



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

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“El ARN largo no codificante-1 y la proteína NSP4 de *Arabidopsis*
modulan la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento
mediado por el hongo mutualista *Trichoderma atroviride*”**

Tesis que presenta

Maria Montserrat Rosendo Vargas

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El ARN largo no codificante-1 y la proteína NSP4 de *Arabidopsis* modulan la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento mediado por el hongo mutualista *Trichoderma atroviride*”** presentada para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Maria Montserrat Rosendo Vargas** y aprobada el **19 de Julio de 2020** 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

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial

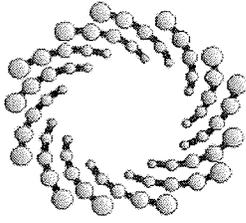
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial



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.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 932822). Este trabajo fue apoyado por el proyecto FC-2016-1538 otorgado a J. Sergio Casas-Flores.



IPICYT

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 206 del Libro Segundo 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 10 días del mes de julio del año 2020, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Presidenta

IPICYT

Dra. Fabiola Jaimes Miranda

Secretaria

IPICYT

Dr. J. Sergio Casas Flores

Sinodal

IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Maria Montserrat Rosendo Vargas

sobre la Tesis intitulada:

El ARN largo no codificante-1 y la proteína NSP4 de Arabidopsis modulan la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento mediado por el hongo mutualista Trichoderma atroviride

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. J. Sergio Casas Flores

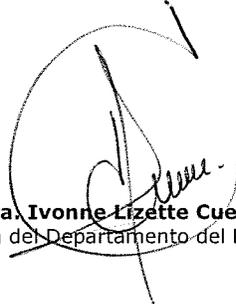
El Jurado, después de deliberar, determinó

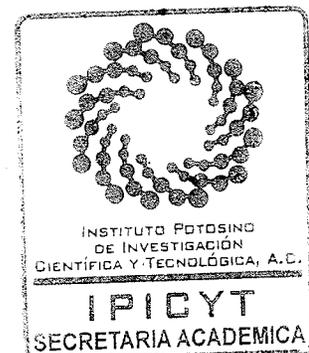
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 10 días del mes de julio de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mis padres Rebeca Vargas Sanabria y Porfirio Domingo Rosendo Francisco y a mis hermanos Diego, Paola y Pablo. Por el apoyo incondicional que me han brindado y por acompañarme en cada paso que doy, por siempre creer en mí y sobre todo por el gran amor que me han brindado.

A Francisco Flores Montiel por aparecer en mi vida cuando menos lo esperaba y por crecer a mi lado en esta hermosa etapa.

Agradecimientos

Al Dr. J. Sergio Casas Flores por compartir conmigo sus conocimientos, por guiarme, por apoyarme, por su paciencia y por sus consejos.

A la Dra. Fabiola Jaimes Miranda y la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por sus aportaciones para la mejora de este trabajo.

Al M. C Óscar Guillermo Rebolledo Prudencio por sus enseñanzas y paciencia durante la realización de los experimentos.

Al Dr. Nicolás Gómez Hernández por el apoyo técnico, por sus consejos y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Carmen, Saúl, Mitzuko y Judith por compartir su conocimiento y experiencias.

A mis compañeros de generación por su amistad y por hacer divertida esta etapa.

Al IPICYT por el apoyo académico durante mis estudios y al CONACYT por el apoyo económico.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta del examen.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras.....	x
Resumen	xi
Abstract.....	xii
Introducción.....	1
Mecanismos de defensa de las plantas	1
Clasificación de ARNs no codificantes	2
Clasificación de ARNs largos no codificantes y sus funciones dentro de las plantas	3
Descripción del hongo benéfico <i>Trichoderma</i>	5
Material y métodos	7
Material biológico y condiciones de crecimiento.....	7
Análisis de expresión génica y de acumulación de ARNp por RT-qPCR.....	7
Ensayo de promoción de crecimiento mediado por <i>T. atroviride</i>	8
Ensayo de reto con patógenos foliares en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Ensayo de colonización de las raíces de las líneas mutantes de <i>Arabidopsis</i> por <i>T. atroviride</i>	9
Resultados	10
Tres ARNp de 24 nt de <i>Arabidopsis</i> se acumulan durante la interacción de la planta con <i>Trichoderma</i>	11
<i>NSP4</i> y <i>At_ARNInc1</i> se regulan de manera dependiente de las vías del silenciamiento mediadas por ARNp en presencia de <i>Trichoderma</i>	14
<i>NSP4</i> y <i>At_ARNInc1</i> participan en la regulación negativa del crecimiento en <i>Arabidopsis</i>	18
La mutante <i>nsp4</i> es más sensible a <i>Pst</i> DC3000 y no responde al "priming" inducido por <i>Trichoderma</i> contra <i>B. cinerea</i> y <i>Pst</i> DC3000, mientras que la mutante <i>ARNInc1</i> no desencadena al "priming" en la presencia del hongo mutualista contra <i>B. cinerea</i>	20
Las mutantes <i>ARNInc1</i> y <i>nsp4</i> están afectadas en la expresión de genes de respuesta a SA y JA/ET	24
Las mutantes <i>nsp4</i> y <i>ARNInc1</i> son colonizadas en mayor medida por <i>Trichoderma</i> en comparación con Col-0.....	27
Discusión	28
Conclusiones.....	32
Referencias	33

Anexo 1 Cambio del casete de resistencia de pEarleyGate100, pEarleyGate101 y pEarleyGate104 por el método de mutagénesis Quick Change Site Directed Mutagenesis home edition..... **39**

Lista de tablas

Tabla 1. Alineamiento de los At_ARNp con sus blancos putativos	10
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la RT-qPCR Stem-Loop, RT-qPCR y genotipificación.....	11
Tabla 3. Oligonucleótidos usados para Quick Change	40

Lista de figuras

Fig. 1. Tres ARNp de 24nt. de <i>Arabidopsis</i> se acumulan en interacción con <i>Trichoderma atroviride</i>	13
Fig. 2. <i>NSP4</i> y <i>At_ARNlnc1</i> se regulan de manera dependiente de las vías del silenciamiento mediadas por ARNp en presencia de <i>Trichoderma</i>	15
Fig. 3. La acumulación de <i>At_ARNp</i> es inversa a la expresión de sus blancos en sus distintos fondos genéticos mutantes	17
Fig. 4. <i>NSP4</i> y <i>At_ARNlnc1</i> participan en la regulación negativa del crecimiento en <i>Arabidopsis</i>	19
Fig. 5. Las mutantes <i>nsp4</i> y <i>ARNlnc1</i> no responden al "priming" generado por <i>Trichoderma</i> contra <i>B. cinerea</i>	21
Fig. 6. La mutante <i>nsp4</i> no responde al "priming" generado por <i>Trichoderma</i> contra <i>Pst</i> DC3000	23
Fig. 7. La mutante <i>nsp4</i> está afectada en la inducción de los genes de respuesta a SA y JA/ET	25
Fig. 8. La mutante <i>ARNlnc1</i> está afectada en la inducción de los genes de respuesta a SA y JA/ET	26
Fig. 9. <i>Trichoderma</i> sobre coloniza a las raíces de las mutantes <i>nsp4</i> y <i>ARNlnc1</i> en comparación con la línea Col-0	27
Fig. 10. Cambio del casete de resistencia de pEarleyGate100, pEarleyGate101 y pEarleyGate104 por el método de mutagénesis Quick Change Site Directed Mutagenesis home edition	41
Fig. 11. Confirmación de la presencia de los plásmidos pEarleyGate100, 101 y 104 con el casete de resistencia de espectinomicina	42

Resumen

“El ARN largo no codificante-1 y la proteína NSP4 de *Arabidopsis* modulan la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento mediado por el hongo mutualista *Trichoderma atroviride*”

Las plantas han desarrollado varias líneas de defensa que les permiten suprimir los daños causados por los patógenos. En estas vías de señalización participan ARNs no codificantes mediante la metilación del ADN dirigido por ARN (RdDM). También cuentan con moléculas antimicrobianas derivadas de tioglucosidos que impiden el crecimiento de patógenos. Los mecanismos de defensa también son desencadenados por microbios benéficos como hongos promotores del crecimiento. En este trabajo se evaluó el papel del ARN largo no codificante-1 (*At_ARNlnc1*) y del producto del gen *NSP4* que codifica para la proteína especificadora de nitrilos 4 de la planta *Arabidopsis thaliana* en la estimulación del crecimiento y la inducción de la resistencia sistémica y el “priming” mediado por *Trichoderma atroviride*. Se predijeron uno y dos ARN pequeños de 24 nucleótidos como blancos putativos de *NPS4* y *At_ARNlnc1* respectivamente y se acumulan en interacción con *Trichoderma*. *NSP4* y *At_ARNlnc1* participan en la regulación negativa del crecimiento en *Arabidopsis*. Las mutantes de estos genes no respondieron al “priming” inducido por *Trichoderma* y se vieron afectadas en la expresión de genes de respuesta a las fitohormonas Ácido Salicílico y Jasmonato/Etileno.

Palabras clave: *Arabidopsis*; RdDM; NSP4; ARNs pequeños; ARN largo no codificante; *Trichoderma*.

Abstract

“*Arabidopsis* long non-coding RNA1 and NSP4 protein modulate systemic resistance and growth promotion mediated by the mutualistic fungus *Trichoderma atroviride*”

Plants have developed several lines of defense that allow them to suppress damage caused by pathogens. Non-coding RNAs participate in these signaling pathways through RNA-directed DNA Methylation (RdDM). Plants also have antimicrobial molecules derived from thioglucosides that prevent the growth of pathogens. Defense mechanisms are also triggered by beneficial microbes such as growth promoting fungi. In this paper we evaluated the role of the long non-coding RNA-1 (*At_IncRNA1*) and the product of the *NSP4* gene that codes for the nitrile-specifier protein-4 of *Arabidopsis thaliana* in growth, systemic resistance and priming mediated by *Trichoderma atroviride*. One and two 24 nucleotides small RNAs from *Arabidopsis* were predicted as putative targets for *NSP4* and *At_IncRNA1* respectively and accumulate during its interaction with *Trichoderma*. *NSP4* and *At_IncRNA1* participate as putative negative growth regulators in *Arabidopsis*. Mutants of these genes did not respond to *Trichoderma*-induced priming and were affected in the expression of genes related to Salicylic Acid and Jasmonic Acid /Ethylene.

