



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“La maquinaria de silenciamiento génico mediada por sRNAs de
Arabidopsis thaliana y su papel en el establecimiento de una relación
benéfica con *Trichoderma atroviride*”**

Tesis que presenta

Oscar Guillermo Rebolledo Prudencio

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S. L. P., Julio de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“La maquinaria de silenciamiento génico mediada por sRNAs de *Arabidopsis thaliana* y su papel en el establecimiento de una relación benéfica con *Trichoderma atroviride*”*** presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Oscar Guillermo Rebolledo Prudencio** y aprobada el **trece de julio del dos mil quince** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. J. Sergio Casas Flores
Director de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. J. Sergio Casas Flores.

El presente trabajo fue apoyado por los proyectos SEP-2010-103733 y FORDECYT-2012-02-193512 otorgados a Sergio Casas y a Ramón Guevara respectivamente

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. de registro: 298745



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 135 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Oscar Guillermo Rebolledo Prudencio

sobre la Tesis intitulada:

La maquinaria de silenciamiento génico mediada por sRNAs de Arabidopsis thaliana y su papel en el establecimiento de una relación benéfica con Trichoderma atroviride

que se desarrolló bajo la dirección de

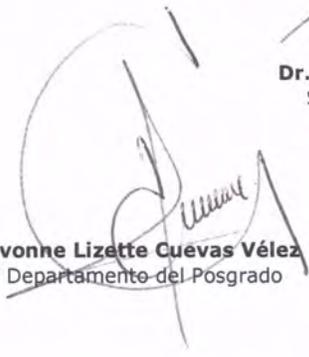
Dr. J. Sergio Casas Flores

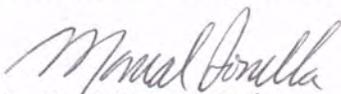
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2015.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mi familia por el apoyo incondicional y el amor que me brindaron durante la obtención de esta meta académica.

Agradecimientos

Al Dr. J. Sergio Casas Flores, por ser un gran director, por sus consejos, enseñanzas y apoyo.

A la M. C. Magnolia Estrada Rivera por su paciencia, enseñanzas y amistad.

A mis asesores la Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro y Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por sus valiosos comentarios y sugerencias de este trabajo.

Al Dr. Nicolás Gómez Hernández, por su apoyo y los consejos en la etapa experimental.

A mis compañeros de trabajo: Mayte Cervantes, Macario Osorio, Angélica Ramírez y José Luis Rodríguez, por su amistad, por hacer muy ameno el trabajo en el laboratorio y por sus valiosos consejos.

A mis amigos de generación por hacer divertida esta etapa.

En especial a mi esposa Karen por escucharme, aconsejarme y acompañarme en este viaje.

Acta de examen

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Acta de examen	vi
Contenido	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Página de título	1
Introducción	2
Resultados	6
<i>T. atroviride</i> induce de manera sistémica y transitoria, a los genes marcadores de la SAR y la ISR en <i>A. thaliana</i>	6
Los genes parálogos <i>DCL</i> de <i>A. thaliana</i> se inducen diferencialmente a nivel local y sistémico durante su interacción con <i>T. atroviride</i>	6
<i>T. atroviride</i> induce diferencialmente la expresión de los genes <i>AGO1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</i> y <i>10</i> a nivel local y sistémico en <i>Arabidopsis</i>	7
La mutante <i>ago4-2</i> está afectada en la inducción de los genes <i>PR-1a</i> y <i>LOX-2</i> por <i>T. atroviride</i>	8
La ausencia de <i>AGO4</i> no afectó el efecto protector que confiere <i>T. atroviride</i> a <i>Arabidopsis</i> contra <i>B. cinerea</i> y pero si a <i>Pst</i> DC3000	8
Discusión	10
Métodos	14
Material biológico y condiciones de crecimiento.....	14
Análisis de la expresión.....	15
Ensayo de protección en <i>Arabidopsis</i> inducido por <i>T. Atroviride</i> contra hongos y bacterias fitopatógenas	15
Contribución de los autores	17
Bibliografía	18

Lista de Figuras

Figura 1. <i>T. atroviride</i> induce de manera sistémica y transitoria los genes marcadores de la SAR y la ISR en <i>A. thaliana</i>	28
Figura 2. <i>T. atroviride</i> induce la expresión de los genes <i>DCL1-4</i> de manera sistémica y transitoria en <i>A. thaliana</i>	29
Figura 3. <i>T. atroviride</i> induce la expresión de los genes <i>DCL1-4</i> de manera sostenida en las raíces de <i>A. thaliana</i>	30
Figura 4. <i>Trichoderma atroviride</i> induce la expresión de los genes <i>AGO1-10</i> de manera sistémica y transitoria en <i>A. thaliana</i>	301
Figura 5. <i>Trichoderma atroviride</i> induce la expresión de los genes <i>AGO1-10</i> de manera transitoria en raíces de <i>A. thaliana</i>	32
Figura 6. La mutante <i>ago4-2</i> está afectada en la inducción de los genes <i>PR-1a</i> y <i>LOX-2</i> en <i>Arabidopsis</i> por <i>T. atroviride</i>	33
Figura 7. La ausencia de <i>AGO4</i> afectó el efecto protector que confiere <i>T. atroviride</i> a <i>Arabidopsis</i> contra <i>Pst</i> DC3000.....	34
Figura 8. La ausencia de <i>AGO4</i> no afectó el efecto protector que confiere <i>T. atroviride</i> a <i>Arabidopsis</i> contra <i>B. cinerea</i>	35

Lista de Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el análisis de qRT-PCR.....	27
--	----

Resumen

La maquinaria de silenciamiento génico mediada por sRNAs de *Arabidopsis thaliana* y su papel en el establecimiento de una relación benéfica con *Trichoderma atroviride*

Las plantas interactúan con microorganismos benéficos y deletéreos, que contrarrestan con sus sistemas de defensa. Para establecer una relación con las plantas, los microorganismos utilizan moléculas efectoras (principalmente proteínas) que suprimen su inmunidad. En las plantas, se han descrito la resistencia sistémica inducida (ISR), contra patógenos necrotróficos y la Resistencia sistémica adquirida (SAR), contra patógenos biotróficos. Se sabe que los RNAs pequeños de los hongos pueden silenciar la inmunidad de las plantas, al secuestrar su maquinaria del silenciamiento. En este trabajo, analizamos la expresión de los genes *LOX-2*, *PR-1a*, *dicer (DCL)* y argonauta (*AGO*) en *Arabidopsis thaliana* durante su interacción con *Trichoderma atroviride*, cuyos productos están involucrados en la ISR, la SAR y el silenciamiento génico mediado por RNAs pequeños respectivamente. *Trichoderma* indujo de manera sistémica, simultánea y transitoria la ISR y la SAR. La expresión de *DCL1 a 4* y *AGO1 a 10*, presentó la misma cinética que *PR-1a* y *LOX-2*, pero con un patrón de expresión diferencial en hojas y raíces. El análisis transcripcional de *PR-1a* y *LOX-2* en la mutante *ago4-2*, mostró niveles de inducción más bajos comparados con la silvestre, sin embargo, *Trichoderma* generó un efecto protector en *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea*.

Palabras claves: *Trichoderma*, *Arabidopsis*, resistencia sistémica, RNAs pequeños, *Dicer*, *Argonauta*

Abstract

The *Arabidopsis thaliana* sRNAs-mediated gene silencing machinery and its role on the establishment of a beneficial relationship with *Trichoderma atroviride*

Plants interact with a plethora of beneficial and deleterious microorganisms to establish a pathogenic or beneficial relationship. To this end, plants have developed sophisticated defense and recognition mechanisms respectively. To establish a relationship with plants, pathogens and beneficial microorganisms use effector molecules (mainly proteins) to suppress plant immunity. Plants have developed the induced systemic resistance (ISR), against necrotrophic microorganisms, whereas the systemic acquired resistance (SAR) is effective against hemibiotrophic and biotrophic pathogens. Recently the small RNAs were described as silencers of plant immunity by hijacking the plant silencing machinery. In this paper, we analyzed the expression of *PR-1a*, *LOX-2*, *dicer (DCL)* and *argonaute (AGO)* genes in *Arabidopsis thaliana* during its interaction with *T. atroviride*, whose products are involved in ISR, SAR and small RNA-mediated gene silencing respectively. *Trichoderma* induced systemically, simultaneously and transiently the ISR and SAR. The fungus induced the expression of *DCL1 to 4* and *AGO1 to 10*, in a similar kinetics to *PR-1a* and *LOX-2*, but with a different expression pattern in leaves and roots. Analysis of *PR-1a* and *LOX-2* in the *ago4-2* mutant inoculated with *Trichoderma* showed a lower expression compared to the wild-type, however, the fungus induced protection against *P. syringae* and *B. cinerea* in *Arabidopsis*.

Key words: *Trichoderma*, *Arabidopsis*, systemic resistance, small RNAs, *Dicer*, *Argonaute*

Página de título

“La maquinaria de silenciamiento génico mediada por sRNAs de *Arabidopsis thaliana* y su papel en el establecimiento de una relación benéfica con *Trichoderma atroviride*”

Oscar Guillermo Rebolledo Prudencio y J. Sergio Casas-Flores*

IPICYT, División de Biología Molecular. Camino a la presa San José No. 2055. Colonia Lomas 4^a. Sección, San Luis Potosí, S.L.P., México. C.P. 78216.

