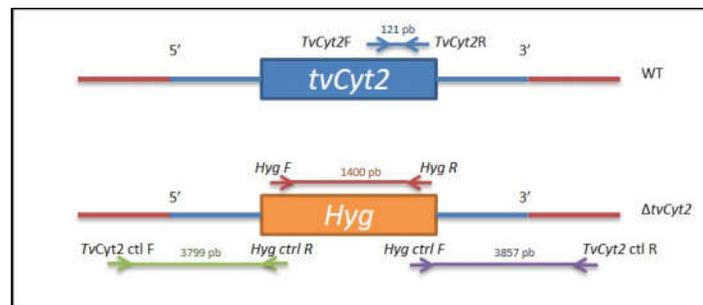


Figura 51. Ilustración de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TvCyt2*. Esquema representativo de las amplificaciones realizadas para la validación de la correcta interrupción del gen *TvCyt2*. Se indican los fragmentos esperados en las mutantes del gen *tvCyt2*, así como la amplificación esperada en caso de no tener una correcta interrupción (wt).

En la Figura 52 se muestran los productos obtenidos de dos transformantes seleccionadas después de haber realizado al menos cuatro pases monospóricos, donde se observa que las cepas transformantes ya no presentan amplificación del fragmento interno del gen silvestre (carriles 2 y 6).

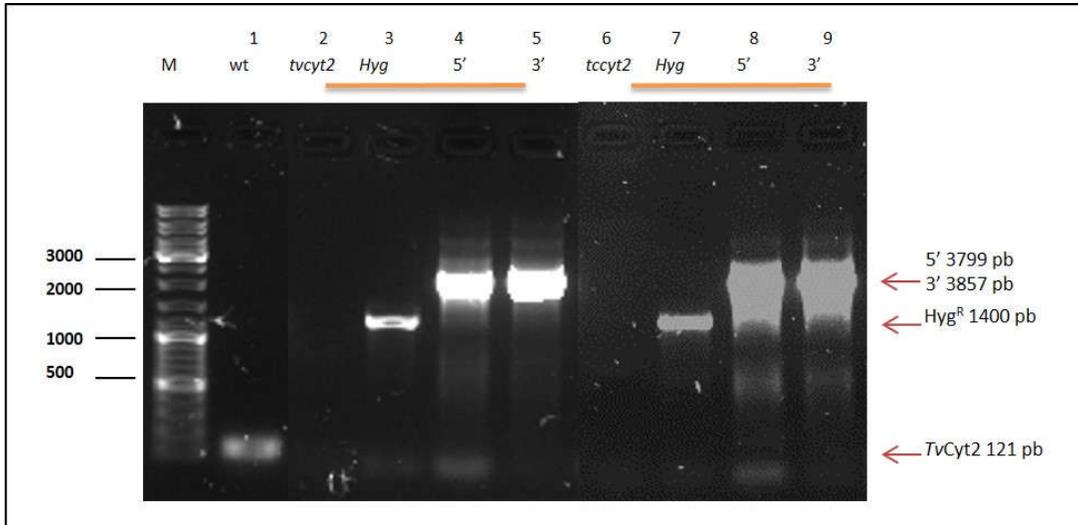


Figura 52. Amplificación por PCR de las reacciones control realizadas para la validación de la interrupción del gen *TvCyt2*. Amplificaciones control de dos transformantes independientes después de cuatro pases monospóricos: amplificación *TvCyt2* wt (carril 1), T-2 (carril 2) y T-3 (carril 6); *hph* T-3 y T-4 (carriles 3 y 7, respectivamente); oligo 5' (carriles 4 y 8) y oligo 3' (carriles 5 y 9).

Mediante una reacción de qPCR, se corroboró que las mutantes seleccionadas $\Delta tvcyt2$ 2.1 y 3.1, tuvieron una expresión nula del gen. Además, se analizaron las cepas sobreexpresantes del gen *TvCyt2* para corroborar que fueran transformantes con una mayor producción de transcrito del gen.

En la Figura 53, se muestran imágenes de las amplificaciones obtenidas con ADNc obtenido de las mutantes nulas y las sobreexpresantes. Ambas mutantes presentaron total ausencia de mensajero y las sobreexpresantes tuvieron hasta 13 veces más de expresión con respecto a la cepa silvestre.

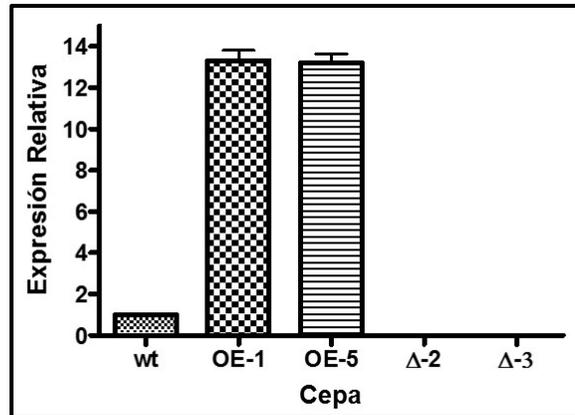


Figura 53. Reacciones de amplificación por qPCR de las mutantes nulas $\Delta tvcyt2$ 2.1 y 3.1 y las sobreexpresantes $TvCyt2OE-1$ y 5. Amplificación obtenida a partir de cDNA de muestras de micelio de *Trichoderma* en interacción con *A. thaliana*. Las reacciones se llevaron a 35 ciclos de amplificación. El gen *gpd* se utilizó como control de carga.