Keywords: *Arabidopsis*; RdDM; NSP4; small RNAs; long non-coding RNAs; *Trichoderma*.

Introducción

Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas coexisten de manera muy estrecha con comunidades de microorganismos, es por eso que han desarrollado diversas líneas de defensa para suprimir a los patógenos que provocan las enfermedades y minimizar el daño. La primera línea de defensa ayuda a impedir la entrada de los patógenos a la célula vegetal y está compuesta por barreras físicas como los tricomas, una cutícula cerosa y la pared celular. Del mismo modo cuentan con una línea de defensa química compuesta por moléculas antimicrobianas. Las plantas pertenecientes al orden de las Brassicales presentan metabolitos secundarios denominados glucosinolatos que son compuestos hidrofílicos capaces de atravesar la membrana por difusión (Wittstock y Burow, 2010). Al ser hidrolizados los glucosinolatos por las enzimas β -glucosidasas, denominadas mirosinasas, y en presencia de proteínas especificadoras forman productos alternativos como epitionitros, nitrilos simples y tiocianatos, que se sabe están implicados en la defensa de las plantas contra patógenos e insectos (Kong, *et al.*, 2012). De manera natural los glucosinolatos y las mirosinasas se encuentran separados, sin embargo, cuando un patógeno entra a la célula o se rompe el tejido por la mordedura de un insecto, se mezclan y ocurre la reacción de hidrólisis para generar los compuestos antimicrobianos (Burow, *et al.*, 2009; Wittstock y Burow, 2010). AtNSP4 es una de las cinco proteínas especificadoras de nitrilos (AtNSP1-AtNSP5) homólogas a ESP (proteína epitioespecífica) de la planta *Arabidopsis thaliana* que promueve la generación de nitrilos simples (Wittstock y Burow, 2010).

Cuando un organismo patógeno traspasa las barreras antes mencionadas, la respuesta al ataque por el patógeno depende de un reconocimiento a nivel celular (Ramírez-Prado *et al.*, 2018). El reconocimiento de los patógenos a nivel celular comienza con la detección de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos y a Microbios (PAMPs y MAMPs, por sus siglas en inglés), por los Receptores

membranales de Reconocimiento de Patrones (PRRs), lo que dispara la Inmunidad Desencadenada por PAMPs (PTI, de sus siglas en inglés). A su vez, estos patrones inducen la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR, de sus siglas en inglés) (Pieterse, *et al.*, 2009; Ramírez-Prado *et al.*, 2018). La PTI involucra distintas características como el cierre de los estomas, la deposición de calosa, la biosíntesis de metabolitos y fitohormonas de defensa como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Ramírez-Prado *et al.*, 2018).

Existe una coevolución entre la defensa de las plantas y el ataque por los patógenos, ya que los patógenos han generado moléculas de distinta naturaleza que usan para modular la inmunología del hospedero denominadas efectores, que son transportadas al interior de las células de la planta para suprimir la PTI. Éste fenómeno es conocido como Susceptibilidad Desencadenada por Efectores (ETS, de sus siglas en inglés). Un efector es una molécula producida por organismos patógenos o benéficos que interfieren diferentes vías de señalización del hospedero en su propio beneficio (Conrath, 2011), ya sea para provocar la enfermedad o establecer una relación benéfica respectivamente. Las proteínas efectoras de los patógenos activan la Inmunidad Desencadenada por Efectores (ETI, de sus siglas en inglés), donde las plantas reconocen a los efectores con proteínas de resistencia (R) para combatir a los patógenos. Finalmente se genera un estado hipersensible (“priming”) de las plantas que permite a las células responder de manera más rápida y fuerte ante una segunda infección o estímulo (Conrath, 2011).

En estas vías de señalización participan moléculas de distinta naturaleza como proteínas, factores de transcripción, ARNs no-codificantes (ARNnc) y enzimas modificadoras de la cromatina (Ramírez-Prado *et al.*, 2018).

Clasificación de ARNs no codificantes

De acuerdo a su origen genómico y mecanismo de acción, los ARNnc se clasifican en: 1) ARNnc constitutivos, involucrados en actividades ribosomales y celulares compuesto por ARNs ribosomales (ARNr), ARNs de transferencia (ARNt, 50-200 pb), ARNs pequeños nucleares (ARNpn, 50-200 pb) y ARNs pequeños nucleolares (ARNpno, 50-200 pb), y 2) ARNnc reguladores de la expresión génica a nivel

epigenético, transcripcional y post-transcripcional, que incluyen micro ARNs (miARN, 20-24 pb), ARNs pequeños de interferencia (ARNpi, 20-24 pb) y ARNs largos no codificantes (ARNlnc >200 pb) (Nejat y Mantri, 2018). Los ARNs pequeños (ARNp) participan en diferentes funciones biológicas como el desarrollo, la floración y la inmunidad de las plantas, por degradación del ARN mensajero (ARNm), inhibiendo la traducción o mediante la metilación del ADN dirigido por ARN (RdDM, de sus siglas en inglés) y la posterior metilación de las histonas (Nejat y Mantri, 2018; Ramírez-Prado, *et al.*, 2018).

En la vía de la RdDM, un fragmento de ARN de cadena simple es sintetizado por la ARN Polimerasa IV (Pol IV), y posteriormente la ARN polimerasa-2 dependiente de RNA (RDR2) la amplifica a ARN de doble cadena, la cual será cortada por la ribonucleasa Dicer-3 (DCL3), para generar ARNp de 24 nucleótidos que serán cargados a la proteína Argonauta-4 (AGO4) ó AGO6; este complejo junto con la metiltransferasa *de novo* DRM2 se unirán al transcrito de la RNA Polimerasa V (Pol V), que le servirá como andamio para unirse al ADN e iniciar la metilación del ADN mediada por ARN (Ma, *et al.*, 2015; Matzke, *et al.*, 2015; Popova, *et al.*, 2013; Pumplin y Voinnet, 2013; Sánchez *et al.*, 2016). Esta vía metila las citosinas por medio de la Metiltransferasa-1 (MET1) en las regiones CG, por la Cromometiltransferasa-3 (CMT3) en los contextos CHG y por la Cromometiltransferasa-2 (CMT2) en los contextos CHH, donde H son adeninas, citosinas o timinas (Matzke, *et al.*, 2015; Popova, *et al.*, 2013). Hay ARNlnc que dependen de Pol V y sirven como andamios para que el complejo ARNp-AGO4 se unan al ADN (Kim y Sung, 2011; Liu, *et al.*, 2015; Wierzbicki, 2012).

Clasificación de ARNs largos no codificantes y sus funciones dentro de las plantas

Los ARNlnc son moléculas mayores a 200 nucleótidos sin una capacidad aparente para codificar proteínas, son transcritos por las ARN polimerasa II y III (poli A + y poli A-, respectivamente). Los ARNlnc también presentan modificaciones -5´ y -3´, y empalme de exones (Liu *et al.*, 2012; Ponting *et al.*, 2009; Quinn y Chang, 2016; Ramírez-Prado *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2013). Su localización es variada, de

manera predominante en el núcleo celular, sin embargo, algunos residen en el citosol y compartimentos subcelulares bien definidos (Nejat y Mantri, 2018).

Considerando su localización genómica, los ARNlnc se dividen en: 1) Transcritos Naturales Antisentido (TNAlnc) cuando se sobrelapan uno o más exones de otro transcrito en la misma o en cadena opuesta; 2) Bidireccionales (ARNlnc-BI), cuando la expresión del ARNlnc y un transcrito codificante vecino en la cadena opuesta se inicia de manera cercana; 3) Intrónicos (ARNlnc), cuando derivan de un intrón; 4) Intergénicos (ARNlnci), cuando derivan de una región entre genes, y 5) Sobrelapados (ARNlnc-SI) con exones de genes que codifican proteínas (Liu *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Nejat y Mantri, 2018; Ponting *et al.*, 2009). De acuerdo al papel que desempeñan, los ARNlnc se clasifican en: 1) ARNlnc no funcional, resultado del silenciamiento transcripcional; 2) ARNlnc donde el simple acto transcripcional es suficiente para su función, y 3) ARNlnc funcionales que actúan en *cis* y *trans* (Quinn y Chang, 2016).

De manera general, los ARNlnc son esenciales en la modulación de un amplio espectro de procesos biológicos como la regulación del procesamiento de mensajeros, durante el empalme de exones, la traducción, la activación de genes vecinos, la diferenciación y el desarrollo celular, la herencia, el silenciamiento génico, la regulación alostérica de la actividad enzimática, sirven como andamios, activadores y represores de promotores de genes que codifican proteínas, algunos en funciones citoplasmáticas como diferenciación tejido-específica (Kim y Sung, 2011; Ma *et al.*, 2013; Nejat y Mantri, 2018). A nivel epigenético influyen en la remodelación de la estructura de la cromatina, y la modificación de las histonas (Ramírez-Prado *et al.*, 2018). En las plantas, los ARNlnc actúan como blancos de miARN y están implicados en la regulación de la floración, la vernalización, la homeostasis de fosfato, los procesos reproductivos, la fotomorfogénesis, el control de auxinas y la inmunidad (Nejat y Mantri, 2018). Existen ARNlnc precursores de la biogénesis de los ARNpi y activan la transcripción de blancos no codificantes que ayudan a los ARNpi a reconocer sus blancos (Wilusz *et al.*, 2019).