Direcciones de e-mail:

oscar.rebolledo@ipicyt.edu.mx

scasas@ipicyt.edu.mx*

* Autor para correspondencia

Introducción

En su ambiente natural, las plantas están expuestas a diferentes tipos de estreses tanto bióticos como abióticos. Las interacciones de las plantas con los microorganismos pueden ser benéficas o deletéreas, e independientemente del tipo de relación, se activan los sistemas de defensa de la planta, mientras que los microorganismos intentan suprimirlos para establecer una relación patogénica o benéfica (Yang & Huang, 2014). La primera capa de defensa de las plantas incluye barreras estructurales, como una capa densa de tricomas, la cutícula cerosa y una pared celular rígida compuesta por celulosa, pectina y hemicelulosa (Hammond-Kosack & Jones, 1997), cuyo objetivo es impedir la entrada de los patógenos a la célula vegetal. Una vez que el microorganismo pasa la primera capa de defensa, la planta lo reconoce a través de los PAMPs y los MAMPs (Patrones Moleculares Asociados a los Patógenos y Patrones Moleculares Asociados a los Microbios respectivamente), que inducen la inmunidad innata desencadenada por PAMPs (PTI) y MAMPs (MTI) respectivamente. Después del reconocimiento de los microorganismos, en la planta se desencadena la producción de metabolitos secundarios como las fitoalexinas, que presentan actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de componentes de refuerzo de la pared celular como la callosa (Collinge et al., 1994). Los PAMPs y los MAMPs inducen la resistencia sistémica adquirida (SAR) a través de la vía de señalización de la fitohormona ácido salicílico (SA, de sus siglas en inglés), el cual se acumula y difunde a partes alejadas del sitio de infección. La inducción de la SAR, correlaciona con la expresión de un grupo de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogenicidad (Proteínas PR), cuyo marcador por excelencia es *PR-1a* (Pieterse et al., 2001). Esta respuesta es eficiente contra microorganismos biotróficos y hemibiotróficos como *Pseudomonas syringae* pv tomato y *Colletotrichum* spp. (Hammond-Kosack & Jones, 1997). Los PAMPs y MAMPs, también inducen la resistencia sistémica inducida (ISR, de sus siglas en inglés) y depende de la síntesis de las fitohormonas ácido jasmónico y etileno (JA/ET, de sus siglas en inglés), cuyo marcador por excelencia en *Arabidopsis thaliana*, es el gen *LOX-2* que codifica para la lipoxigenasa-2 (Jakob et al., 2007). La ISR, es efectiva contra patógenos necrotróficos como el hongo *Botrytis cinerea*. Por su parte, los patógenos han desarrollado moléculas efectoras que suprimen a la PTI y a la MTI, lo que les permite

propagarse y ser exitosos en el huésped. En respuesta a las moléculas efectoras que suprimen la PTI y la MTI, las plantas han desarrollado proteínas de resistencia (R) que reconocen a los efectores, lo que promueve la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Chisholm et al., 2006). En este caso las plantas desencadenan la respuesta hipersensible (HR de sus siglas en inglés), una forma de muerte celular programada localizada en el sitio de infección para delimitar al patógeno y evitar su propagación a otras partes de la planta (Nomura et al., 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que después del ataque por un patógeno o por la colonización de la raíz de las plantas por un organismo benéfico, éstas incrementan su capacidad de defensa a un segundo ataque, al cual la planta responde de una manera más rápida y eficiente, comparada con plantas que no fueron atacadas por el patógeno o colonizadas por el microorganismo benéfico. Éste mecanismo es conocido como “priming” (estado hipersensibilizado).

Como se mencionó anteriormente, también existen microorganismos que logran establecer interacciones benéficas con las plantas, como las bacterias y hongos promotores de crecimiento (Glick et al., 1998). Los hongos del género *Trichoderma*, son hongos filamentosos, ascomicetos, que habitan el suelo, de una variedad de ecosistemas, que incluyen bosques, pastizales, desiertos y suelos agrícolas, entre otros (Kubicek et al., 2008). Estos hongos son utilizados como agentes de biocontrol por la capacidad que poseen para colonizar la rizósfera y suprimir a los microorganismos patógenos del suelo. *Trichoderma* spp. también pueden colonizar las raíces de las plantas, cuyo proceso incluye la penetración de las barreras físicas, la resistencia del hongo a los compuestos antimicrobianos secretados por la planta, así como su reconocimiento y establecimiento (Hermosa et al., 2012). *Trichoderma* spp. emplea distintas estrategias para establecer una relación simbiótica. Por ejemplo, la hidrofobina de clase 1, TaHyd1, la swolenina TaSwo, una proteína tipo expansina y la endopoligalacturonasa ThPG1, son muy importantes para la colonización de la raíz por el hongo (Viterbo & Chet, 2006; Brotman et al., 2008; Morán-Diez et al., 2009). En reportes recientes, se ha demostrado que la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *T. atroviride* induce las vías de señalización SA y JA/ET simultáneamente, y confieren resistencia contra fitopatógenos necrotróficos y biotróficos (Salas-Marina et al., 2011). Otra característica de *Trichoderma* spp. es su capacidad para inducir el “priming” en las plantas y conferirles protección ante ataques subsecuentes por patógenos necrotróficos y

biotróficos (Salas-marina et al., 2015). Adicionalmente, *Trichoderma* presenta actividad de desaminasa de ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), que reduce la disponibilidad de la ACC necesaria para la biosíntesis de ET en la planta. De igual forma, el hongo produce a la fitohormona ácido indol-3-acético (IAA), que promueve la biosíntesis de ET por la vía del ACC, para suprimir la respuesta inmune regulada por SA (Stepanova., 2007). Estos datos en conjunto indican que *Trichoderma* es capaz de establecer un dialogo molecular con la planta, modulando las vía de señalización de las fitohormonas, lo que le permite suprimir la respuesta inmune de la planta.

Los ácidos ribonucleicos pequeños (sRNAs, por sus siglas en inglés) son moléculas no codificantes de 20 a 40 nucleótidos (nt) de largo, que se clasifican de acuerdo a su estructura precursora y a su biogénesis en dos grupos principales: 1) Los microRNAs (miRNAs) que provienen de una estructura tallo asa que produce el transcrito, y 2) RNAs interferentes pequeños (siRNAs) que se generan de un precursor de doble cadena de RNA perfectamente apareada (dsRNAs), en el cual están implicadas las RDR (RNA polimerasas dependientes de RNA) (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010). Una vez formadas las moléculas precursoras, estas son procesadas por la endoribonucleasa Dicer (DCL). En *Arabidopsis* existen los parálogos *DCL1 a 4* y cada una está implicada en la generación de sRNAs de diferentes tamaños. La proteína DCL1 genera sRNAs de 18 a 21 nt de largo, mientras que DCL2, DCL3 y DCL4 generan sRNAs de 22, 24 y 21 nt, respectivamente (Papp et al., 2003). Posteriormente, los precursores de los sRNAs son procesados por las proteínas DCL, HYL1 (en inglés Hyponastic Leaves1) y SE (del inglés SERRATE), para formar el RNA pequeño dúplex, que después es metilado en el extremo 3' por HEN1 (del inglés HUA ENHANCER 1) para conferirles una mayor estabilidad, y ser exportados al citoplasma por una proteína homóloga a la exportina, HST (HASTY). Una vez maduros, los siRNAs y los miRNAs se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISCs, por sus siglas en inglés) a través de las proteínas argonauta (AGO). *A. thaliana* presenta 10 parálogos (*AGO1 a -10*), que contienen tres dominios característicos, PAZ, Mid y PIWI. Los dos primeros dominios permiten reconocer y cargar al sRNA, y guiarlos a la secuencia complementaria del mRNA blanco, el cual es cortado por los residuos catalítico del dominio PIWI (DDH), que presenta actividad endonucleolítica (Song & Joshua-Tor, 2006). Basado en lo anterior, existen 3 niveles de silenciamiento: a) a nivel post-

transcripcional, que se lleva a cabo por la escisión del mensajero a través del dominio PIWI; b) a nivel traduccional por la inhibición de la traducción; c) a nivel transcripcional a través de la metilación del ADN o por la modificación química de las histonas para el arreglo de la cromatina (Baulcombe, 2004; Castel & Martienssen, 2013; Chang et al., 2012). Esta particular vía, RdDM en *A. thaliana* se conoce que participan los sRNAs de 24 nt y están involucrada en el crecimiento de raíces y brotes de la planta (Eun et al., 2011). De esta manera, los sRNAs y la maquinaria celular de biogénesis surgen como un regulador de la reproducción, el crecimiento, el metabolismo, el mantenimiento de la integridad del genoma y las respuestas a diversos tipos de estrés (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

El silenciamiento génico mediado por sRNAs ha sido reconocido como un importante mecanismo regulatorio en la respuesta inmune del huésped, tanto en las plantas, como en los animales y a diferencia de los virus que se replican en el interior de las células del huésped, las bacterias, hongos y otros microorganismos interactúan sin que haya replicación de DNA o transcripción de RNA dentro de la célula vegetal (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010). En estas interacciones, los sRNAs del huésped juegan un papel muy importante en la lucha contra estos patógenos. Los reportes recientes han mostrado que los sRNAs endógenos de la planta, incluyendo los miRNAs y siRNAs, son componentes regulatorios de la maquinaria de defensa de la planta contra bacterias y hongos (Zhang et al., 2011; Weiberg et al., 2013).