Con estas cepas mutantes y sobreexpresantes se analizó la función del gen *TvCyt2* en las interacciones biológicas establecidas por *Trichoderma* durante la tesis de maestría de Porras-Troncoso (2016), en donde se encontraron que las cepas sobreexpresantes producen metabolitos secundarios que son menos abundantes o no son detectables en las cepas silvestre y mutantes nulas. Las mutantes $\Delta tvcyt2$ en ensayos de antibiosis, mostraron un decremento en la actividad antagónica contra las cepas de *R. solani*, Las plantas de *Arabiopsis* co-cultivadas con las cepas sobreexpresantes, mostraron una mayor inducción de la resistencia sistémica adquirida que aquellas plantas co-cultivadas con la cepa silvestre, además de que hubo un incremento en la biomasa vegetal. Todos estos datos, junto con los aquí obtenidos, sugieren que el producto del gen *TvCyt2* está implicado en la biosíntesis de metabolitos secundarios, capaces de incrementar la actividad antagónica contra hongos fitopatógenos y la capacidad de promover el crecimiento vegetal (Ramírez-Valdespino et al., 2017, sometido MPMI).

DISCUSIÓN

Los efectos que *Trichoderma* tiene sobre diferentes plantas han sido ampliamente reportados (Yedidia *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004a; Shores *et al.*, 2005). En este trabajo, se analizaron 21 secuencias de una lista de 233 candidatos de *Trichoderma* propuesta por Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017. Se utilizó como criterio de selección la relación filogenética más cercana entre *T. virens* y *T. atroviride* y más alejadas de *T. reesei*. Las dos primeras especies presentan un estilo de vida micoparásito y pueden interactuar con la planta mientras que, hasta la fecha, no se ha reportado que *T. reesei* presente dichas características. Además, un análisis de los genomas de estas tres especies reveló que *T. virens* y *T. atroviride* comparten 1273 genes ortólogos que no están presentes en *T. reesei*, sugiriendo que podría ser uno de los factores que hacen que *T. virens* y a *T. atroviride* compartan estilos de vida (Kubicek *et al.*, 2011).

Para evaluar su participación durante la interacción con *A. thaliana*, se realizó un sistema de interacción de acuerdo a lo reportado por Contreras Cornejo *et al.* (2009), ya que bajo esas condiciones, *T. virens* y *T. atroviride* promueven el crecimiento y la activación del sistema de defensa vegetal.

Se realizaron colectas de micelio en tres tiempos de la interacción y únicamente colectando el frente de la colonia de *Trichoderma*, en caso de que la respuesta en el hongo fuera localizada, es decir que, sólo en el micelio localizado frente de la colonia se llevaran a cabo cambios a nivel transcripcional. Los días se seleccionaron para seguir la interacción desde tiempos tempranos, donde aún no existe un contacto directo de la planta y el hongo (tres días), donde las moléculas puede ser difundidas en el medio o bien, los compuestos volátiles liberados por la

planta en respuesta a la presencia del hongo, pudieran ser inicialmente percibidos por el hongo. La segunda colecta se realizó a los cinco días post inoculación (5dpi) con *Trichoderma*, donde había contacto inicial entre el micelio y la raíz. En el séptimo día, ambas especies de *Trichoderma*, ya cubrían toda el área radicular de *Arabidopsis*.

Analizando los patrones de expresión de los 21 genes seleccionados por RT-PCR semi-cuantitativo, se encontró que los genes *TaL6*, *TaCFEM4*, *TaCFEM5*, *TaGH1* y *TvCyt2*, estaban diferencialmente expresados y su comportamiento fue consistente en las réplicas realizadas en interacción con la planta. Los resultados de estos cinco genes se validaron por PCR en tiempo real, confirmando los patrones de expresión obtenidos para cuatro de los genes. En el caso del candidato *TaCFEM4*, los resultados por qPCR no mostraron la expresión diferencial observada en los ensayos RT-PCR, posiblemente debido a que la técnica de qPCR es más sensible que la RT-PCR y permitió determinar la expresión del gen de manera más exacta, por lo que se descartó para posteriores análisis.

Para el candidato *TaGH1*, en los análisis de interacción con la planta, presentó un aumento en su expresión de cinco veces con respecto del control en el tercer tiempo de colecta, lo que sugiere que esta proteína pueda funcionar degradando algún componente de la pared celular vegetal, para facilitar que *Trichoderma* colonice a la planta. Se ha reportado que enzimas del complejo celulolítico de *T. longibrachiatum* en interacción con plantas de melón, inducen el sistema de defensa vegetal, además de provocar síntomas de respuesta hipersensible (Martínez *et al.*, 2001). También se ha reportado que la hidrolasa

EIX (Ethylene-Inducing Xylanase), de *T. viride* activa la síntesis de etileno y la respuesta hipersensible en plantas de tabaco (Rotblat *et al.*, 2002). En hongos fitopatógenos es común encontrar enzimas pertenecientes a las GH que degradan componentes de la pared celular vegetal, ayudando a colonizar la planta; en algunas de estas enzimas, la actividad efectora es independiente de su actividad enzimática (Enkerli *et al.*, 1999; Poinssot *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 1997; Ma, 2008).