Descripción del hongo benéfico *Trichoderma*

Los mecanismos de defensa de las plantas también son desencadenados por microbios benéficos como las rizobacterias, los hongos micorrízicos, y las bacterias y hongos promotores del crecimiento (Dautt-Castro, *et al.*, 2020; Ren, *et al.*, 2019). *Trichoderma* spp. es un grupo de hongos filamentosos, saprobios que predomina en ecosistemas terrestres y acuáticos, y contribuye en el control de hongos fitopatógenos, ya que posee propiedades micoparásitas que les permite proteger a las plantas contra patógenos de la raíz (Argumedo-Delira *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2006). Otro de los mecanismos de acción del biocontrol de este hongo es la competencia con otros microorganismos por nutrientes y espacio, que se ve favorecido por la plasticidad ecológica y metabólica del hongo, lo que le permite crecer en un amplio espectro de pHs, temperaturas y humedad de los distintos ambientes. Produce enzimas que degradan la pared celular (i.e., celulasas, quitinasas y glucanasas), y antibióticos como gliotoxina y viridina (Infante *et al.*, 2009). Algunos de estos hongos tienen la capacidad de promover el crecimiento en las plantas, ya que producen fitonormonas como las giberelinas y los índoles como las auxinas, que son moléculas que promueven la división y elongación de las células vegetales (Vinale *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2014). Después de que *Trichoderma* coloniza las raíces de las plantas, los genes asociados a las fitohormonas SA y JA/ET se disparan de manera simultánea, proporcionándole resistencia a las plantas contra patógenos con distinto estilo de vida (Salas-Marina *et al.*, 2011; Salas-Marina *et al.*, 2015). Este hongo produce una gran cantidad de MAMPs y elicitores entre los que se encuentran poligalacturonasas, xilanasas, cerato-plataninas, celulasas, swoleninas e hidrolasas que inducen la resistencia sistémica de las plantas (Olmedo-Monfil y Casas-Flores, 2014). *Trichoderma* es capaz de inducir el "priming", lo que le permite a las plantas responder de manera más fuerte y rápida a una segunda infección por patógenos (Estrada-Rivera, *et al.*, 2020) como *Botrytis cinerea* o *Pseudomonas syringae* (Salas-Marina, *et al.*, 2011; Salas-Marina, *et al.*, 2015).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el papel del RNA largo no codificante-1 (*At_ARNInc1*) y del producto del gen *NSP4* que codifica para la

proteína especificadora de nitrilos-4 de la planta *Arabidopsis thaliana* en la estimulación del crecimiento y la inducción de la resistencia sistémica y el “priming” mediado por *Trichoderma atroviride*. Para este fin se eligieron tres ARNp de 24 nt. de *Arabidopsis* de una colección de ARNp de trabajos previos durante la interacción *Arabidopsis-Trichoderma* (Estrada-Rivera et al., sin publicar). Putativamente uno de los ARNp hace blanco en el gen *NSP4* y dos en un ARNInc de *Arabidopsis*. Se midió la acumulación de los At_ARNp en el ecotipo silvestre Col-0 en interacción con *Trichoderma*. Posteriormente, se midió la expresión de los blancos y los At_ARNp en líneas mutantes en genes pertenecientes a la vía de la RdDM, ya que son los ARNp de 24 nucleótidos los que actúan en esta vía. Para evaluar el papel de *At_ARNInc1* y *NSP4* en la estimulación de crecimiento y la inducción de la resistencia sistémica mediada por *Trichoderma* se obtuvieron las mutantes insercionales homocigotas, *nsp4* y *ARNInc1* de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). Se realizaron ensayos de promoción de crecimiento de las líneas mutantes y se les retó con los patógenos foliares *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*. Finalmente se midió la expresión de los genes de respuesta a SA (*PR-1a*) y JA/ET (*PDF1.2*) en las mutantes *nsp4* y *ARNInc1*.

Material y métodos

Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-0, y las líneas mutantes insercionales *ARNInc1* (Salk_134769) y *nsp4* (Salk_091977). Las semillas se esterilizaron con etanol al 75% por cuatro minutos, con hipoclorito al 20% por seis minutos, y finalmente con se lavaron tres veces de agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron a 4°C por dos días, y posteriormente se incubaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16/8 h luz y oscuridad a 22°C. Cuatro días después se trasplantaron 20 plantas a cajas de Petri con medio MS 0.7x (PhytoTechnology Laboratories) (Murashige y Skoog, 1962) y se incubaron por diez días bajo las condiciones descritas. Se inocularon las plantas con la cepa fúngica *Trichoderma atroviride* IMI206040, que fue crecida previamente en medio PDA (agar de dextrosa y papa, DIFCO™) a 28°C durante 7-10 días. *B. cinerea* B05.10 (Amselem, *et al.*, 2011) se creció por dos semanas en medio PDA a 28°C. *P. syringae* pv *tomato* DC3000 (Cuppels, 1986) se creció en medio King B (King *et al.*, 1954) con 50 µg/ml de rifampicina por 24 h a 37°C.

Análisis de expresión génica y de acumulación de ARNp por RT-qPCR

A las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación (hpi) de plantas de *Arabidopsis* con conidias de *T. atroviride*, se recolectaron y congelaron las raíces y hojas en nitrógeno líquido para macerar el tejido. Para la extracción de ARN total de *A. thaliana* se usó el reactivo RNAget (BioTecMol) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se revisó la calidad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% desnaturalizante. Posteriormente se eliminó la presencia de ADN contaminante con la enzima TURBO DNase (Life Technologies). La transcripción inversa se realizó con la enzima SuperScript II (Invitrogen) en el termociclador Aeris™-BG096 (Esco). Se cuantificó el ADN complementario (ADNc) en el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek). Para la reacción de RT-qPCR se utilizaron 200 ng de ADNc junto con el kit SYBR Green Lo-ROX qPCR (Radiant™),

y se llevaron a cabo en el termociclador PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la normalización de la expresión génica y la acumulación de los ARNp se usó el gen *ACT2* y el ARN pequeño nucleolar *U6* de *Arabidopsis*. Los cálculos de expresión y acumulación relativa se realizaron utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Ensayo de promoción de crecimiento mediado por *T. atroviride*

Las semillas se estratificaron a 4°C por dos días, posteriormente las plantas se crecieron en macetas con sustrato “peat moss” (Sun Gro Horticulture Distribution Inc.) a 21°C con un fotoperiodo de 16/8 h luz y oscuridad. *T. atroviride* se creció por 7-10 días en PDA, se colectaron las conidias y se cuantificaron en una cámara de Neubauer, se ajustó una suspensión con una concentración de 1×10^6 conidias por ml de medio MS 0.3x. Plántulas de cuatro días de edad se inocularon con 500 µl de la suspensión de conidias de *Trichoderma*, y como control se inocularon plantas con medio MS 0.3x libre de conidias. A los 21 días post-inoculación se tomaron fotos con el equipo Lab Scanalyzer^{TS} (LemnaTec GmbH), se lavaron las raíces de ambos tratamientos, se pesaron y se obtuvo el peso húmedo, se deshidrataron a 65 °C por 24 h para obtener el peso seco (biomasa).

Ensayo de reto con patógenos foliares en *Arabidopsis thaliana*

Se creció *B. cinerea* bajo las condiciones antes descritas, se colectaron las conidias y se ajustó una suspensión con una concentración de 5×10^5 conidias por ml de buffer de fosfatos (Para 40ml: 1.37g sacarosa, 1M KH₂PO₄ y 0.025% Tween20). A los 21 días post-inoculación con *Trichoderma* se inocularon con 20 µl de la suspensión de *Botrytis* en la parte adaxial de tres hojas de cada planta. A los seis dpi se tomaron fotos del daño ocasionado con el equipo Lab Scanalyzer^{TS} (LemnaTec GmbH).

Pst DC3000 se creció bajo las condiciones antes descritas, se midió la absorbancia a 600 nm, se ajustó una suspensión con una concentración de 5×10^6

de *Pst* DC3000 con 0.0083% de Silwet L-77 (Ishiga *et al.*, 2011). A las 72 hpi con *Trichoderma* se cortó la parte de la raíz que tuvo contacto con el hongo y se sumergió la parte aérea de las plantas en 20 ml de la solución con la bacteria durante tres minutos. Posteriormente se colocaron en cajas de Petri con medio MS 0.7x. Seis dpi con la bacteria se tomaron fotos del daño ocasionado. Para las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido de *Arabidopsis* (UFC/g), se pesaron las hojas y se realizó un lavado con 2 ml de H₂O₂ al 5% por tres minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se molió el tejido y se hicieron diluciones seriadas que fueron sembradas en cajas de Petri con medio King B con 50 µg/ml de rifampicina, se incubaron a 28°C durante dos días y se contaron la UFC/g.

Ensayo de colonización de las raíces de las líneas mutantes de *Arabidopsis* por *T. atroviride*

Las raíces de plantas de diez días de edad se sumergieron durante cinco minutos en 20 ml de una solución de buffer de fosfatos con una concentración de 1×10^7 conidias/ml de *T. atroviride* sin agitación. Posteriormente, las plantas se pasaron a cajas de Petri con filtros estériles humedecidos con tres ml de agua destilada estéril y se incubaron a 25°C durante cinco días. Se pesaron las raíces y se lavaron una vez con cloro comercial al 1% por dos minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se molió el tejido en un mortero de porcelana y se hicieron diluciones seriadas que fueron sembradas en cajas de Petri con medio PDA suplementado con 0.5% de Tritón X-100, 50 µg/ml de cloranfenicol y 50 µg/ml de kanamicina, se incubaron a 28°C durante tres días y se contaron las colonias usando la fórmula $UFC/100mg = \frac{No. \text{ de colonias} * FD * volumen \text{ de siembra}}{mg \text{ de raíces}}$, donde FD es el factor de dilución.