El objetivo del presente trabajo fue investigar el posible papel de los productos de los genes *DCLs* y *AGOs*, en el establecimiento de la relación benéfica entre *A. thaliana* y *T. atroviride*, así como la inducción de protección en la planta contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos. Con éste objetivo, se inocularon con *T. atroviride* las raíces de *A. thaliana* línea silvestre y mutante *ago4-2*, y se midió en la parte aérea y las raíces de la planta la expresión de los genes marcadores *PR-1a* y *LOX-2* de la SAR e ISR, respectivamente, así como a los parálogos *DCLs* y *AGOs*. También, se realizaron experimentos de protección inoculando las raíces de la planta con *Trichoderma* para posteriormente retarla con los patógenos *B. cinerea* y *Pst* DC3000.

Resultados

T. atroviride* induce de manera sistémica y transitoria, a los genes marcadores de la SAR y la ISR en *A. thaliana

En nuestro grupo de trabajo, hemos manejado como hipótesis, la posibilidad de que *Trichoderma* spp. al igual que los microorganismos patógenos y benéficos suprima la inmunidad de planta utilizando moléculas efectoras para establecer una relación benéfica. Con la finalidad de determinar los tiempos de inducción y la posible represión de los genes relacionados con la ISR y la SAR en *Arabidopsis* durante su interacción con *T. atroviride*, se inocularon las raíces de la planta con el hongo y 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación (hpi), se colectó la raíz y la parte aérea de la planta, se extrajo el RNA total, se sintetizó el cDNA y se midió en la parte aérea la expresión de los genes *PR-1a* y *LOX-2*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (por qRT-PCR). Como controles, se incluyeron plantas de *Arabidopsis* sin inocular a los distintos tiempos (Figura 1). A las 24 hpi de la planta con el hongo, la expresión de *PR-1a* fue de 2.8 veces, mientras que la expresión de *LOX-2* fue de 2.6 veces (Figura 1). A las 48 hpi la expresión de *PR-1a* fue de 338 veces, mientras que para *LOX-2* fue de 11.6 veces (Figura 1). La máxima expresión de ambos genes fue detectada a las 72 horas de interacción, en la que *PR-1a* y *LOX-2* alcanzaron niveles de 5,000 y 17 veces respectivamente (Figura 1). De manera interesante, los niveles de expresión de ambos genes disminuyeron considerablemente a las 96 h, hasta alcanzar valores de 950 para *PR-1a* y 4 para *LOX-2* (Figura 1). La cinética de expresión de los genes *PR-1a* y *LOX-2* sugiere que posterior a la inducción de la SAR y la ISR por *T. atroviride*, se presenta la supresión de la inmunidad de la planta por el hongo para establecer una relación benéfica.

Los genes parálogos *DCL* de *A. thaliana* se inducen diferencialmente a nivel local y sistémico durante su interacción con *T. atroviride*

Con la finalidad de obtener una aproximación sobre el papel putativo de la maquinaria del silenciamiento de *A. thaliana* en la supresión de su propia respuesta inmune por *T. atroviride*, se midió en las hojas y raíces de plántulas inoculadas con el hongo la expresión

de los genes *DCL1*, 2, 3 y 4 por medio de qRT-PCR a los mismos tiempos de co-cultivo descritos en la sección anterior. La expresión de los cuatro parálogos en las hojas a las 48 hpi fue de ~2 veces con respecto al grupo control. A las 72 hpi, la inducción de *DCL2* fue de 5 veces, seguida de la *DCL1* con 4.5 veces y *DCL4* y 3 con una inducción de 3.5 y 2.5 respectivamente (Figura 2). A las 96 hpi los niveles de expresión de los cuatro parálogos decayeron a sus niveles basales (Figura 2). La expresión de estos genes mostró una cinética similar a la que presentaron los genes *LOX-2* y *PR-1a* (Figura 1).

En la raíz, a las 24 hpi la expresión de los 4 parálogos *DCL* fue por arriba de 2 (Figura 3). A las 96 hpi, el gen *DCL1* presentó la mayor inducción con 8 veces, mientras que *DCL2*, 3 y 4 presentaron niveles de 3, 3 y 2 veces respectivamente, comparadas con el control sin inocular (Figura 3). Este resultado sugiere que la colonización de la raíz por *Trichoderma* promueve un incremento en la generación de sRNAs de diferente tamaño, siendo posiblemente los más abundantes los de 22 nt en las hojas y los de 18-21 nt en la raíz.

T. atroviride* induce diferencialmente la expresión de los genes *AGO1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 a nivel local y sistémico en *Arabidopsis

Para ahondar en el posible papel de la maquinaria de silenciamiento mediado por sRNAs en la supresión de la inmunidad de la planta, se midió la expresión de los 10 parálogos de *AGO* que posee *Arabidopsis*, en las hojas y las raíces, durante su interacción con *T. atroviride*. La expresión de los genes *AGO1-10* presentaron una cinética similar a la que se observó en las hojas de los genes *LOX-2*, *PR-1a* y *DCL* (Figuras 1, 2 y 3). Los genes *AGO1*, 2, 4, 5, 6, y 7 presentaron la mayor inducción en las hojas a las 72 h de su interacción con el hongo (Figura 4), donde *AGO7* presentó los niveles más (7.5 veces) comparada con el resto de los parálogos (Figura 4). Los genes *AGO2* y 6 alcanzaron niveles de 5 veces a las 72 h respecto al control sin inocular, mientras que los niveles de expresión de *AGO1*, 4 y 5 alcanzaron niveles de 4. En las raíces, *AGO3* se indujo 350 veces, *AGO8* 80, *AGO5* 12, *AGO9* 10, y *AGO2* 8 veces a las 72 hpi con respecto a su control sin inocular (Figura 5). Estos resultados, sugieren que el producto del gen *AGO3* de *Arabidopsis* podría estar participando en el establecimiento de la relación simbiótica.

La mutante *ago4-2* está afectada en la inducción de los genes *PR-1a* y *LOX-2* por *T. atroviride*

En *A. thaliana* *AGO4* es uno de los componentes de la vía del silenciamiento génico transcripcional asociado con sRNAs que actúan en el proceso de RdDM. Para conocer más a fondo el papel que puede jugar la proteína AGO4 en la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*, decidimos medir la expresión de los genes *PR-1a* y *LOX-2* en la línea mutante *ago4-2* de *Arabidopsis* y en su parental Col-0 en co-cultivo con *T. atroviride*. La expresión de *PR-1a* en la línea *ago4-2* fue considerablemente menor en todos los tiempos, comparada con la Col-0 (Figura 4). De igual forma, el nivel de expresión de *LOX-2* fue considerablemente mayor en la línea Col-0, comparado con la línea *ago4-2*, sin embargo, la disminución de éste marcador no fue tan drástica parada con *PR-1a* (Figura 4). Este resultado, sugiere que la vía RdDM juega un papel importante en la inducción de los genes marcadores de la SAR y la ISR por *Trichoderma* en *Arabidopsis*, contribuyendo principalmente en la vía regulada por el SA.

La ausencia de *AGO4* no afectó el efecto protector que confiere *T. atroviride* a *Arabidopsis* contra *B. cinerea* y pero si a *Pst* DC3000

Con base en los resultados anteriores y para corroborar que la línea *ago4-2* de *Arabidopsis* está afectada en la ISR y la SAR, se realizó un ensayo de protección por *Trichoderma* en *Arabidopsis* contra *B. cinerea* y *P. syringae* pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000). Las plántulas de *A. thaliana* Col-0 y *ago4-2* fueron crecidas en macetas por 3 semanas, e inoculadas en la raíz con *T. atroviride* y a los 21 dpi, 3 hojas de cada planta fueron inoculadas con los patógenos y 8 días después, se analizó el daño provocado por los patógenos. La línea *ago4-2* sin inocular con *T. atroviride* fue más susceptible a *Pst* DC3000 comparada con la Col-0, como se ha reportado (Agorio & Vera, 2007). De manera interesante, la mutante *ago4-2* sin inocular con *T. atroviride* resultó ser más resistente a *B. cinérea* que la línea parental Col-0 (Figura 8). Por otro lado, las hojas de las plantas Col-0 inoculadas con *T. atroviride* fueron más resistentes a *Pst* DC3000 y *B. cinerea* comparadas

con la Col-0 sin inocular con *Trichoderma* (Figuras 7 y 8). Las plantas *ago4-2* que fueron inoculadas con *T. atroviride*, presentaron un menor daño, comparadas con el grupo de plantas *ago4-2* que no fueron tratadas con *T. atroviride* (Figuras 7 y 8). Pese a las diferencias entre el daño causado por *Pst* DC3000 y *B. cinerea* en las líneas Col-0 y *ago4-2*, *T. atroviride* fue capaz de generar un efecto protector en ambas líneas, sin embargo, la línea *ago4-2* inoculada con *Pst* DC3000 presentó más daño, comparada con la Col-0 en las mismas condiciones.

Discusión

En el presente trabajo, confirmamos que *T. atroviride* es capaz de inducir de manera sistémica y simultánea las vías de señalización SAR e ISR (Salas-Marina et al., 2011), sin embargo, a diferencia de la publicación previa, observamos que la inducción de la SAR e ISR fue transitoria, ya que se incluyeron más tiempos en el análisis, además de que se inocularon las raíces de manera directa con el hongo, y en el trabajo previo se inocularon a 5 cm de la raíz. Es importante hacer notar, que los genes marcadores de la ISR presentaron niveles considerablemente más bajos, comparados con la expresión de los genes marcadores de la SAR, lo que podría favorecer la relación simbiótica. Se sabe que el SA y el JA/ET son mutuamente antagónicos (Spoel et al., 2003), y con los datos de expresión obtenidos, es posible que las concentraciones de SA sean más elevadas comparadas con el JA/ET, lo cual explica la baja expresión de los marcadores de la ISR. Este resultado indica, que *T. atroviride* podría ser más susceptible a la ISR que a la SAR, motivo por el cual, tiende a inducir altos niveles del marcador de la vía del SA versus la del JA/ET para establecer la relación simbiótica. Estos resultados muestran un comportamiento similar al de organismos patógenos como *Agrobacterium* y *Xanthomonas*, donde estos inducen de manera transitoria la expresión de *PR-1a* y terminan suprimiendo la resistencia sistémica para establecer una relación patogénica (Erbs et al., 2008). Por otro lado, el hongo ectomicorrizico, *Laccaria bicolor*, promueve el mutualismo con plantas de *Populus* bloqueando la acción del JA a través de MiSSP7 (proteína 7 pequeña secretada inductora de micorriza, de sus siglas en inglés), un efector que estabiliza a PtJAZ6, un regulador negativo de genes que se inducen por JA (Plett et al., 2014). También, se ha reportado que *Trichoderma koningi* suprime la producción de compuestos fenólicos antimicrobianos en *Lotus japonicus*, lo cual asemeja más a la respuesta de las relaciones de las micorrizas con plantas, que una relación patogénica (Masunaka et al., 2011).