Los resultados de la expresión diferencial de los genes antes mencionados sugieren una función importante mediando la interacción de *Trichoderma* con la planta. Para determinar la posible función de los candidatos a efectores nos centramos en *TaL6*, *TaCFEM5* y *TvCyt2*, ya que, se conoce poco sobre la participación de este tipo de efectores en especies de *Trichoderma* en interacción con plantas.

El gen *TaL6*, incrementó su expresión en los tres tiempos probados, siendo hasta cuatro veces mayor con respecto al control a los siete días de interacción. En patógenos como *C. fulvum* y *Mycosphaerella graminicola* se ha propuesto que estas proteínas son capaces de unir oligosacáridos de quitina, previniendo la activación del sistema inmune de la planta y/o protegiendo las hifas del ataque de las quitinasas secretadas por la planta u otros hongos (Van den Burg *et al.*, 2006; de Jonge *et al.*, 2010; Marshall *et al.*, 2011). Los datos obtenidos en las interacciones de las cepas mutantes y sobreexpresantes, no son concluyentes y no permiten sugerir una función del gen durante la interacción con la planta. Sin embargo, en las confrontaciones con los dos grupos de anastomosis de *R. solani* es claro que la sobreexpresión del gen le brinda a *Trichoderma* una mejor

capacidad antagónica, misma que se ve disminuida en la cepa que no contiene el gen. Esto hace sugerir que *TaL6* actúa enmascarando la presencia de *Trichoderma* o bien protegiéndolo de la acción de las quitinasas secretadas por los fitopatógenos. Cuando se probaron medios suplementados con distintos componentes estructurales, tanto vegetales como fúngicos, sólo se observó un ligero incremento en la expresión de *TaL6* en presencia de exudados de raíz de *Arabidopsis* a las 6 h, no así ante la presencia de celulosa, paredes vegetales o quitina. Es posible que se requiera de la suma de diferentes moléculas liberadas por estos organismos para inducir la expresión del gen *TaL6*. Se ha reportado que los miembros de esta familia participan activamente en la interacción con quitina (Marshall *et al.*, 2011; Kombrick & Thomma, 2013; Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Seidl *et al.* (2013) reportaron que la proteína *TaL6*, contiene siete secuencias LysM que son muy distintas a las que se han reportado en otros organismos, además mostraron que un oligosacárido de N-acetilglucosamina de diferentes tamaños. Proponen que esta proteína podría tener una función distinta a las ya reportadas, más relacionada con el crecimiento y desarrollo del hongo, ya que observaron inhibición de la germinación de *T. atroviride*, pero no de otros hongos. Sin embargo, los resultados que hasta el momento se han obtenido sugieren que *TaL6* tiene una función durante la interacción *Trichoderma*-planta y *Trichoderma*-hongo.

El candidato *TaCFEM5* mostró una ligera disminución de su nivel de expresión a los tres días de interacción, que aumentó a los cinco y siete días de interacción, llegando a mostrar hasta trece veces más mensajero con respecto al control. En *M. grisea* la proteína PTH11, de la familia CFEM, está involucrada en

la diferenciación del apresorio en respuesta a señales externas (DeZwaan *et al.*, 1999; Kulkarni *et al.*, 2003). En *B. cinerea* se ha reportado que la proteína BTP1 no está involucrada directamente en procesos de patogenicidad sin embargo, se le relaciona con la transducción de señales, favoreciendo el proceso infeccioso (Gronover *et al.*, 2005). En la base de datos del NCBI, se predice que *TaCFEM5* puede tener la función como receptor acoplado a proteínas G tipo PTH11. La proteína Gpr1 es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y es homóloga a *TaCFEM5* en *T. atroviride*, se ha reportado que tiene una función durante la detección de señales externas y su transducción a moléculas blanco durante interacciones antagónicas, posiblemente mediadas por AMPc. En una cepa silenciada de *gpr1* se observó una disminución de la capacidad antagónica de *T. atroviride* contra *R. solani*, sugiriendo un cambio en el reconocimiento del ambiente externo y por consiguiente una deficiencia en la secreción de metabolitos secundarios y enzimas líticas (Brunner *et al.*, 2008; Omann *et al.* 2012).

Los resultados de las interacciones de las mutantes *tacfem5* y la línea marcadora *pLox2*, donde se observa un aumento en la activación de esta vía de respuesta vegetal, sugieren que la falta de este receptor y de toda la señalización posterior en *Trichoderma* podría conducir a que la planta perciba al hongo como una señal de estrés más intensa. Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de confrontación con *R. solani* y la cepa mutante *tacfem5*, indican que este candidato no está involucrado con la capacidad antagónica de *T. atroviride*, no obstante, no se descarta que contra otros fitopatógenos pueda tener una función relacionada al antagonismo. Es posible que la función de *TaCFEM5* esté

relacionada con la detección de señales externas, con cierta especificidad dependiendo del organismo en interacción. Es necesario realizar más estudios para determinar la cascada de señalización que pudiera activarse a través de esta proteína.