Tres ARNp de 24 nt de *Arabidopsis* se acumulan durante la interacción de la planta con *Trichoderma*

Con la finalidad de conocer si los tres At_ARNp de *Arabidopsis* responden a la presencia de *T. atroviride*, se evaluó su acumulación en plantas Col-0 de *Arabidopsis* en presencia del hongo mutualista, y se extrajo ARN total de la raíz a las 24, 48, 72 y 96 hp. Posteriormente se sintetizó el ADNc con un “stem-loop RT primer” y se midió la acumulación de los At_ARNp por medio de la técnica de “stem-loop” RT-qPCR usando oligonucleótidos específicos para cada ARNp (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la RT-qPCR Stem-Loop, RT-qPCR y genotipificación

RT-qPCR		
GEN	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)
<i>NSP4</i>	GACATAGCACAGGTAGGAAAC	CTCTCGATGTCAAAGACGTAAA
<i>At_ARNInc1</i>	TCCCACTTATCCTACACCTCTC	ATTCCCACTGTCCCTGTCTA
<i>PR1a</i>	CGTCTCCGCCGTGAACAT	CGTGTTCCGAGCGTAGTTGT
<i>PDF1.2</i>	CACCCTTATCTTCGCTGCTC	GGAAGACATAGTTGCATGATC
<i>ACT2</i>	GACTCAGATCATGTTTGAGACC	CATGTAACCTCTCTCGGTAAGG
GENOTIPIFICACIÓN		
<i>NSP4</i>	GTGACAAACCAAGAAAGGCAG	AGTGGAAACATTCGGTGTGAG
<i>At_ARNInc1</i>	CAGCTCAGAACTGGTACGGAC	TTTGGGAGCCTAAGCTCCTAC
<i>LBB1.3</i>	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	
RT-qPCR		
ARNp	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)
<i>At_ARNp1</i>	GTATACCCTTACCGCAAGAGG	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>At_ARNp2</i>	GTATACACGGACAAGGGGAAT	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>At_ARNp3</i>	GTATACACATTGTCAGGTGGG	GTGCAGGGTCCGAGGT
RT-qPCR Stem-Loop		
<i>At_ARNp1</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCTGCT	
<i>At_ARNp2</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGACAGT	
<i>At_ARNp3</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCAAA	

La acumulación del At_ARNp1 incrementó aproximadamente 3,000 y 6,000 veces a las 24 y 48 hpi y disminuyó a las 72 (4,500) y 96 (2,000) hpi comparada con el control sin tratamiento con *Trichoderma* (Figura 1A). El At_ARNp2 se acumuló 7, 20, 50 y 25 veces a las 24, 48, 72 y 96 hpi respectivamente (Figura 1B). El At_ARNp3 se acumuló 130, 175, 46 y 20 veces a los tiempos indicados (Figura 1C). Estos resultados indican que los tres At_ARNp de *Arabidopsis* responden a la presencia de *Trichoderma* y sugieren un posible papel en la interacción mutualista.

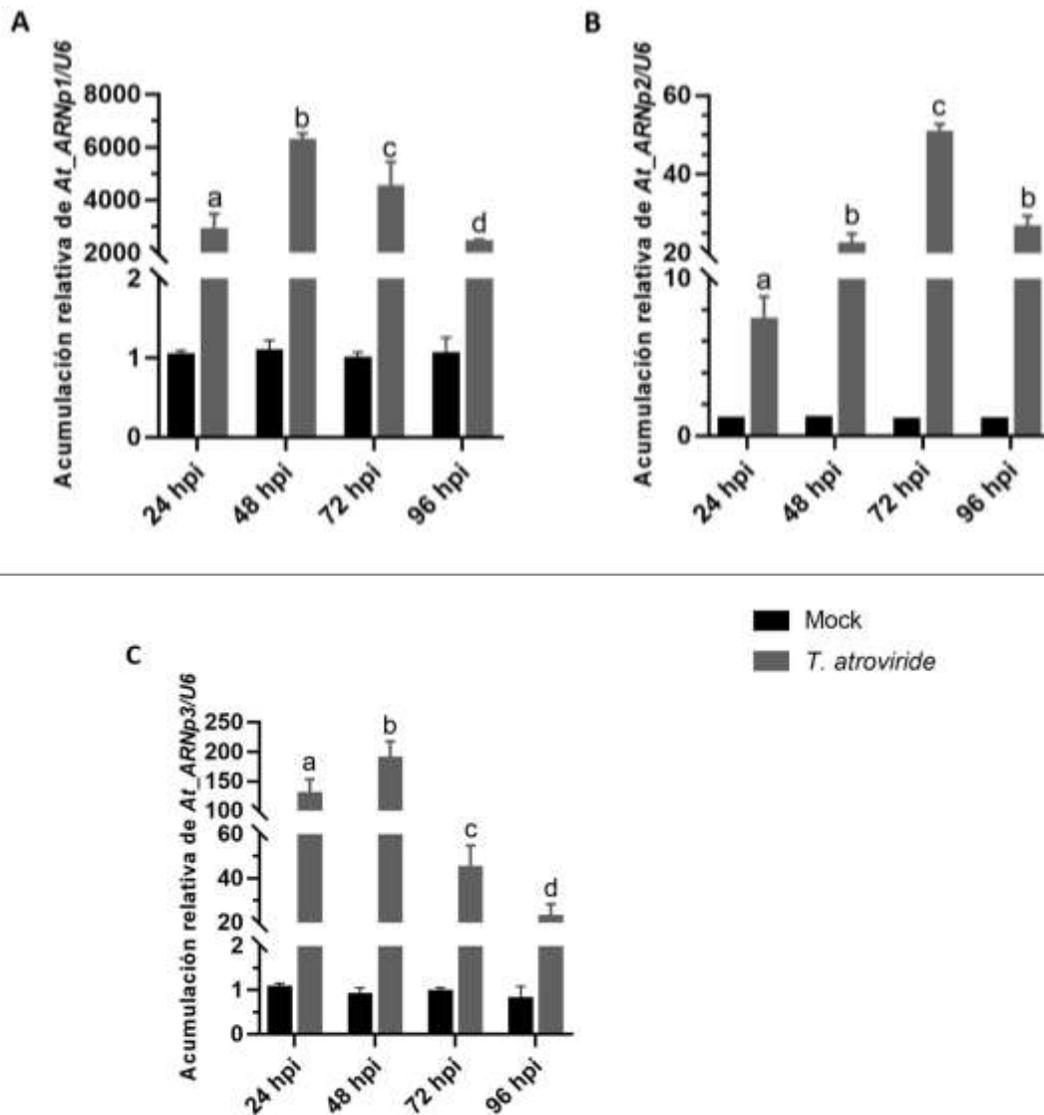


Fig. 1. Tres ARNp de 24 nt de *Arabidopsis* se acumulan en interacción con *T. atroviride*.

La representación gráfica de los niveles de acumulación del At_ARNp1 (A); At_ARNp2 (B) y At_ARNp3 (C) de *Arabidopsis* en respuesta a la presencia de *Trichoderma*. Las barras negras representan los niveles de acumulación de los At_ARNp en la condición control (Mock), las barras grises representan la acumulación de los At_ARNp durante la interacción planta-hongo a las 24, 48, 72 y 96 hpi en Col-0. Los cálculos fueron hechos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se usó el ARN pequeño nucleolar *U6* como control interno. Las barras de error representan la desviación estándar calculada del triplicado técnico de dos experimentos. Se realizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% para comparar la media de los tratamientos.

NSP4* y *At_ARNInc1* se regulan de manera dependiente de las vías del silenciamiento mediadas por ARNp en presencia de *Trichoderma

Con la finalidad de determinar si los blancos putativos de los tres ARNp de 24 nt, el *At_ARNInc1* y *NSP4* de *Arabidopsis* juegan un papel en la interacción de la planta con *T. atroviride*, se adquirieron las semillas de plantas mutantes insercionales *nsp4* y *ARNInc1*, y por medio de PCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) se realizó una genotipificación de plantas para obtener mutantes homocigotas. De las plantas que resultaron homocigotas de cada línea se cosecharon las semillas para continuar con los experimentos de interacción *Arabidopsis-Trichoderma*.

Como se mencionó, las proteínas argonauta AGO2, AGO4, y las metiltransferasas de ADN CMT3, DRM1 y DRM2 de *Arabidopsis* están involucradas en el silenciamiento génico transcripcional mediado por ARNp de 24 nt mediante la metilación directa del ADN y las modificaciones de las histonas, por lo que se midió la expresión de *NSP4* y *At_ARNInc1*, y la acumulación de los *At_ARNp* en la línea Col-0, las mutantes *ago2-1*, *ago4-2* y la triple mutante *cmt3/drm1/drm2* para determinar si la expresión de los blancos sigue una tendencia de acumulación inversa a la de los *At_ARNp*, lo que indicaría un posible regulación por estos últimos sobre sus blancos.

Para medir la expresión de *NSP4*, *At_ARNInc1*, y la acumulación de los *At_ARNp* en las mutantes (*ago2-1*, *ago4-2* y *cmt3/drm1/drm2*) se colectó tejido de raíz a las 48 hpi con *Trichoderma* debido a que es cuando hay una mejor respuesta de los *At_ARNp* en la línea Col-0 en presencia del hongo benéfico (Fig. 1), y se realizó una RT-qPCR.

La expresión de *NSP4* en la línea Col-0 disminuyó en la presencia de *T. atroviride*, mientras que las mutantes *ago2-1* y *ago4-2* mostraron niveles aún más bajos (Figura 2A). De manera contrastante, la mutante *cmt3/drm1/drm2* presentó altos niveles de expresión (4 veces) en comparación con la línea Col-0 (Figura 2A), lo que sugiere una regulación mediada por la vía de la RdDM, que involucra a AGO2 y AGO4 ya que, al no estar presentes estas proteínas, hay una menor acumulación de *NSP4*.