En las plantas, la detección de los microorganismos patógenos y los benéficos, las llevan a activar múltiples niveles de su inmunidad innata. Estas respuestas, están mediadas por la activación y la represión de un amplio número de genes, y los sRNAs del huésped y las plantas juegan un papel fundamental en la inmunidad de la misma (Jin, 2008). Aquí mostramos la inducción sistémica de las DCLs de *A. thaliana* por *T. atroviride*, lo que

indica que probablemente durante esta interacción, se está dando la generación de sRNAs que podrían estar implicados en el silenciamiento de genes de la planta relacionados con su inmunidad o incluso genes del hongo. En éste sentido, el miR393 de *Arabidopsis* es inducido por el PAMP flg22, una fragmento de la flagelina bacteriana que regula negativamente la vía de las auxinas, para hacer blanco en el mensajero del receptor de auxinas, TIR1 para su degradación (Padmanabhan et al., 2009). Las auxinas son un grupo de hormonas de la planta que pueden suprimir la SAR y promover el crecimiento de los patógenos biotróficos (Wang et al., 2007). Por otro lado, los resultados de inducción de los parálogos de las *DCLs* nos sugieren que las proteínas DCL podrían tener un papel diferencial de manera local en la zona de interacción y en la parte aérea, de forma similar a lo observado por Andika y colaboradores (2015), donde las proteínas DCLs presentaron diferente contribución en las raíces y hojas para la defensa contra el virus X de la papa (Andika et al., 2015). En éste trabajo, la expresión de los parálogos *DCL* en la raíz se dio a tiempos más tempranos. En el caso particular de *DCL1* su expresión alcanzó niveles de 8, lo cual nos sugiere que se podrían estar generando siRNAs de 18-21 nt de largo implicados en la interacción benéfica. En éste sentido, el miR171h que es generado por DCL1, regula la colonización de *Medicago truncatula* por el hongo micorrizico *Rhizophagus irregularis* (Lauressergues et al., 2012). Por otro lado, los sRNAs Bc-siR3.2, Bc-siR3.1 y Bc-siR5 del patógeno ascomiceto *B. cinerea* se encargan de silenciar a los genes MPK1/2 (proteína cinasa activada por mitógenos 1 y 2) y WAK (cinasa asociada a la pared celular que participan en la inmunidad de *Arabidopsis* y tomate (Weiberg et al., 2013). Tomando en consideración estos resultados, podemos especular que *T. atroviride* utiliza un mecanismo similar para silenciar a los genes de defensa de la planta para establecer una relación benéfica.

De manera interesante y aun no reportado para organismos benéficos, *T. atroviride* indujo de forma diferencial, a nivel local y sistémico la expresión de los genes *AGO1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9* y *10* en *Arabidopsis*, con una cinética similar a la que presentaron los genes *PR-1a* y *LOX-2*. Estos datos soportan nuestra hipótesis de que el hongo podría estar utilizando la maquinaria del silenciamiento de las plantas para suprimir la inmunidad para establecer una relación benéfica. También, el aumento en la expresión de los transcritos de los genes *AGO3, 5, 8* y *9* en las raíces sugiere que sus productos podrían estar implicadas

directamente en la interacción de *A. thaliana* con *T. atroviride*. Nuestros datos también sugieren que existen distintos niveles de regulación en la expresión de genes durante la interacción con *T. atroviride*, ya que, en nuestros resultados, observamos que *AGO4*, y *6* se expresan preferencialmente en hojas y *AGO9* en raíces. Estas AGO son las responsables del silenciamiento transcripcional a través de la metilación directa del ADN, lo cual sugiere que éste mecanismo podría ser otro nivel de silenciamiento génico del sistema inmune de la planta utilizado por *Trichoderma*. Por otra parte *AGO1*, *2*, *3*, *5*, *7* y *8* están implicadas en el silenciamiento postranscripcional de genes cortando al mensajero o inhibiendo la traducción del mismo. Aunque aún no sabemos qué papel juegan estos componentes en esta interacción, también se ha reportado que el gen *AGO2* de *Arabidopsis*, es altamente inducida por *Pst* DC3000, y se le ha relacionado con el miR393* que regula la inmunidad de la planta, al suprimir al gen MEMB12 que codifica a una proteína SNARE localizada en las membranas del aparato de Golgi y controla una parte de la ruta secretora (transporte retrogrado), provocando un cambio en la vía de secreción, que favorece la exocitosis de proteínas antimicrobianas relacionadas a la patogenicidad (Zhang et al., 2011). Por otro lado, la proteína AGO7 está implicada en la acción del lsiRNA AtlsiRNA-1 que hace blanco sobre el gen AtRAP, que codifica para una proteína de unión a RNA que contiene un dominio putativo RAP (acrónimo de dominio de unión a RNA abundante en Apicomplexans) la cual es un regulador negativo de la ETI (Xu et al., 2006).

Los resultados obtenidos de la línea *ago4-2* confirman que es más susceptible a *Pst* DC3000 que la línea parental (Agorio & Vera, 2007). Sin embargo en el presente trabajo observamos que la mutante *ago4-2* es más resistente a *B. cinérea*, lo cual, hasta donde sabemos no ha sido reportado. Estos datos nos sugieren que AGO4 juega un papel positivo en la inducción de la SAR e ISR por *T. atroviride*, y que a pesar del decremento en los niveles del transcrito de *PR-1a* y *LOX-2* en la mutante *ago4-2* con respecto a la Col-0, el hongo es capaz de inducir un efecto protector y disminuir el daño causado por los patógenos *Pst* DC3000 y *B cinerea*. La protección de las plantas Col-0 fue más eficiente contra *Pst* DC3000 comparada con la línea *ago4-2*, y esto correlaciona con la inducción del gene *PR-1a*, el cual se vio más afectado en la línea mutante. Para *B. cinerea*, el efecto protector fue más eficiente en la línea *ago4-2* y esto correlaciona con la inducción de *LOX-2* en la línea *ago4-2*, el cual no se vio menos afectado que *PR-1a*. En conjunto estos

resultados nos indican, que a pesar de los bajos niveles de inducción de los genes marcadores de la SAR y la ISR, son suficientes para inducir el proceso de “priming”, lo que conlleva una respuesta efectiva de la planta inoculada con *T. atroviride*, contra los patógenos.

En resumen, nuestro trabajo sugiere que existe un papel muy importante de la maquinaria de silenciamiento mediado por sRNAs en la interacción *T. atroviride*-*A. thaliana*, la cual puede implicar la generación de sRNAs y su probable acción en los genes de defensa de la planta para establecer una relación benéfica.

Métodos

Material biológico y condiciones de crecimiento

En el presente trabajo se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y a la línea mutante *ago4-2*, la cual presenta una mutación dominante negativa que causa la sustitución del ácido glutámico de la posición 641 localizada dentro del dominio PIWI por una lisina, causando una pérdida de función (Agorio & Vera, 2007). La cepa fúngica utilizada durante éste trabajo fue *Trichoderma atroviride* IMI 206040. Para esterilizar a las semillas de *Arabidopsis*, se trataron con etanol al 75% por 3 min, y posteriormente con hipoclorito de sodio al 10% durante 6 min, para finalmente enjuagarlas 4 veces con agua destilada estéril. La sincronización de las semillas se llevó a cabo en cajas de Petri con medio MS 1X (PhytoTechnology Laboratories®) (Murashige & Skoog, 1962) enriquecido con vitaminas e incubándolas 2 días a 4°C, para posteriormente incubarlas en una cámara de crecimiento, con un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, a una temperatura de 22°C por 24 horas. Ulteriormente, 18 plantas fueron transferidas a cajas de Petri con medio MS 1X y se incubaron por 10 días bajo las condiciones descritas anteriormente. Las plantas fueron inoculadas en la raíz con un disco de micelio de *T. atroviride* IMI 206040 creciendo activamente, el cual fue crecido previamente en el medio papa dextrosa agar (PDA, DIFCO™) a 28°C durante 3 días. En paralelo, se crecieron plantas sin inocular con el hongo, para ser utilizadas como control de la interacción. A las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación con *T. atroviride* las raíces y hojas se separaron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, se molió, y se almacenó a -80°C hasta la extracción del RNA. *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000 (*Pst* DC3000; Cuppels, 1986) fue crecida en medio King's B (King et al., 1954) por 48 h a 28°C a 200 rpm y la suspensión se ajustó a una Densidad Óptica (DO) = 0.2. *Botrytis cinerea* se creció por 14 días en PDA a 28°C. Las conidias se colectaron y fueron contadas al microscopio en una cámara de Neubauer y la suspensión se ajustó a 1×10^6 coindias ml^{-1} en buffer de fosfatos y sacarosa 1%.