En cuanto a los análisis para determinar posibles inductores de la expresión de este gen, se encontró que este candidato responde a la presencia de paredes vegetales, exudados de raíz y quitina, lo que también sugiere que se encuentra participando en sensor cambios en el ambiente externo del hongo.

Referente a la localización de los posibles efectores, para *TaL6-mCherry*, a pesar de que se realizaron más de tres transformaciones, no se obtuvieron clonas positivas; para la fusión *TaCFEM5-mCherry*, únicamente se obtuvo una transformante conteniendo la construcción, sin embargo, no fue posible observar fluorescencia. Esto podría deberse a que el plegamiento de la proteína interfiera con el plegamiento de mCherry, impidiendo la emisión de fluorescencia.

El único candidato seleccionado de *T. virens*, el gen *TvCyt2*, mostró una disminución de su expresión durante el primer tiempo analizado, dicho gen codifica para una monooxigenasa p450. Varias de las monooxigenasas p450 reportadas en hongos están implicadas en la biosíntesis de metabolitos secundarios tóxicos para otros organismos o bien están asociadas a procesos de detoxificación (Butchko *et al.*, 2006; Proctor *et al.*, 2006; Bojja *et al.*, 2004; Črešnar y Petrič, 2011). En *Trichoderma*, existen reportes de monooxigenasas p450 involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antagónica contra hongos fitopatógenos (Carpenter *et al.*, 2008; Cardoza *et al.*, 2011; Malmierca *et al.*, 2012).

En el grupo de trabajo, se analizaron cepas de *T. virens* sobreexpresantes del gen *TvCyt2*. Al realizar ensayos de interacción con *A. thaliana* y con hongos fitopatógenos, se encontró una mayor activación del sistema de defensa vegetal y una mayor actividad antagónica contra el fitopatógeno *S. cepivorum* (Porras Troncoso, 2014). Los resultados sugieren que el producto del gen *TvCyt2* podría participar en la síntesis de compuestos responsables de activar de manera más intensa las vías de defensa, es probable que la expresión de este gen disminuya como parte de un control global durante el establecimiento de la interacción. Este comportamiento en la expresión de genes, también se ha visto en los genes *ep11* y *Tatrx2* (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2017). Además, en un análisis transcriptómico en *T. atroviride* en interacción con *A. thaliana*, mostraron un número mayor de genes que disminuyen su expresión, que aquellos que mostraron un incremento, sugiriendo que la presencia de la planta provee señales que participan en la regulación negativa de algunos genes normalmente expresados en estado vegetativo, contribuyendo al establecimiento de la simbiosis (López-Ramírez, 2016. Tesis de Maestría).

El análisis de los niveles de expresión de *TvCyt2* en diferentes fuentes de carbono indican que el gen responde ligeramente a la presencia de quitina, donde se observó un aumento en el primer tiempo, sugiriendo que el gen *TvCyt2* puede responder a la presencia de otros hongos. Se analizó su expresión en confrontación directa con *R. solani* AG2 y AG5. Con AG2 no hubo cambios en su nivel de expresión, mientras que con AG5 hubo un aumento en el segundo tiempo de colecta. Porras Troncoso (2016), observó que las cepas mutantes nulas de *T. virens* fueron menos eficientes para controlar a las dos cepas de *R. solani* AG2,

indicando que la cantidad de mensajero producida por la cepa silvestre es suficiente para controlar a AG2 y al quitar el gen, *Trichoderma* no es capaz de limitar de la misma manera el crecimiento del fitopatógeno, sugiriendo que la proteína *TvCyt2* está implicada en la síntesis de metabolitos secundarios que son necesarios para los procesos de biocontrol de *Trichoderma*. En el caso de la cepa AG5, a pesar de que *TvCyt2* se ve inducido, los metabolitos que se producen a través de la vía donde éste participa, tienen poco impacto sobre AG5. Estos resultados, indican que *TvCyt2* participa activamente en las asociaciones que *T. virens* establece con hongos y con plantas.

Es importante destacar, que los efectos observados en *Arabidopsis* y en el fitopatógeno, deben ser la suma de múltiples factores coordinados finamente durante las asociaciones. Con los resultados obtenidos, se demuestra que de los 21 candidatos analizados, *TaL6* y *TvCyt2*, están involucrados en la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra cepas de *R. solani*, mismos que junto con *TaCFEM5* podrían participar como moduladores durante la interacción de *Trichoderma* con la planta.

CONCLUSIÓN

Trichoderma posee genes diferencialmente expresados en la interacción con planta. Los genes *TaL6*, *TaCFEM6* y *TvCyt2* son importantes mediando asociaciones de *Trichoderma* con la planta y con fitopatógenos.

PERSPECTIVAS

Expresar de manera heteróloga el gen *TaL6* y caracterizarlo bioquímicamente.

Analizar el efecto protector de la proteína *TaL6* durante la interacción con *A. thaliana* y en una interacción tripartita.