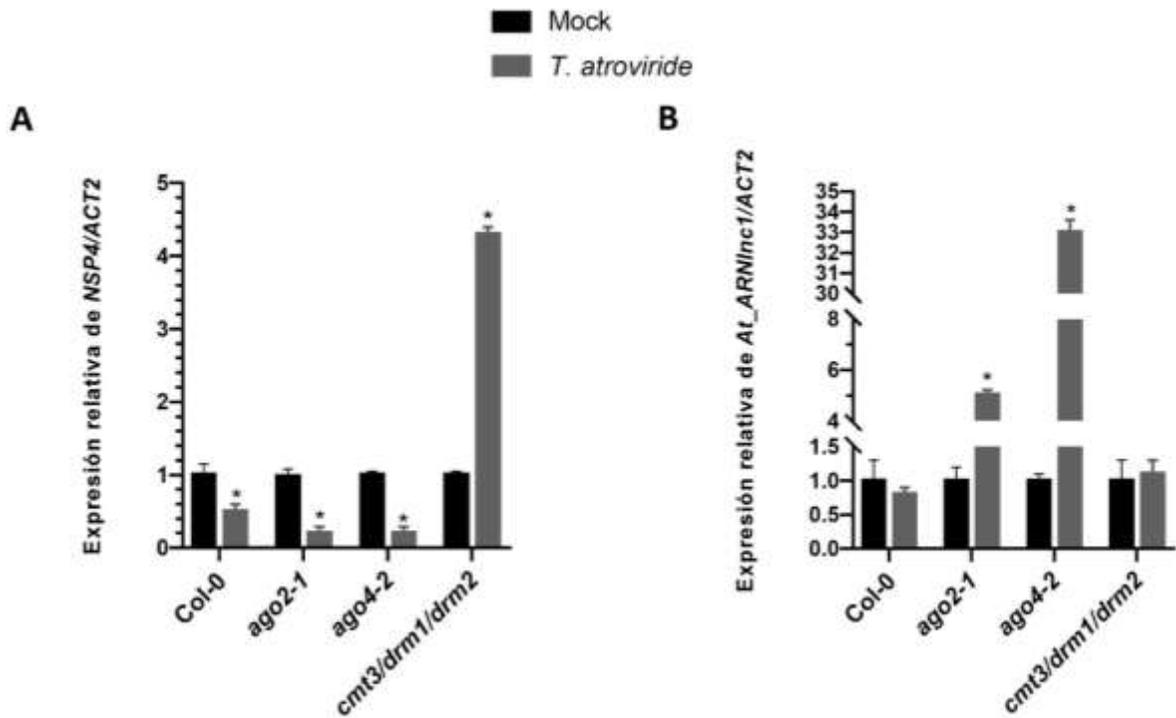


Fig. 2. *NSP4* y *At_ARNinc1* se regulan de manera dependiente a las vías del silenciamiento mediado por sRNAs en presencia de *Trichoderma*.

Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de *NSP4* de *Arabidopsis* (A) y *At_ARNinc1* (B) en los fondos genéticos Col-0, *ago2-1*, *ago4-2* y *cmt3/drm1/drm2* en presencia de *T. atroviride* a los tiempos señalados. Las barras negras representan los niveles de expresión relativa de los genes en la condición control (Mock), las barras grises representan los niveles de expresión relativa de los genes en el tratamiento con *Trichoderma*. El experimento se repitió dos veces con duplicados técnicos. Los cálculos fueron hechos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se usó el gen *ACT2* como control interno. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en los niveles de expresión comparando Col-0 con las mutantes (*ago2-1*, *ago4-2* y *cmt3/drm1/drm2*) en interacción con *Trichoderma*.

Para el At_ARNp1 se determinó una acumulación de casi 4 veces en la Col-0 inoculada en el hongo comparada con el control sin inocular, mientras que su acumulación fue menor en las mutantes *ago2-1* (2 veces), *ago4-2* (1.5 veces) y *cmt3/drm1/drm2* (0.13 veces) en presencia del hongo comparada con la Col-0 y su propio control. En la mutante *nsp4* el At_ARNp1 se acumuló 6 veces más en presencia del hongo comparada con el control (Figura 3A).

La expresión del *At_ARNInc1* disminuyó ligeramente en la línea silvestre en presencia de *Trichoderma*, mientras que en las mutantes *ago2-1* y *ago4-2* se incrementó la expresión (Figura 3B). En la triple mutante *cmt3/drm1/drm2* no hubo cambios en presencia del hongo, ni con respecto al control Col-0 control (Figura 2B).

Los At_ARNp2 y At_ARNp3 presentaron una mayor acumulación en la Col-0 (4.5 y 30 veces) en presencia de *Trichoderma*, mientras que en las mutantes *ago2-1*, *ago4-2* y *cmt3/drm1/drm2* el ARNp2 no mostró cambios con respecto a los controles (Figura 3B). El At_ARNp3 mostró altos niveles en las mutantes *cmt3/drm1/drm2* y *IncRNA1* (Figura 3C). En Col-0 la expresión del *At_IncRNA1* podría estar regulada por los At_sRNAs (Fig. 1B y C; Fig. 2B).

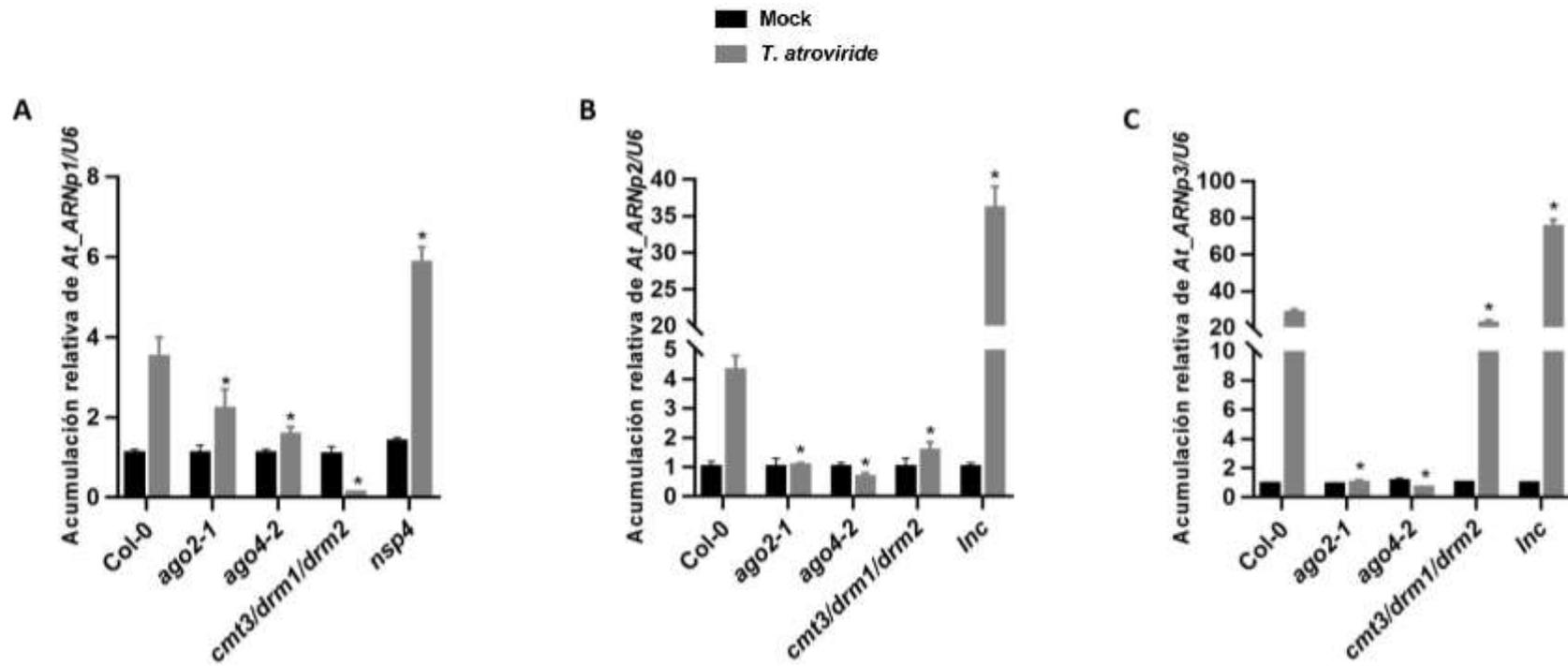


Fig. 3. La acumulación de los At_ARNp es inversa a la expresión de sus blancos en los distintos fondos genéticos mutantes.

Representación gráfica de los niveles de acumulación del At_ARNp1 (A), At_ARNp2 (B) y At_ARNp3 (C) en los fondos genéticos Col-0, *ago2-1*, *ago4-2*, *cmt3/drm1/drm2*, *nsp4* y *ARNInc1* a las 48h de interacción con *Trichoderma*. Las barras negras representan los niveles de expresión relativa de los genes en la condición control (Mock), las barras grises representan los niveles de acumulación relativa de los At_ARNp en el tratamiento con *Trichoderma*. Los cálculos fueron hechos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) usando el ARN pequeño nucleolar *U6* como control interno. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados del triplicado técnico. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en los niveles de expresión comparando Col-0 con las mutantes (*ago2-1*, *ago4-2*, *cmt3/drm1/drm2*, *Inc* y *nsp4*) en interacción con *Trichoderma*.

***NSP4* y *At_ARNInc1* participan en la regulación negativa del crecimiento en *Arabidopsis*.**

Para conocer si *NSP4* y *At_ARNInc1* están involucrados en el crecimiento de *Arabidopsis* mediada por *Trichoderma*, se hicieron ensayos de promoción de crecimiento. Plantas Col-0, *nsp4* y *ARNInc1* de siete días de edad crecidas en *peat moss* como sustrato fueron inoculadas con conidias de *Trichoderma* y los controles con medio MS líquido. A los 21 días post inoculación (dpi) se lavaron las raíces de ambos tratamientos, se pesaron y se deshidrataron para determinar la biomasa.

Ambas mutantes presentaron un tamaño y peso mayor a Col-0 en presencia y ausencia de *Trichoderma* (Figura 4A), mientras que el tratamiento de Col-0 con el hongo aumentó su crecimiento. La proteína *NSP4* y el *At_ARNInc1* parecen participar en la regulación negativa del crecimiento de *Arabidopsis*, ya que las plantas tratadas con el hongo presentaron tamaños y peso seco similares a las plantas control (Figura 4A-C). Estos resultados indican que *NSP4* y *At_ARNInc1* pueden participar en una regulación negativa del crecimiento en *Arabidopsis*, sin embargo, con estos datos no podemos saber si juegan algún papel en la promoción del crecimiento mediada por *Trichoderma*.