Análisis de la expresión

El RNA total de *A. thaliana* se extrajo utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calidad de RNA se revisó por medio de la observación directa de un gel de agarosa al 1.5% de electroforesis desnaturalizante. El DNA contaminante de las muestras de RNA total fue eliminado con la enzima TURBO DNase (Life Technologies), como se describe en el manual del vendedor. La transcripción reversa se llevó a cabo con la enzima SuperScript II (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante. El cDNA (DNA complementario) fue cuantificado en el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek®) a las OD de 260 y 280 nm (nanómetros). Los oligonucleótidos (Tabla 1) se diseñaron empleando el software Primer 3 (Applied Biosystems) y se sintetizaron por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies). La reacción de qRT-PCR se realizó con 200 ng de cDNA empleando el kit Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystem). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo Abiprism 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 20s a 95°C, 40 ciclos de amplificación (3s a 95°C, 30s a 60°) y una “Melt Curve” (15s a 95°C, 1 min 60°C). El gen *Act2* de *A. thaliana* fue utilizado como gen de referencias para la normalización de los genes, utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Ensayo de protección en Arabidopsis inducido por *T. Atroviride* contra hongos y bacterias fitopatógenas

La suspensión de los patógenos *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000 y *Botrytis cinérea* se prepararon bajo las condiciones antes descritas. Para ambos organismos se agregó Break-Thru (Goldsmidt Chemical Corporation) como agente surfactante a una concentración final de 0.1%. *T. atroviride* fue crecido en PDA por 7-10 días y las conidias fueron colectadas y contadas al microscopio en una cámara de Neubauer y la suspensión se ajustó a 1×10^6 conidias ml^{-1} . Las semillas de *Arabidopsis* Col-0 y *ago4-2* se crecieron en medio MS 1×, y 4 días después de haber germinado, las plántulas se trasplantaron a macetas con sustrato “peat moss” (LAMBERT™), y fueron inoculadas en la raíz con 20 μl de 1×10^6 esporas por ml^{-1} de *T. atroviride*. Las plantas se regaron con MS líquido (0.3×) un

día post-inoculación (dpi) para permitir al hongo colonizar la rizósfera. Veintiún dpi con *T. atroviride*, las plantas de *A. thaliana* Col-0 y *ago4-2* fueron inoculadas con *B. cinerea* y *P. syringae*. Tres hojas de cada planta se inoculó con 10 µl de suspensión de patógenos en la zona adaxial. En paralelo se inoculó a los controles, sin *T. atroviride*. Las plantas inoculadas se dejaron bajo condiciones controladas y fueron regadas con agua cada 2 días. El daño provocado por los patógenos fue registrado y fotografiado a los ocho dpi.

Contribución de los autores

Oscar Guillermo Rebolledo-Prudencio realizó y diseñó los experimentos, escribió el artículo y analizó los resultados. Sergio Casas-Flores diseñó los experimentos y escribió el artículo.

Agradecimientos: El presente trabajo fue apoyado por los proyectos SEP-2010-103733 y FORDECYT-2012-02-193512 otorgados a Sergio Casas y a Ramón Guevara respectivamente. Oscar Guillermo Rebolledo Prudencio recibió una beca del CONACYT con número de expediente 298745.

Bibliografía

- Agorio, A., & Vera, P. (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(November), pp.3778–3790.
- Andika, I. B., Maruyama, K., Sun, L., Kondo, H., Tamada, T., & Suzuki, N. (2015). Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against potato virus X in leaves and roots. *The Plant Journal*, 81(5), pp.781–793.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants, 431(3), pp.56–63.
- 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), pp.779–789.
- Castel, S. E., & Martienssen, R. a. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 14(2), pp.100–12.
- Chang, S.-S., Zhang, Z., & Liu, Y. (2012). RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Review of Microbiology*, 66, pp.305–23.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), pp.803–14.
- Collinge, J., Whittington, M. a, Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, a R., & Jefferys, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*. 370 (7). pp.295-297
- Cuppels, D. M. (1986). Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Applied Environmental Microbiology*, 51(2), pp.323–327.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Cooper, R. M. (2008). Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry and Biology*, 15(5), pp.438–448.
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E. R., Simon, S. a., Matzke, M. (2011). AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 6(10), pp.1–8.

- Glick, B., Penrose, D., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), pp.63–8.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1997). Plant Disease Resistance Genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), pp.575–607.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 1), pp.17–25.
- Jakob, K., Kniskern, J. M., & Bergelson, J. (2007). The role of pectate lyase and the jasmonic acid defense response in *Pseudomonas viridiflava* virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 20(2), pp.146–158.
- Jin, H. (2008). Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS Letters*, 582(18), pp.2679–84.
- Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 48, pp.225–46.
- King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, pp.301–307.
- Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., & Druzhinina, I. S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(10), pp.753–763.
- Lauressergues, D., Delaux, P. M., Formey, D., Lelandais-Brière, C., Fort, S., Cottaz, S., Combier, J. P. (2012). The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *Plant Journal*, 72(3), pp. 512–522.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–408.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2011). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes and Environments / JSME*, 26(2), pp.128–134.
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R. E., Gutiérrez, S., Lorito, M., & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 22(8), pp.1021–1031.

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473–497.
- Nomura K., Melotto M., He SY. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, pp.361-368.
- Padmanabhan, C., Zhang, X., & Jin, H. (2009). Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), pp.465–72.
- Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S. E., Ray, A., California, A. R. (2003). Evidence for Nuclear Processing of Plant Micro RNA and Short Interfering RNA Precursors. *Plant Physiology*, 132, pp.1382–1390.
- Pieterse, C. M. J., Keurentjes, B. W. M., Verhagen, M. K., Ientse Van der Sluis, P. A. H. M. B. and L., & L.C., V. (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *European Journal of Plant Pathology*, 107, pp.51–61.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Martin, F. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), pp.8299–304.
- Salas-Marina, M. A., Isordia-Jasso, M. I., Islas-Osuna, M. A., & Delgado-Sánchez, P. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*, 6(February), pp.1–13.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), pp.15–26.
- Song, J. J., & Joshua-Tor, L. (2006). Argonaute and RNA--getting into the groove. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(1), pp.5–11.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. a, Mueller, M. J., Pieterse, C. M. J. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), pp.760–770.
- Stepanova, A. N., Yun, J., Likhacheva, A. V, & Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 19(7), pp.2169–2185.

- 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), pp.249–258.
- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A. H., & Dong, X. (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology : CB*, 17(20), pp.1784–90.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6154), pp.118–23.
- Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., & Chua, N.-H. (2006). *Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell*, 18(12), pp.3386–98.
- Yang, L., & Huang, H. (2014). Roles of small RNAs in plant disease resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(10), pp.962–970.
- Zhang, X., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.-C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.-D., Jin, H. (2011). *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393*-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular Cell*, 42(3), pp.356–66.

Pies de las Figuras

Figura 1. *T. atroviride* induce de manera sistémica y transitoria los genes marcadores de la SAR y la ISR en *A. thaliana*. Plantas de 11 días de edad fueron inoculadas con *T. atroviride* en las puntas de las raíces. En el panel (a) se muestra el sistema *in vitro* de interacción de *A. thaliana* con *T. atroviride* a las 24, 48, 72 y 96 hpi así como sus respectivos controles. La parte aérea de la planta se colectó a las 24, 48, 72, y 96 horas post inoculación (hpi) y se extrajo el RNA total. La expresión de los genes se midió por qRT-PCR. En el panel (b), se muestra los niveles de expresión de los transcritos de *PR-1a* (barras grises) y en el panel (c) *LOX-2* (barras grises) a diferentes tiempos de interacción con *T. atroviride*. Las barras negras representan la expresión de estos genes en la condición control. Los niveles de transcripción relativa se calcularon utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). *Actina 2* se usó como control interno. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 2. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *DCLI-4* de manera sistémica y transitoria en *A. Thaliana*. Plantas de 11 días de edad fueron inoculadas con *T. atroviride* en las puntas de las raíces y la parte aérea fue colectada a las 24, 48, 72, y 96 hpi y se extrajo el RNA total de dichas hojas. Los niveles de transcripción relativa de los genes *DCLI1* (barras rojas), *DCL2* (barras verdes), *DCL3* (barras amarillas) y *DCL4* (barras azules) fueron medidos por qRT-PCR y se calcularon utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). En barras negras se muestra la expresión de los genes en la condición control. El gen *Act2* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes *DCL*. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 3. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *DCLI-4* de manera sostenida en las raíces de *A. thaliana*. Plantas de 11 días de edad fueron inoculadas con *T. atroviride* en las puntas de las raíces. Las muestras de raíces fueron colectadas a las 24, 48, 72, y 96 hpi y se extrajo el RNA total. Los niveles de transcripción relativa de los genes *DCLI1* (barras rojas), *DCL2* (barras verdes), *DCL3* (barras amarillas) y *DCL4* (barras azules) fueron