Obtener cepas de *Trichoderma* que sobreexpresen al candidato *TaCFEM5*, así como cepas que contengan las fusiones *TaL6-mCherry* y *TaCFEM5-mCherry* y determinar su localización durante las asociaciones de *Trichoderma*.

Determinar si el candidato *TaCFEM5* está implicado en activar alguna ruta de señalización en *Trichoderma*, si es así, con qué proteína G interactúa, la ruta que desencadena y cuál o cuáles son los blancos finales, para así elucidar de qué manera *TaCFEM5* modula las interacciones de *Trichoderma* con su entorno y en particular con la planta.

Analizar si en interacciones de *Trichoderma* con otros sistemas vegetales se obtiene el mismo patrón de expresión de los genes candidatos *TaL6*, *TaCFEM5* y *TvCyt2*, para determinar su grado de especificidad.

Realizar ensayos de cultivos en tierra de las cepas mutantes y sobreexpresantes de los candidatos *TaLysM2*, *TaCFEM5* y *TvCyt2* con plantas de *Arabidopsis* o tomate y con diferentes fitopatógenos, para determinar la protección que los candidatos pudieran brindarle a la planta.

Determinar la expresión de los genes *TaL6* y *TaCFEM5* en confrontación con fitopatógenos.

REFERENCIAS

1. **Alemán-Duarte, M.I. (2014).** Effector coding capacity of *Trichoderma* spp and its possible role during confrontation with *Rhizoctonia solani*. Tesis de Maestría. Cinvestav-Irapuato.
2. **Alfano, G., Ivey, M.L., Cakir, C., Bos, J.I., Miller, S.A., Madden, L.V., Kamoun, S. & Hoitink, H.A. (2007).** Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. *Phytopathology*. **97(4)**, 429-37.
3. **Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. & Nicolás, C. (2014).** Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol*. **15(8)**, 823-31.
4. **Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T. & Harman, G.E. (1999).** Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol*. **65**, 2926-33.
5. **Ausubel, F.M. (2005).** Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*. **10**, 973-979.
6. **Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M. (2006).** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*. **57**, 233-66.
7. **Baldwin, N.C., Bycroft, B.W., Dewick, P.M., Gilbert, J. & Holden, I. (1985).** Biosynthesis of trichothecene mycotoxins in *Fusarium culmorum* cultures. *Z Naturforsch C*. **40**, 514-8.

8. **Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, D., Young, C., Kamoun, S. & Haldar, K. (2006).** The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* **2**, e50.
9. **Bimboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
10. **Blilou, I., Ocampo, J.A. & García-Garrido, J.M. (2000).** Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J Exp Bot.* **353**, 1969-77.
11. **Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H., Du, L. (2004).** Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2855–2860.
12. **Boyd, L.A., Ridout, C., O’Sullivan, D.M., Leach, J.E. & Leung, H. (2013).** Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics.* **29**, 233-240.
13. **Brewer, D. & Taylor, A. (1981).** Ovine ill-thrift in Nova Scotia. 7. *Trichoderma hamatum* isolated from pasture soil. *Mycopathologia*, **76(3)**, 167–173.
14. **Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., & Chet, I. (2008).** Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology.* **147(2)**, 779–89.

15. **Brunner, K., Omann, M., Pucher, M.E., Delic, M., Lehner, S.M., Domnanich, P., Kratochwill, K., Druzhinina, I., Denk, D. & Zeilinger, S. (2008).** *Trichoderma* G protein-coupled receptors: functional characterisation of a cAMP receptor-like protein from *Trichoderma atroviride*. *Curr Genet.* **54(6)**, 283-99.
16. **Butchko, R.A., Plattner, R.D. & Proctor, R.H. (2006).** Deletion analysis of FUM genes involved in tricarballic ester formation during fumonisin biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9398–9404.
17. **Caillaud, M., Asai, S., Rallapalli, S., Piquerez, S., Fabro, G. & Jones, J. (2013).** A downy mildew effector attenuates Salicylic Acid–Triggered Immunity in *Arabidopsis* by interacting with the Host Mediator Complex. *PLoS Biol.* **11**, e1001732.
18. **Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., Hermosa, M.R., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Proctor, R.H., Tijerino, A.M., Rumero, A., Monte, E. & Gutiérrez, S. (2011).** Identification of loci and functional characterization of trichothecene biosynthesis genes in filamentous fungi of the genus *Trichoderma*. *Appl Environ Microbiol.* **77(14)**, 4867-77.
19. **Carpenter M. A., Ridgway H. J., Stringer A. M., Hay A. J., Stewart A. (2008).** Characterisation of a *Trichoderma hamatum* monooxygenase gene involved in antagonistic activity against fungal plant pathogens. *Curr Genetics.* **53**, 193-205.
20. **Carsolio, C., Gutiérrez, A., Jiménez, B., Van Montagu, M. & Herrera-Estrella A. (1994).** Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum*

- endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 10903-7.
21. **Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E.U., Villalobos-Escobedo, J.M., Abreu-Goodger, C. & Herrera-Estrella, A. (2013).** The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Mol Microbiol*. **89(1)**, 96-112.
22. **Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. **162**, 156-159.
23. **Contreras, H. A., Macias, L., Cortes, C. & Lopez-Bucio, J. (2009).** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 1579-1592.
24. **Črešnar, B. & Petrič, S. (2011).** Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim Biophys Acta*. **1814(1)**, 29-35.
25. **Davidson, R.C., Blankenship, J.R., Kraus, P.R., de Jesus Berrios, M., Hull, C.M., DSouza, C., Wang, P. & Heitman, J. (2002).** A PCR based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology*. **148**, 2607–2615.
26. **De Jonge, R. & Thomma, B.P. (2009).** Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol*. **17(4)**, 151-7.