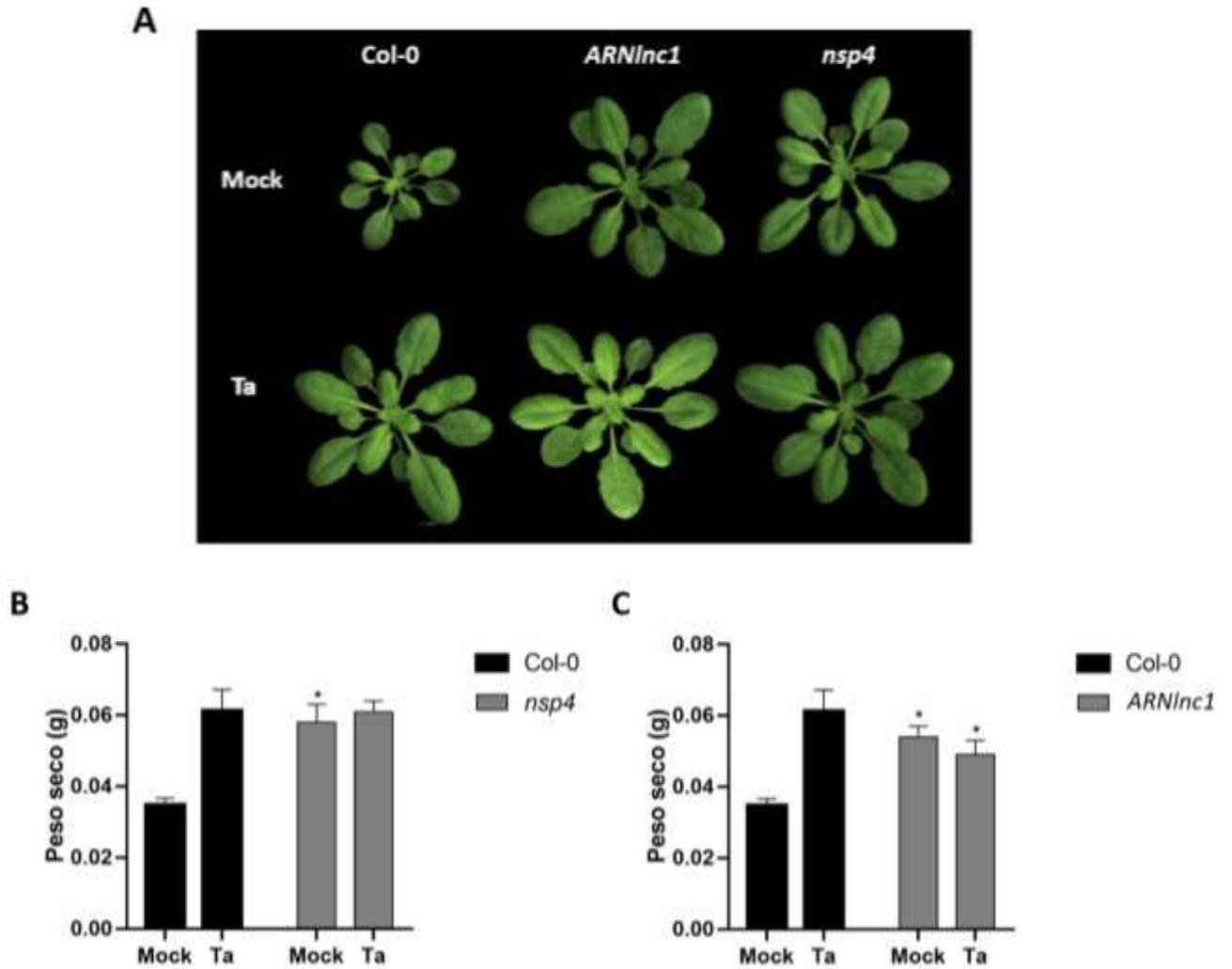


Fig. 4. *NSP4* y *At_IncRNA1* participan en una regulación negativa del crecimiento de *Arabidopsis*.

Fotos representativas de plantas Col-0, *nsp4* y *IncRNA1* a los 21 días del tratamiento con *Trichoderma* (A). Representación gráfica del peso seco de las plantas *nsp4* (B) y *IncRNA1* (C) con respecto a la línea Col-0. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en el peso seco comparando Col-0 con las mutantes (*Inc* y *nsp4*). Se realizaron dos experimentos. Ta = *Trichoderma atroviride*, Mock = inoculadas con MS 0.3X.

La mutante *nsp4* es más sensible a *Pst* DC3000 y no responde al "priming" inducido por *Trichoderma* contra *B. cinerea* y *Pst* DC3000, mientras que la mutante *ARNInc1* no desencadena al "priming" en la presencia del hongo mutualista contra *B. cinerea*

Para conocer si *NSP4* y *At_ARNInc1* están involucrados en la defensa de *Arabidopsis* contra patógenos y en la inducción de la resistencia sistémica mediada por *Trichoderma*, se hicieron ensayos de reto con los fitopatógenos *B. cinerea* y *P. syringae* (*Pst* DC3000) en ausencia y presencia de *Trichoderma*.

Botrytis afecta a las mutantes y a Col-0 de manera similar en ausencia de *Trichoderma* (Figura 5A-C); sin embargo, cuando fueron tratadas previamente con el hongo benéfico y posteriormente retadas con el patógeno, solo Col-0 responde al "priming" por *Trichoderma* al haber una disminución en el área de daño mientras que en las mutantes se observaron como las controles sin *Trichoderma* (Figura 5A-C).

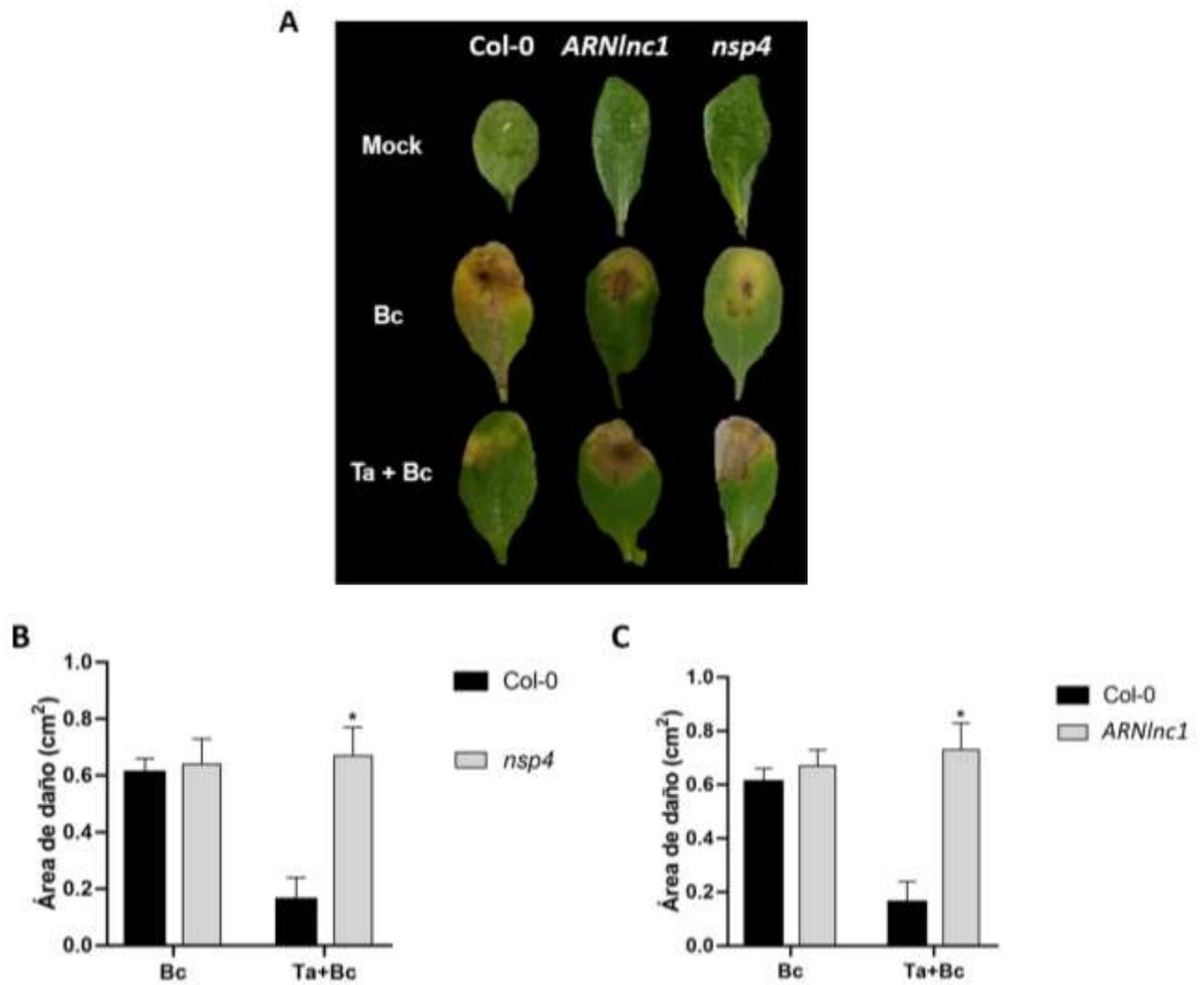


Fig. 5. Las mutantes *nsp4* y *ARNlnc1* no responden al “priming” generado por *Trichoderma* contra *B. cinerea*

Fotos representativas de plantas Col-0, *nsp4* y *ARNlnc1* a los 21 días del tratamiento con *Trichoderma* y 6 del reto contra *B. cinérea* (A). Representación gráfica del área dañada en hojas de plantas *nsp4* (B) y *ARNlnc1* (C) por *B. cinerea*. Los controles fueron inoculados con buffer de fosfatos (Mock). Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en el área de daño comparando Col-0 con las mutantes (*lnc* y *nsp4*). Se realizaron dos experimentos. Ta- *Trichoderma atroviride*. Bc- *Brotrytis cinerea*.

Para el ensayo con *Pst* DC3000, la mutante *ARNInc1* presentó una susceptibilidad similar a Col-0 mientras que *nsp4* es ligeramente más sensible a *Pst* DC3000 cuando no fueron previamente inoculadas con *Trichoderma*; sin embargo, cuando fueron tratadas previamente con el hongo benéfico y después retadas con *P. syringae*, la mutante *ARNInc1* al igual que Col-0 responden al “priming” por *Trichoderma* (Figura 6).