medidos por qRT-PCR y se calcularon utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) a los diferentes tiempos de interacción. En barras negras se muestra la expresión de los genes en la condición control. El gen *Act2* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes *DCL*. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 4. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *AGO1-10* de manera sistémica y transitoria en *A. thaliana*. La gráfica muestra el análisis de expresión de los genes *AGO1* (barras rosa), *AGO2* (barras rojo granate), *AGO3* (barras rojas), *AGO4* (barras cian), *AGO5* (barras grises), *AGO6* (barras verde olivo), *AGO7* (barras marrón), *AGO8* (barras verdes), *AGO9* (barras amarillas) y *AGO10* (barras azules) de *A. thaliana* en hojas en respuesta a la interacción con *T. atroviride*. El RNA total de las hojas de plantas de 11 días de edad inoculadas con *Trichoderma* fueron colectadas a las 24, 48, 72, y 96 hpi. Los niveles de expresión relativa fueron medidos por qRT-PCR empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). El gen *Act2* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes *AGO*. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 5. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *AGO1-10* de manera transitoria en raíces de *A. thaliana*. La gráfica muestra el análisis de expresión de los genes *AGO1* (barras rosa), *AGO2* (barras rojo granate), *AGO3* (barras rojas), *AGO4* (barras cian), *AGO5* (barras grises), *AGO6* (barras verde olivo), *AGO7* (barras marrón), *AGO8* (barras verdes), *AGO9* (barras amarillas) y *AGO10* (barras azules) de *A. thaliana* en raíces en respuesta a la interacción con *T. atroviride*. El RNA total de las raíces de las plantas de 11 días de edad inoculadas con *Trichoderma* fueron colectadas a las 24, 48, 72, y 96 hpi. Los niveles de expresión relativa fueron medidos por qRT-PCR empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen., 2001). El gen *Act2* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes *AGO*. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 6. La mutante *ago4-2* está afectada en la inducción de los genes *PR1a* y *LOX-2* en *Arabidopsis* por *T. atroviride* Plantas de 11 días de edad fueron inoculadas con *T.*

atroviride en las puntas de las raíces. Las muestras de hojas fueron colectadas a las 24, 48, 72, y 96 hpi y el RNA total de hojas fue colectadas a las 24, 48, 72, y 96 hpi. En esta figura se graficó los niveles de expresión de los transcritos de *PR-1a* (izquierda) y *LOX-2* (derecha) de *A. thaliana* Col-0 (barra azul) y *ago4-2* (barra gris) en co-cultivo con *T. atroviride*. Las barras negras representan la expresión de estos genes en la condición control. Los niveles de transcripción relativa fueron medidos por qRT-PCR empleando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen., 2001). El gen *Act2* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes evaluados. La desviación estándar se calculó a partir del triplicado técnico.

Figura 7. La ausencia de AGO4 afectó el efecto protector que confiere *T. atroviride* a *Arabidopsis* contra *Pst* DC3000. 21 días después de inocular a *A. thaliana* Col-0 (Col-0+Ta) y *ago4-2* con *T. atroviride* (*ago4-2*+Ta), 3 hojas de cada línea de *Arabidopsis* fueron inoculadas con 10 μ l de la suspensión del patógeno *P. syringae* (Col-0+Ta+Pst y *ago4-2*+Ta+Pst, respectivamente) y en paralelo a estas, se inocularon los grupos de *A. thaliana* Col-0 sin *Trichoderma* (Col-0) y *ago4-2* sin *Trichoderma* (*ago4-2*) con el patógeno *P. syringae* (Col-0+Pst y *ago4-2*+Pst, respectivamente). En el panel (a) se muestran las fotos de las hojas de *A. thaliana* Col-0 y en el panel (b) se muestran los grupos evaluados de la línea *ago4-2*. Dos hojas representativas de cada grupo fueron tomadas y registradas. Las flechas negras indican la zona de infección, y se aprecia el daño que causó el patógeno *Pst* DC3000.

Figura 8. La ausencia de AGO4 no afectó el efecto protector que confiere *T. atroviride* a *Arabidopsis* contra *B. cinerea*. 21 días después de inocular a *A. thaliana* Col-0 (Col-Ta) y *ago4-2* con *T. atroviride* (*ago*-Ta), 3 hojas de cada línea de *Arabidopsis* fueron inoculadas con 10 μ l de la suspensión del patógeno *B. cinérea* (Col-Ta-Bc y *ago*-Ta-Bc, respectivamente) y en paralelo a estas, se inocularon los grupos controles de *A. thaliana* Col-0 sin *Trichoderma* (Col-Ctl) y *ago4-2* sin *Trichoderma* (*ago*-Ctl) con el patógeno *B. cinérea* (Col-Ctl-Bc y *ago*-Ctl-Bc, respectivamente). En el panel (a) se muestran las fotos de las hojas de *A. thaliana* Col-0 y en el panel (b) se muestran los grupos evaluados de la

línea *ago4-2*. Dos hojas representativas de cada grupo fueron tomadas y registradas. Las flechas negras indican la zona de infección y se aprecia el daño que causó el patógeno *B. cinerea*.

Tablas

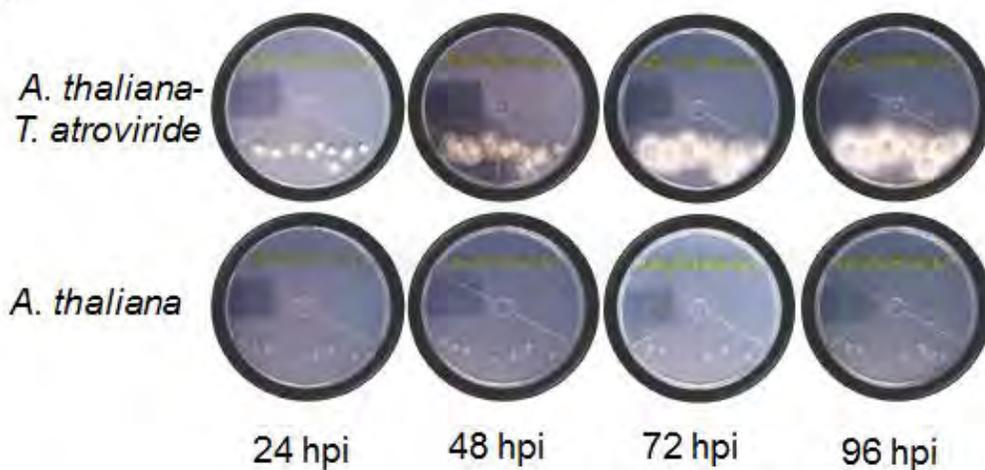
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el análisis de qRT-PCR

Gen / ID	Primer Forward 5-3'	Primer Reverse 5-3'
<i>AGO1</i> / NM_103737.3	AACCTACTGTTCTGGCTCAGCAA	TCACAATGCAACGCTTTCCA
<i>AGO2</i> / NM_102866.2	TGACAGGGAGATCGTCTTTCAA	TAACCCCGAAACGAAAATCTTC
<i>AGO3</i> / NM_102867.1	CCCGCCACAACACTAGCAAAGA	CGTGGTATCAACGACCGTACCT
<i>AGO4</i> / NM_001202684	TTCTGTGGTGCTTGAGGAAGTATC	TTGGCCGCATAGCTGATCTC
<i>AGO5</i> / NM_179779.2	ACCCCAAGAGTTCTGCAAACA	TGGAGACCAGGTGCCCTTT
<i>AGO6</i> / NM_128854.3	ATCTCTGCCACTGTCACCCATA	ACATCCGGCTGTCTCACAGAA
<i>AGO7</i> / NM_105611.4	TAGACCCGATGAGCCGGTTA	TGAGTCTGAGACCTCATTCTTGAGA
<i>AGO8</i> / NM_122111.2	CTCTACCGCCTCCTCAACACA	GACTGTTTGGTTTTCTGAAGTTGACT
<i>AGO9</i> / NM_122122.2	CGTGGCATCCGAAGTTTACA	GGGCGCAGAGATAGAAATCAA
<i>AGO10</i> / NM_123748.2	CAGCATTTGAGCACGTTTC	CCCGGTGATCCGTTGTCTT
<i>DCL1</i> / NM_099986.3	TGTTGAAGAAGCGGCACAAG	GCATCCCTAGCCCCATAAA
<i>DCL2</i> / NM_001202869.1	ACGGTGCTTCTCGCATTCTAC	CCAATGCATTTTGTACGACACA
<i>DCL3</i> / NM_001161190.2	TCTTCACCGCTTGACAACCA	CGGTTCAAAAAGCGCCATT
<i>DCL4</i> / NM_001203419.1	GAGATTTCTATTTTGCAGTCCATT	GAGCCCCAAACAGGATTCT
<i>ACT2</i> / NM_103814.3	GACTCAGATCATGTTTGAGACC	CATGTAACCTCTCTCGGTAAGG

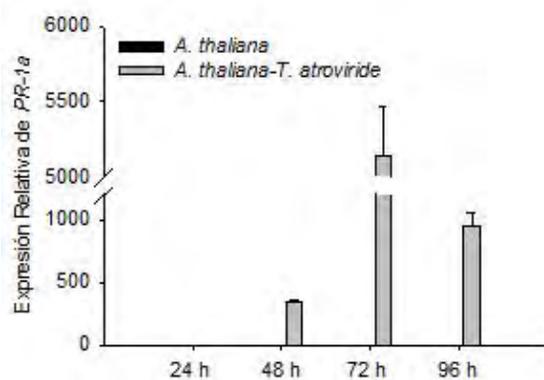
Figuras

Figura 1. *T. atroviride* induce de manera sistémica (hojas) y transitoria los genes marcadores de la SAR y la ISR en *A. thaliana*

a)



b)



c)

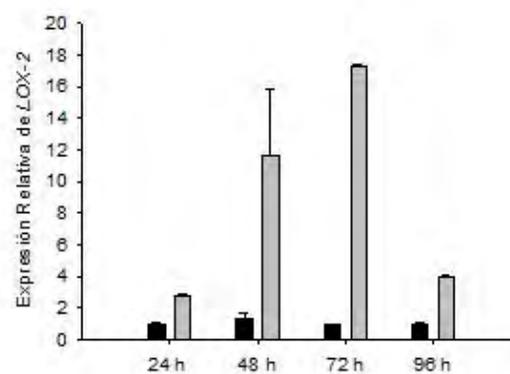


Figura 2. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *DCL1* al *-4* de manera sistémica (hojas) y transitoria en *A. thaliana*