27. **De Jonge, R., Van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., Van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H. & Thomma, B.P. (2010).** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science*. **329(5994)**, 953-5.
28. **De Souza, J.T., Bailey, B.A., Pomella, W.V., Erbe, E.F., Murphy, C.A., Bae, H. & Hebbar, P.K. (2008).** Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. *Biological Control* **46**, 36–45.
29. **DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B. & Sweigard, J.A. (1999).** *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**, 2013-2030.
30. **Djonovic, S., Pozo, M.J., Dangott, L.J., Howell, C.R. & Kenerley, C.M. (2006).** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 838-853.
31. **Djonovic, S., Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Horndeski, M., Wiest, A. & Kenerley, C. M. (2007).** A proteinaceous Elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* **145**, 875-889.
32. **Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. & Kahmann, R. (2009).** Pep1, a

- secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* **5**, e1000290.
33. **Dubey, M., Jensen, D. & Karlsson, M. (2014).** Hydrophobins are required for conidial hydrophobicity and plant root colonization in the fungal biocontrol agent *Clonostachys rosea*. *BMC Microbiol.* **14**, 18.
34. **Druzhinina, I.S., Seidl, V., Herrera, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., et. al. (2011).** *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Rev. Microbiol.* **9**, 749–59.
35. **Enkerli, J., Felix, G. & Boller, T. (1999).** The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.* **121**(2), 391-7.
36. **Esquivel-Naranjo, E.U. & Herrera-Estrella, A. (2007).** Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology.* **153**, 3909-22.
37. **Frías, M., González, C. & Brito, N. (2011).** BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* **192**, 483–495.
38. **Gaderer, R., Lamdan, N., Frischmann, A., Sulyok, M., Krska, R., Horwitz, B. & Seidl, V. (2015).** Sm2, a paralog of the *Trichoderma* cerato-platanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. *BMC Microbiol.* **15**, 2.
39. **Glazebrook, J. (2005).** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* **43**, 205-27.

40. **Gronover, C.S., Schumacher, J., Hantsch, P. & Tudzynski, B. (2005).** A novel seven-helix transmembrane protein BTP1 of *Botrytis cinerea* controls the expression of GST-encoding genes, but is not essential for pathogenicity. *Mol Plant Pathol.* **6(3)**, 243-56.
41. **Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M.I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., & Olmedo-Monfil, V. (2017).** Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genet* **18**, 16.
42. **Harman, G.E. (2000).** Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22, (D), 377–393.
43. **Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004a).** *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* **2**, 43-56.
44. **Harman, G.E., 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**, 147-153.
45. **Harman, G.E. (2011).** Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol.* **189(3)**, 647-9.
46. **Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012).** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* (Reading, England). **158**, 17–25.

47. **Jayaraman, D., Forshey, K.L., Grimsrud, P.A & Ané, J.M. (2012).** Leveraging proteomics to understand plant–microbe interactions. *Frontiers in plant science*. **3**, doi: 10.3389/fpls.2012.00044.
48. **Jones, J.D. & Dangl, J.L. (2006).** The plant immune system. *Nature*. **444**(7117):323-9.
49. **Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A. & Tyler, B.M. (2010).** External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell*, **142**, 284–95.
50. **Kambara, K., Ardisson, S., Kobayashi, H., Saad, M.M., Schumpp, O., Broughton, W.J. & Deakin, W.J. (2009).** Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Mol Microbiol*. **71**, 92-106.
51. **Kamoun, S. (2006).** A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 41-60.
52. **Kamoun, S. (2007).** Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol*. **4**, 358-65.
53. **Kemen, E., Mendgen, K., & Voegelé, R.T. (2011).** Plant Immunity. In J. M. McDowell (Ed.), *Plant Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 712, pp. 211–225. Totowa, NJ: Humana Press.
54. **Kim, S., Ahn, P.P., Rho, S.S. & Lee, H.H. (2005).** MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol. Microbiol*. **57**, 1224–37.