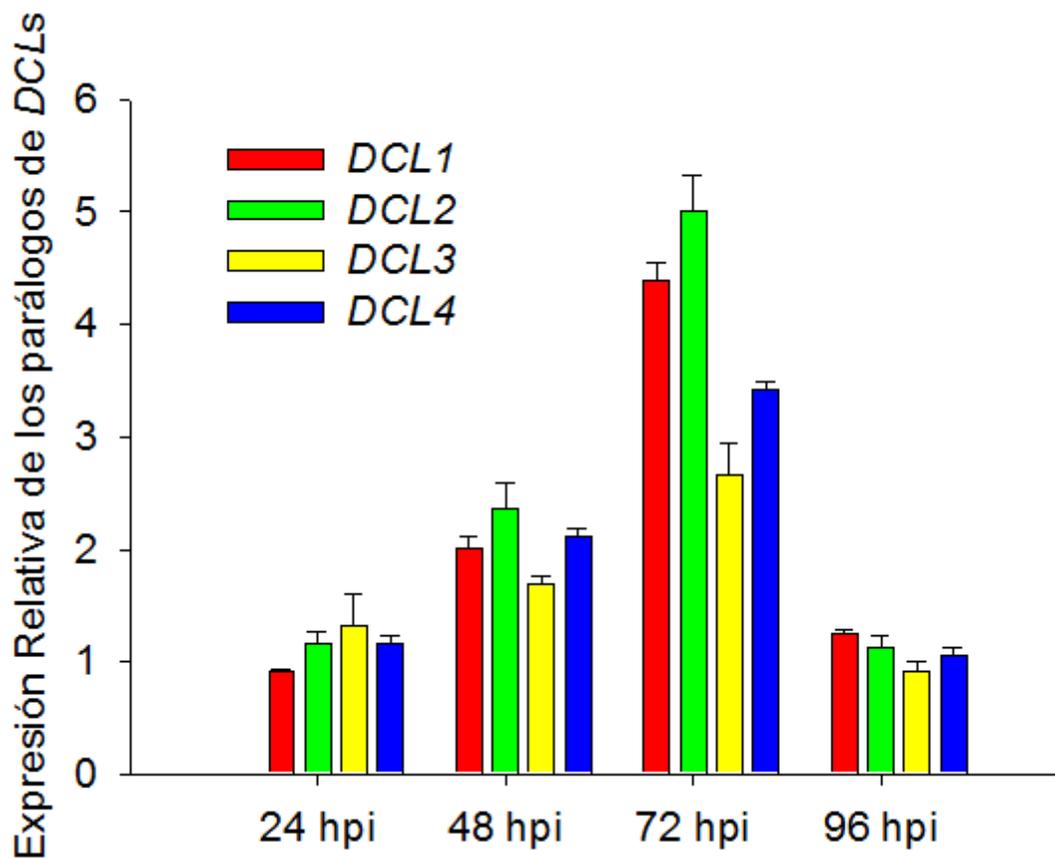


Figura 3. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *DCL1* al -4 de manera sostenida localmente (raíces) en *A. thaliana*

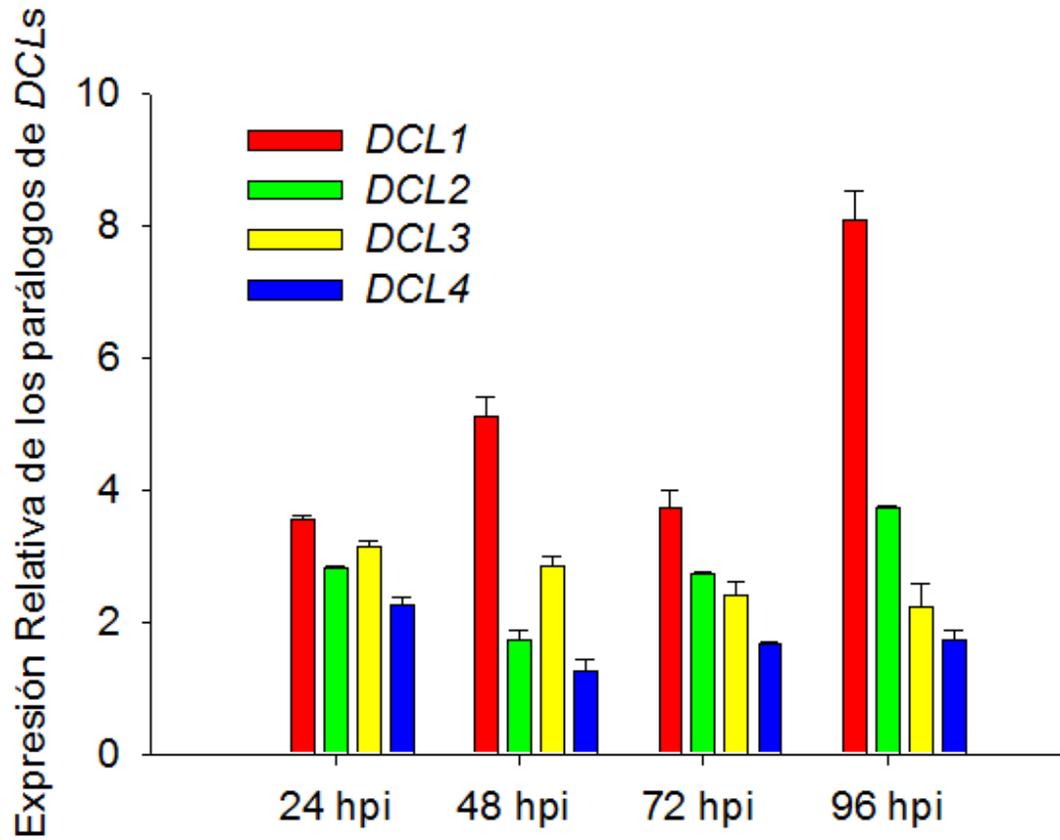


Figura 4. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *AGO1* al *-10* de manera sistémica (hojas) y transitoria en *A. thaliana*

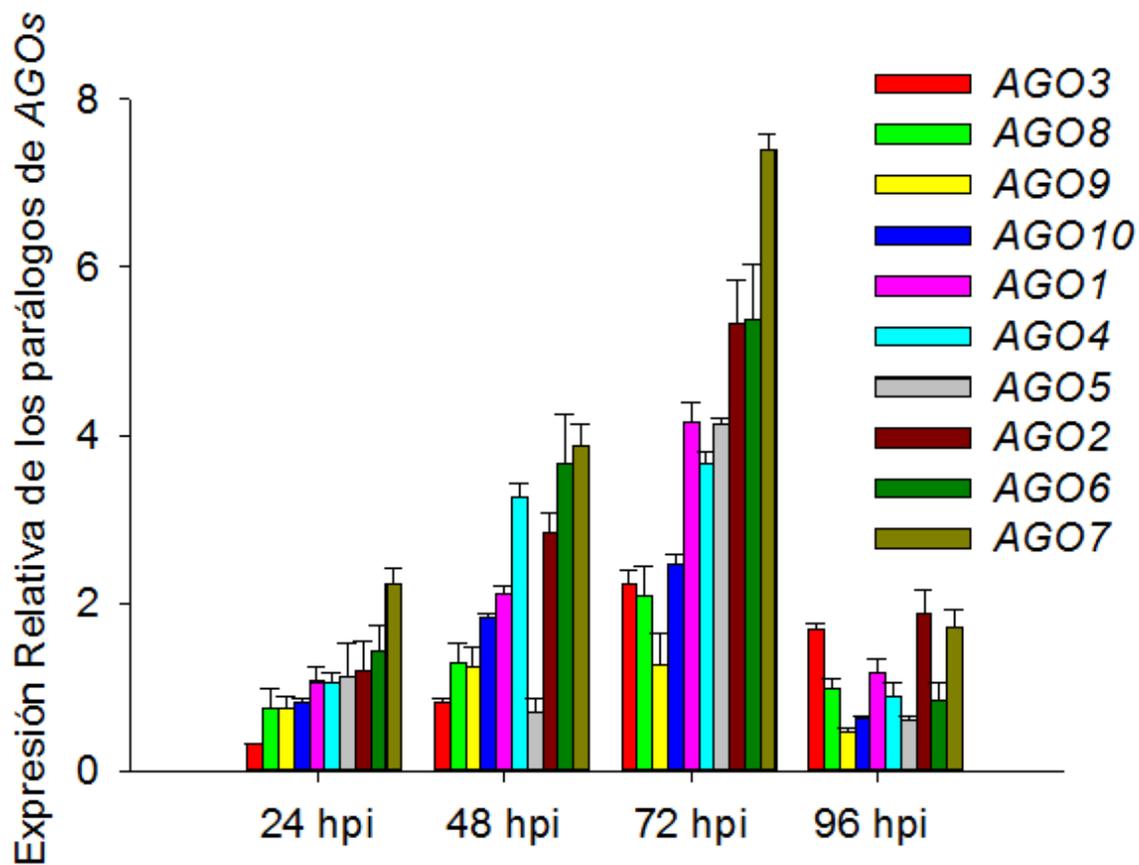


Figura 5. *T. atroviride* induce la expresión de los genes *AGO1 al -10* de manera transitoria localmente (raíces) en *A. thaliana*