55. **Kloppholz, S., Kuhn, H. & Requena, N. (2011).** A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr Biol.* **21**, 1204-9.
56. **Kombrink, A, Thomma, B.P. (2013).** LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. *PLoS Pathog.* **9(12)**, e1003769.
57. **Kubicek, C.P., Herrera, A., Seidl, V., Martinez, D., Druzhinina, I.S., Thon, M., Grigoriev, I.V., et. al. (2011).** Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, **12(4)**, R40.
58. **Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S. & Dean, R.A. (2003).** An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem Sci.* **28**,118-21.
59. **Kulkarni, R.D., Thon, M.R., Pan, H. & Dean, R.A. (2005).** Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome Biol.* **6**, R24.
60. **Lamdan, N.L., Shalaby, S., Ziv, T., Kenerley, C.M. & Horwitz, B.A. (2015).** Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Mol Cell Proteomics.* **14(4)**, 1054-63.
61. **Linger, J.G., Taylor, L.E., Baker, J.O., Vander Wall, T., Hobdey, S.E., Podkaminer, K., Himmel, M.E. & Decker, S.R. (2015).** A constitutive expression system for glycosyl hydrolase family 7 cellobiohydrolases in *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels.* **18**, 8:45.
62. **López-Ramírez, Fabiola. (2016).** Papel de las NADPH oxidasas en el control biológico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad de Genómica

Avanzada. Irapuato, Guanajuato.

63. **Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. & Monte, E. (2010).** Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annu Rev Phytopathol.* **48**, 395-417.
64. **Luo, Y., Zhang, D.D., Dong, X.W., Zhao, P.B., Chen, L.L., Song, X.Y., Wang, X.J., Chen, X.L., Shi, M. & Zhang, Z. (2010).** Antimicrobial peptaibols induce defense responses and systemic resistance in tobacco against tobacco mosaic virus. *FEMS Microbiol Lett* **313**, 120–126.
65. **Ma, C.J. (2008).** Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annum L.* suspension cultures. *Biotechnol Lett.* **30(5)**, 961-5.
66. **Malmierca, M.G., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., McCormick, S.P., Hermosa, R., Monte, E. & Gutiérrez, S. (2012).** Involvement of *Trichoderma* Trichothecenes in the biocontrol activity and induction of plant defense-related genes. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4856-4868.
67. **Manning, V.A., Hamilton, S.M., Karplus, P.A. & Ciuffetti, L.M. (2008).** The Arg-Gly-Asp-containing, solvent-exposed loop of Ptr ToxA is required for internalization. *Mol Plant Microbe Interact.* **21**, 315-25.
68. **Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond Kosack, K., Thomma, B. & Rudd, J. (2011).** Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiol.* **156**, 756–769.

69. **Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., Baccou, J.C. (2001).** Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol.* **127(1)**, 334-44.
70. **Mehrabi-Koushki, M., Rouhani, H. & Mahdikhani-Moghaddam, E. (2012).** Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. *Curr Microbiol.* **65(5)**, 524-33.
71. **Mgbeahuruike, A.C., Karlsson, M. & Asiegbu, F.O. (2012).** Differential expression of two hydrophobin genes (*Pgh1* and *Pgh2*) from the biological control agent *Phlebiopsis gigantea*. *Fungal Biol.* **5**, 620-9.
72. **Morán, E., Rubio, B., Domínguez, S., Hermosa, R., Monte, E. & Nicolás, C. (2012).** Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24 h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *J Plant Physiol.* **169(6)**, 614-20.
73. **Müller, U., Tenberge, K.B., Oeser, B. & Tudzynski, P. (1997).** Cel1, probably encoding a cellobiohydrolase lacking the substrate binding domains expressed in the initial infection phase of *Claviceps purpurea* on *Secale cereale* *Mol Plant Microbe Interact.* **10(2)**, 268-79.
74. **Murashige, T., & Skoog, F. (1962).** A reviser medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473-497.
75. **Omann, M.R., Lehner, S., Escobar, C., Brunner, K. & Zeilinger, S. (2012).** The seven-transmembrane receptor Gpr1 governs processes

- relevant for the antagonistic interaction of *Trichoderma atroviride* with its host. *Microbiology*. **158**(Pt 1), 107-18.
76. **Pakula, T.M., Uusitalo, J., Saloheimo, M., Salonen, K., Aarts, R.J. & Penttilä, M. (2000)**. Monitoring the kinetics of glycoprotein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*: cellobiohydrolase I (CBHI) as a model protein. *Microbiology*. **146**, 223-32.
77. **Peterson, R. & Nevalainen, H. (2012)**. *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. *Microbiology*. **158**, 58-68.
78. **Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees S.C. (2009)**. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*. **5**,308-16.
79. **Pineda, A., Dicke, M., Pieterse, M.J. & Pozo, M.J. (2013)**. Beneficial microbes in a changing environment: are they always helping plants to deal with insects? *Functional Ecology* **27**, 574–586
80. **Plett, J.M., Kemppainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legue, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G. & Martin, F. (2011)**. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* **21**, 1197–1203.
81. **Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. & Pugin, A. (2003)**. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact*. **16**(6), 553-64.

82. **Porras-Troncoso, M.D. (2014).** Efecto de los exudados de raíz de *Arabidopsis thaliana* sobre la expresión de genes que codifican proteínas tipo efector de *Trichoderma* spp y análisis de una cepa sobreexpresante del gen *eTv8*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Biología. DCNE-Universidad de Guanajuato.
83. **Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busman, M. & Butchko, R.A. (2006).** Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2424–2430.
84. **Reader, U. & Broda, P. (1985).** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Applied Microbiology.* **1**, 17-20.
85. **Riely, B.K., Ané, J.M., Penmetsa, R.V. & Cook, D.R. (2004).** Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr Opin Plant Biol.* **4**,408-13.
86. **Riely, B.K., Mun, J.H. & Ané, J.M. (2006).** Unravelling the molecular basis for symbiotic signal transduction in legumes. *Mol Plant Pathol.* **3**,197-207.
87. **Ryan, C.A. (1974).** Assay and biochemical properties of the proteinase inhibitorinducing factor, a wound hormone. *Plant Physiol* **54**, 328-332.
88. **Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J.M., Schuster, S. & Avni, A. (2002).** Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J.* **32(6)**, 1049-55.
89. **Rubio, M.B., Domínguez, S., Monte, E. & Hermosa, R. (2012).** Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with

- tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays. *Microbiology*. **158**, 119-28.
90. **Salas, M.A., Silva, M.A., Uresti, E.E., Castro, E., Herrera, A. & Casas, S. (2011).** Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European J. Plant Pathol.* **131**, 15-26.
91. **Salas, M.A., Isordia, M.I., Islas, M.A., Delgado, P., Jiménez, J.F., Rodríguez, M., Rosales, M.T., Herrera, A. & Casas, S. (2015).** The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in plant science*. **6 (77)**, 15-26.
92. **Samolski, I., de Luis, A., Vizcaíno, J.A., Monte, E., & Suárez, M.B. (2009).** Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology*. **9**, 217.
93. **Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Dirk-Jan, V., Thomma, B. & Mesters, J. (2013).** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* **2**, e00790.
94. **Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G., & Kubicek, C.P. (2006).** Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose,

- is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *The FEBS Journal*, **273(18)**, 4346–59.
95. **Seidl, V., Zach, S., Frischmann, A., Spadiut, O., Dietzsch, C., Herwig, C., Ruth, C., Rodler, A., Jungbauer, A. & Kubicek, C.P. (2013).** Spore germination of *Trichoderma atroviride* is inhibited by its LysM protein TAL6. *FEBS J.* **280(5)**, 1226–36.
96. **Schornack, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van Damme, M., et. al. (2009).** Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 795–803.
97. **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.
98. **Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. (2010).** Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Ann. Rev. Phytopathol.* **48**, 21–43.
99. **Spanu, P.D., Abbott, J.C., Amselem, J., Burgis, T.A., Soanes, D.M., Stuber, K., et. al. (2010).** Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science.* **330**, 1543–1546.
100. **Taiz, L. & Zeiger, E. (2006)** Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 764 pages.
101. **Torto, T.A., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N.A., van West, P. & Kamoun, S. (2003).** EST mining and functional expression

- assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Res.* **13**, 1675-85.
102. **Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. & Lorito, M. (2011).** The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 341–54.
103. **Van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H., Vervoort, J. & de Wit, P.J. (2006).** *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact.* **19(12)**, 1420-30.
104. **Van Spronsen, P.C., Tak, T., Rood, A.M., Van Brussel, A.A., Kijne, J.W. & Boot, K.J. (2003).** Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Mol Plant Microbe Interact.* **1**, 83-91.
105. **Van Wees, S.C., Van der Ent, S. & Pieterse, C.M. (2008).** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr Opin Plant Biol.* **4**, 443-8.
106. **Velázquez, R., Contreras, H.A., Macías, L., Hernández, A., Aguirre, J., Casas, S., Herrera, A. & López, J. (2011).** Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **24**, 1459 – 71.
107. **Viterbo, A., & Chet, I. (2006).** TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular Plant Pathology*, **7(4)**, 249–258.

108. **Vogel, H.J. (1956).** A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbiol Genet Bull* **13**, 42-43.
109. **Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., Apostolakis, K., Linne, U., Zhukov, I., Stanek, J., Kozminski, W., Davidson, I., Secombes, C.J., Bayer, P., & van West, P. (2017)** The RxLR motif of the host targeting effector AVR3 of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion. *Plant cell*. **26**, 1184-1195.
110. **Weiberg, A., Wang, M., Feng, L., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Hsien, H. & Jin, H. (2013).** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*. **342**, 118–123.
111. **Woo, S.L., Scala, R., & Lorito, M. (2006).** The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. *The American Phytopathological Society*. **96(2)**, 181–185.
112. **Yaeno, T. & Shirasu, K. (2013).** The RXLR motif of oomycete effectors is not a sufficient element for binding to phosphatidylinositol monophosphates. *Plant Sign. Behav.* **8**, e23865.
113. **Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I. (1999).** Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. *Plant Physiol Biochem* **38**, 863-873.
114. **Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes, Y. & Scazzocchio, C. (2004).** Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **4**, 973-981.

115. **Zhang, Y., Zhang, Y., Qiu, D., Zeng, H., Guo, L. & Yang, X. (2015).** BcGs1, a glycoprotein from *Botrytis cinerea*, elicits defence response and improves disease resistance in host plants. *Biochem Biophys Res Commun.* **20**, 627-34.
116. **Zhu, W., Wei, W., Fu, Y., Cheng, J., Xie, J., Li, G., Yi, X., Kang, Z., Dickman, M.B. & Jiang, D. (2013).** A secretory protein of necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* that suppresses host resistance. *PLoS One.* **8**, e53901.