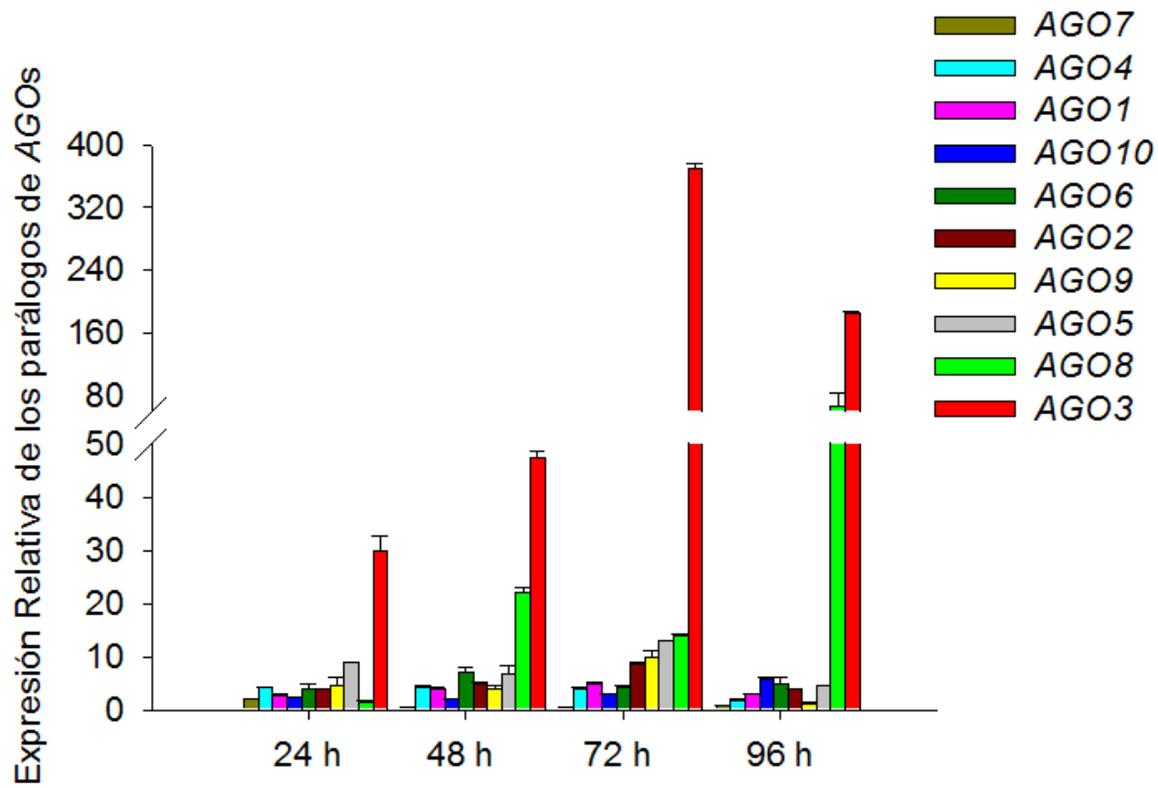


Figura 6. La mutante *ago4-2* de *Arabidopsis* está afectada en la inducción sistémica (hojas) de los genes *PR-1a* y *LOX-2* por *T. atroviride*

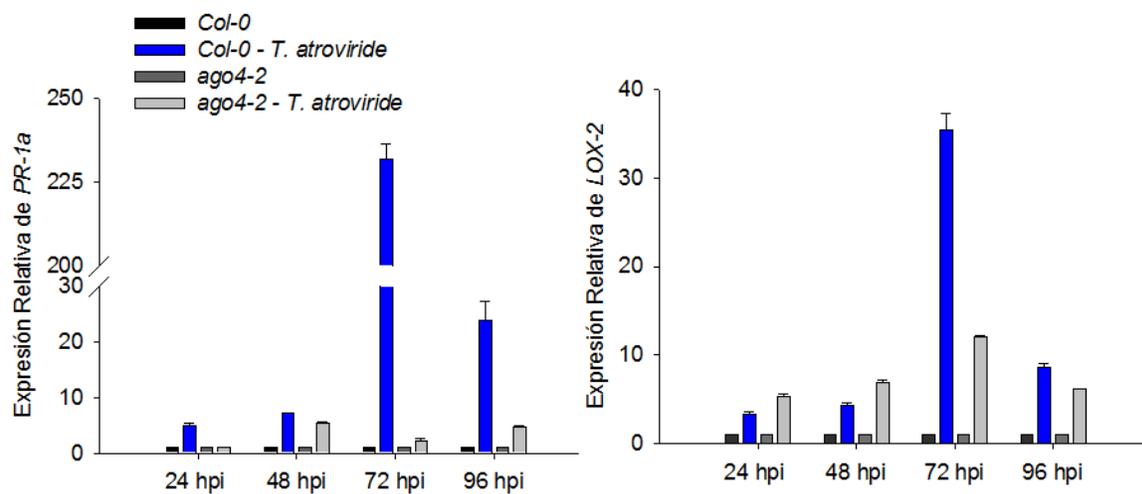
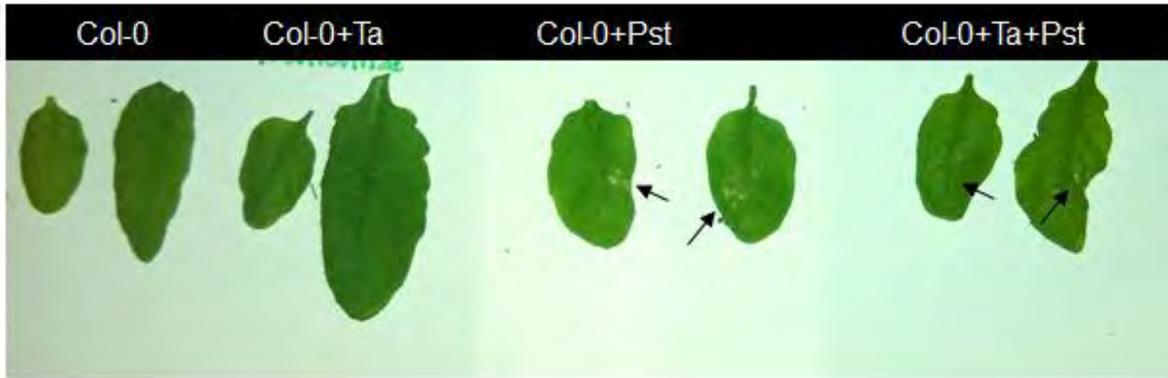


Figura 7. La ausencia de *AGO4* afectó el efecto protector que confiere *T. atroviride* a *Arabidopsis* contra *Pst* DC3000

a)



b)

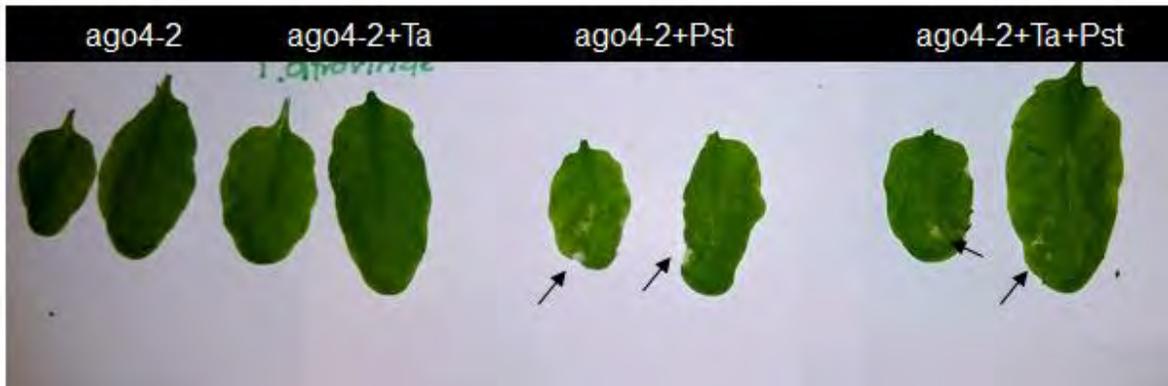
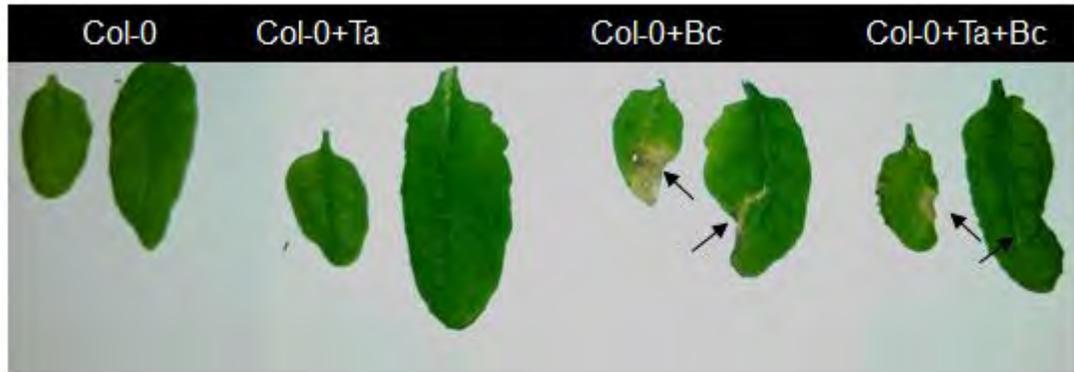


Figura 8. La ausencia de AGO4 no afectó el efecto protector que confiere *T. atroviride* a *Arabidopsis* contra *B. cinerea*

a)



b)