La mutante *ARNInc1* podría estar afectada en la vía del JA/ET debido a que es susceptible al patógeno necrotrófico *B. cinérea* y la mutante *nsp4* podría estar afectada en ambas vías (SA y JA/ET) y en el “priming”, ya que fue susceptible a los dos patógenos y no respondió a la presencia de *Trichoderma* y su posterior reto con los patógenos.

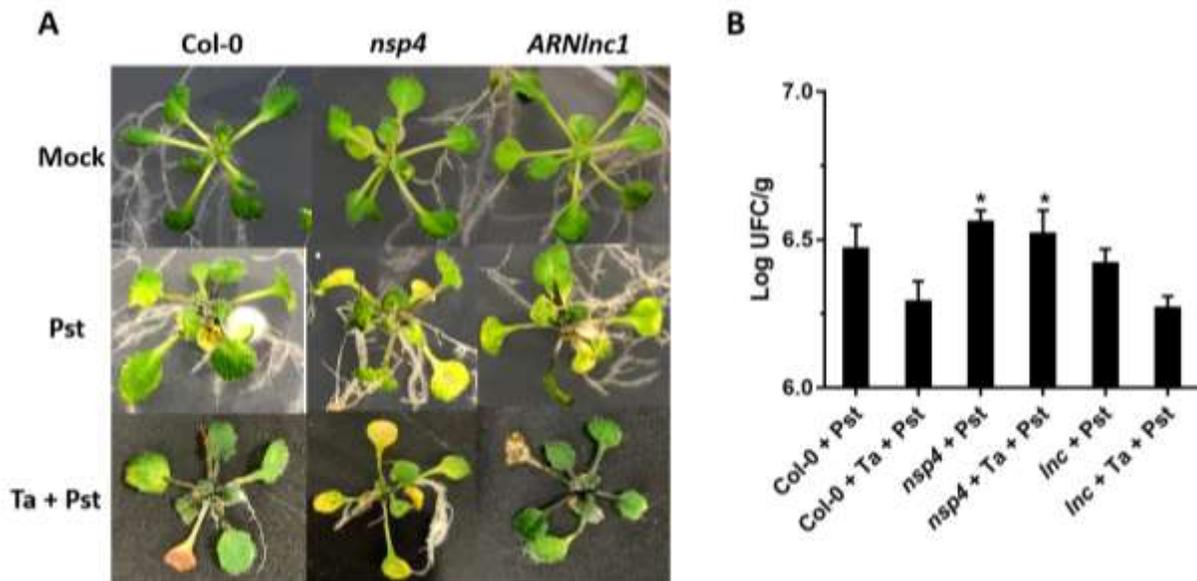


Fig. 6. La mutante *nsp4* no responde al “priming” generado por *Trichoderma* contra *Pst* DC3000.

Fotos representativas de plantas Col-0, *nsp4* y *ARNinc1* pre-tratadas por 3 días con *Trichoderma* y 6 días después del tratamiento con *Pst* DC3000 (A). Representación gráfica de las Unidades Formadoras de Colonia por gramo de tejido (UFC/g) de las plantas inoculadas con *Pst* DC3000 (B). Plantas Col-0, *nsp4* y *ARNinc1* fueron inoculadas con *Trichoderma*, y a las 72 hpi se sumergieron en una suspensión con una concentración de 5×10^6 de *Pst* DC3000. Los controles fueron inoculados con agua destilada estéril (Mock). Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados del triplicado técnico de un experimento. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en las UFCs comparando Col-0 con las mutantes (*Inc* y *nsp4*). Ta- *Trichoderma atroviride*. Pst- *Pseudomonas syringae* pv *tomato* Pst DC3000.

Las mutantes *ARNInc1* y *nsp4* están afectadas en la expresión de genes de respuesta a SA y JA/ET

Para confirmar que la susceptibilidad de las mutantes está relacionada con una desregulación en las vías dependientes de las fitohormonas SA y JA/ET, se midió la expresión de los genes *PR-1a* y *PDF1.2* respectivamente. *PR-1a* codifica para una proteína relacionada a patogenicidad y es responsivo a SA (van Loon y van Strien, 1999), *PDF1.2* codifica para la defensina 1.2 y es responsivo a JA/ET (Penninckx, *et al.*, 1996). Se extrajo ARN total de las hojas a las 24, 48, 72 y 96 hpi con *T. atroviride* y se determinó la expresión de los genes *PR-1a* y *PDF1.2* con oligonucleótidos específicos (Tabla 2) por medio de RT-qPCR.

La expresión de ambos genes resultó menor en la mutante *nsp4* comparado con Col-0 (Figura 7), mientras que la mutante *ARNInc1* solo está afectada de manera negativa en la expresión de *PDF1.2* (Figura 8). Estos resultados junto con los fenotipos de reto con patógenos soportan nuestra hipótesis de que la mutante *ARNInc1* está afectada en la vía del JA/ET y la mutante *nsp4* está afectada en las vías JA/ET y SA.

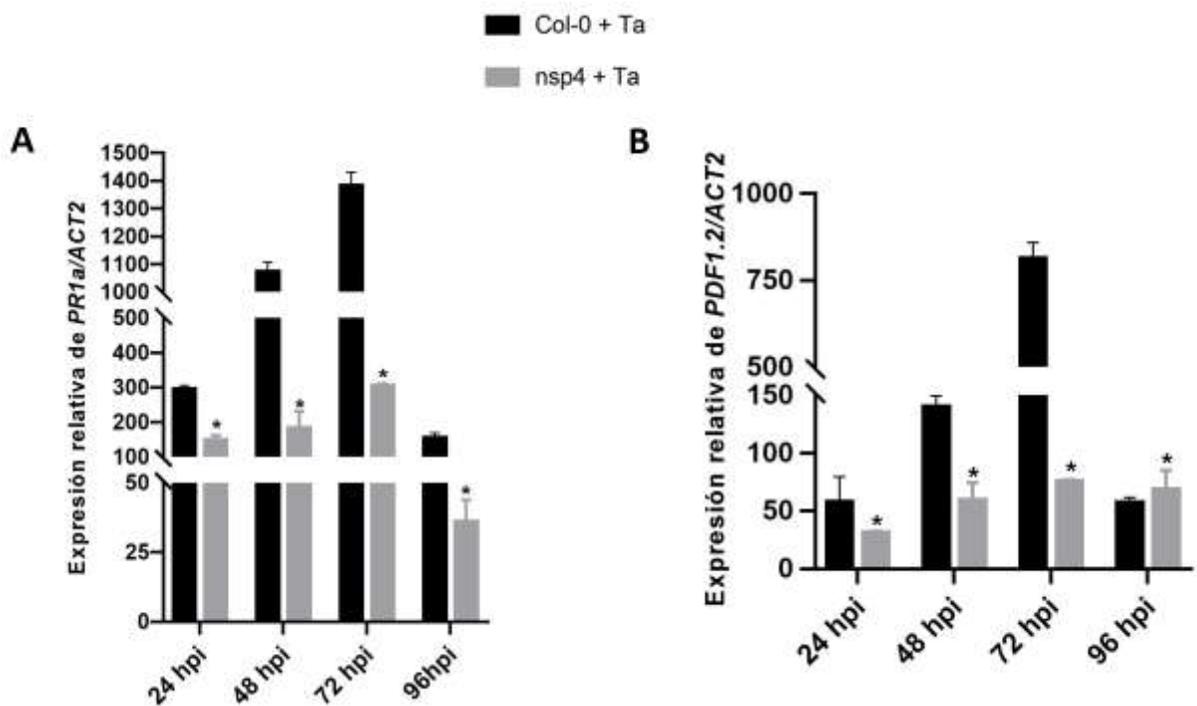


Fig. 7. La mutante *nsp4* está afectada en la inducción de los genes de respuesta al SA y JA/ET.

Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los genes *PR-1a* (A) y *PDF1.2* (B) en la mutante *nsp4* en respuesta a la presencia de *Trichoderma* a los tiempos señalados. Las barras negras representan los niveles de expresión relativa de los genes en Col-0 y las barras grises representan los niveles de expresión relativa de los genes en la mutante *nsp4*. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados. Se realizaron tres experimentos con duplicados técnicos. Los cálculos fueron hechos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se usó el gen *ACT2* como control interno. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en los niveles de expresión comparando Col-0 con *nsp4* en cada tiempo.

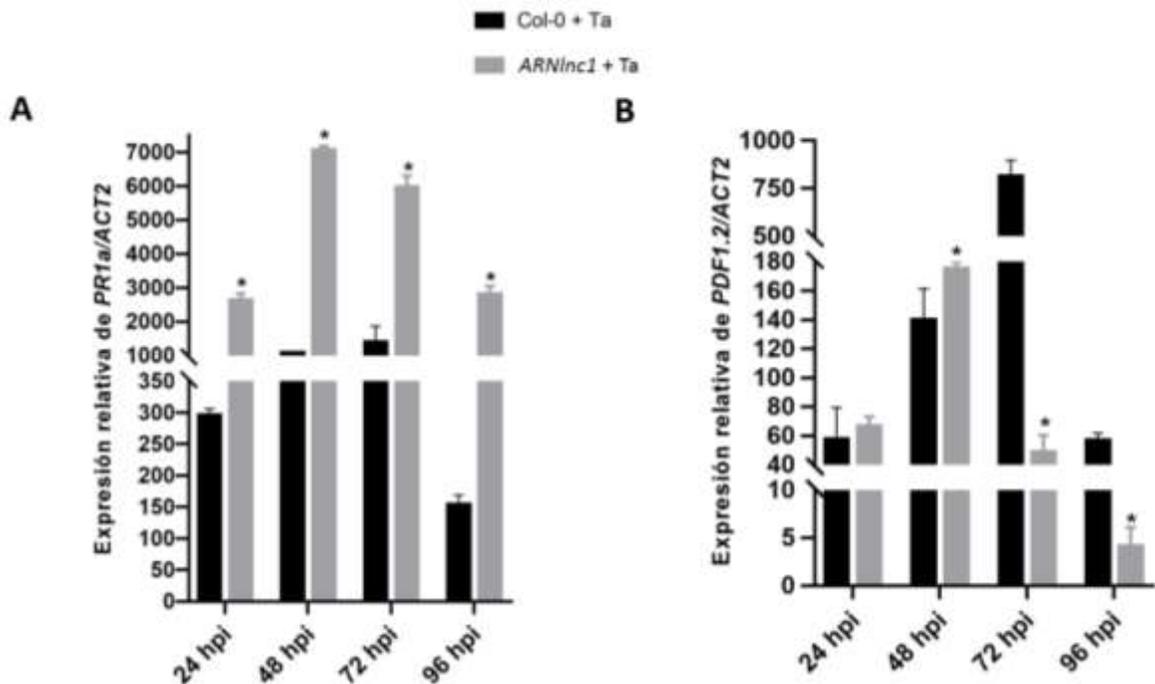


Fig. 8. La mutante *ARNInc1* está afectada en la inducción de los genes de respuesta a SA y JA/ET.

Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los genes *PR1a* (A) y *PDF1.2* (B) en la mutante *ARNInc1* en respuesta a la presencia de *Trichoderma* a los tiempos señalados. Las barras negras representan los niveles de expresión relativa de los genes en Col-0 y las barras grises representan los niveles de expresión relativa de los genes en la mutante *ARNInc1*. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados. Se realizaron tres experimentos con duplicados técnicos. Los cálculos fueron hechos con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se usó el gen *ACT2* como control interno. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en los niveles de expresión comparando Col-0 con *ARNInc1* en cada tiempo.

Las mutantes *nsp4* y *ARNInc1* son colonizadas en mayor medida por *Trichoderma* en comparación con Col-0.

Para confirmar que todos los resultados antes mencionados sean mediados por *Trichoderma* se hizo un ensayo de colonización de las raíces. Se sumergieron las raíces de plantas Col-0, *nsp4* y *ARNInc1* de 10 días de edad en una solución con conidias de *Trichoderma* a una concentración de 1×10^6 durante cinco minutos (como se describe en la sección de métodos).

Se observó que *Trichoderma* coloniza ambas mutantes en mayor cantidad que a la silvestre Col-0 (Figura 9). Estos resultados junto con los fenotipos de promoción de crecimiento, reto con patógenos y expresión de los genes *PR-1a* y *PDF1.2* soportan nuestra hipótesis de que el *At_ARNInc1* y *NSP4* están involucrados en la resistencia sistémica mediado por el hongo mutualista *Trichoderma atroviride*.

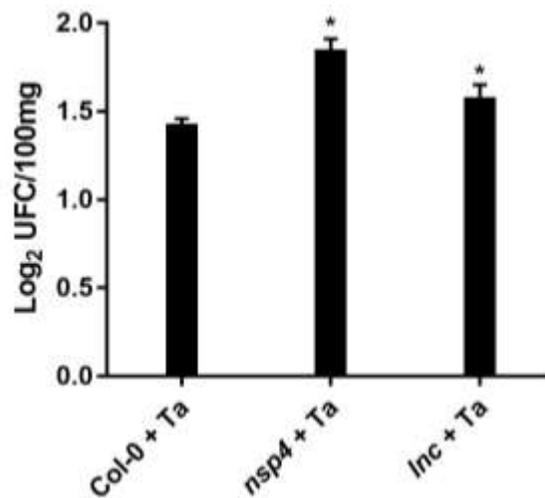


Fig. 9. *Trichoderma* sobre coloniza a las raíces de las mutantes *nsp4* y *ARNInc1* en comparación con la línea Col-0.

Las raíces de plantas Col-0, *nsp4* y *ARNInc1* fueron inoculadas con *Trichoderma* y a los cinco días se determinaron las Unidades Formadoras de Colonia por 100 mg de tejido radicular (UFC/100mg) de las plantas inoculadas con *Trichoderma*. Las barras de error señalan la desviación estándar de los datos analizados del duplicado técnico de un experimento. Los asteriscos representan una diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) en las UFCs comparando Col-0 con las mutantes (*Inc* y *nsp4*). Ta- *Trichoderma atroviride*.

Discusión

En el presente trabajo se evaluó el papel de *NSP4* y *At_ARNInc1* en la inducción de la resistencia sistémica y la promoción del crecimiento en *Arabidopsis* mediado por *T. atroviride*, debido a que resultaron ser blancos putativos de uno y dos ARNp de 24 nt de la planta respectivamente, y cuya función particular de ambos genes y ARNp en la inmunidad de la planta y la respuesta a un microorganismo benéfico son desconocidos. Los resultados obtenidos son novedosos dentro de este campo de estudio. Sin embargo, hay reportes de diversos ARNs largos no codificantes que participan en la modulación de la expresión de genes bajo estrés abiótico, inducidos por falta de fosfato, en respuesta a luz o por cambios de temperatura y estrés biótico (Liu *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2014). En cuanto a la familia de enzimas nitrilo especificadoras (NSP) a la que pertenece NSP4, solo hay reportes de ensayos *in vitro* que demuestran su capacidad de generar nitrilos a partir de 2-propenilglucosinolato (glucosinolato alifático conocido como sinigrina), benzilglucosinolato (glucotropaeolina) e indol-3-metilglucosinolato (glucobrasicina) en presencia de Fe²⁺ y que la formación de nitrilos simples depende principalmente de NSP1 y NSP5 (Kong, *et al.*, 2012; Wittstock, *et al.*, 2016).

La presencia de diferentes ARNp en la interacción *Trichoderma-Arabidopsis* se observó en un trabajo previo (Estrada-Rivera *et al.*, sin publicar). Las vías del silenciamiento mediadas por ARNp son componentes esenciales en la activación de la respuesta inmune de las plantas donde participan ARNp de 24 nt, involucrados en la vía de la RdDM (Peláez y Sánchez, 2013; Sánchez *et al.*, 2016). Los tres *At_ARNp* de 24 nt se acumularon por la presencia de *Trichoderma*, por lo cual, se propone que pueden jugar un papel en la interacción mutualista. Navarro y col. (2006) observaron una represión en los blancos de miR393 de *Arabidopsis*, tres transcritos receptores de auxina (TIR1, AFB2 y AFB3), después del tratamiento con flg22. Esta última molécula es un fragmento conservado de 22 aminoácidos de la flagelina bacteriana que induce la respuesta sistémica adquirida (SAR) y local dependiente de SA en las plantas (Jelenska, *et al.*, 2017). Pruss y col. (2008)

observaron una inducción en la acumulación de miR393 durante la infiltración con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* en etapas tempranas de la infección lo que incrementó la susceptibilidad de las plantas. Nuestros resultados de acumulación de los ARNp y la disminución de los transcritos (*NSP4* y *At_ARNInc1*) en raíces de *Arabidopsis* indican que puede haber una regulación negativa de estos últimos por los ARNp, sin embargo, experimentos en sistemas heterólogos y de 5'RACE *in vivo*, y de precipitación de proteínas AGO y secuenciación de los ARNp nos ayudarán a demostrar mecánicamente esta hipótesis.

La vía RdDM está involucrada en el silenciamiento génico transcripcional mediante la metilación del ADN y la posterior modificación de las histonas, las proteínas AGO2 y AGO4 y las metiltransferasas de ADN (CMT3, DRM1 y DRM2) junto con ARNp de 24 nt, participan en dicha vía (Matzke, *et al.*, 2015). En este trabajo, en la línea Col-0 la expresión de *NSP4* en presencia de *Trichoderma* se encontró reprimida, posiblemente debido a que la(s) molécula(s) producidas por la participación del producto de este gen en la hidrólisis de tioglucósidos puedan estar generando un efecto negativo en la colonización de las raíces por el hongo. Del mismo modo, la expresión de *NSP4* en las mutantes *ago2-1*, *ago4-2* se encuentra por niveles muy bajos comparados con los del control en ausencia de *Trichoderma*, mientras que en la triple mutante *cmt3/drm1/drm2* se detectaron niveles muy elevados, lo que sugieren una regulación mediada por la vía de la RdDM, tal vez a través de AGO6, y de manera indirecta por AGO2 y AGO4 al regular a posibles represores de la expresión de *NSP4*. La expresión del *At_ARNInc1* incrementó en las mutantes *ago2-1* y *ago4-2* y permaneció en niveles basales en la triple mutante *cmt3/drm1/drm2*, lo que sugiere una regulación de AGO2 y AGO4 en la expresión de este gen. Análisis similares a los realizados con las mutantes *ago2* y *ago4* con mutantes en AGO6, ayudarán a determinar si esta proteína participa en la regulación de *NSP4* junto con las metiltransferasas de ADN CMT3/DRM1/DRM2.

La expresión del gen *NSP4*, blanco putativo del *At_ARNp1* tiende a disminuir, mientras que el ARN pequeño tiende a acumularse en la línea Col-0 y en las mutantes de la vía de la RdDM en presencia de *Trichoderma*, por lo cual, sugerimos que el *At_ARNp1* podría regular a su blanco putativo. El aumento en la acumulación

de los *At_ARNp2* y *At_ARNp3* en la mutante *ARNlnc1* sugieren que este ARN largo no codificante podría estar siendo degradado por la acción de estos ARNs pequeños. Se ha demostrado que el corte de transcritos mediado por microARNs es capaz de desencadenar la producción de ARNs pequeños secundarios denominados "trans-acting siRNAs", además los ARNlnc presentan una mayor tasa de producción de ARNp secundarios comparado con los transcritos codificadores de proteínas (Gai, *et al.*, 2018; Zheng, *et al.*, 2017), también hay evidencias de ARNlnc precursores de la biogénesis de ARNpi (Wilusz *et al.*, 2019). El ARN largo no codificante 1 (*MuLnc1*) de la mora (*Morus multicaulis*) es un ejemplo de ARNlnc que genera ARNs pequeños secundarios (Gai, *et al.*, 2018). Gai y col. (2018) demostraron que el corte de *MuLnc1* por la unión de mul-miR3954 desencadena la generación de tres ARNs pequeños secundarios de 21 nt. (si47311, si161579 y si24218), las secuencias de estos ARNp secundarios se encontraban río debajo del sitio de unión de mul-miR3954 a *MuLnc1*; finalmente demostraron que el si161579 es funcional y capaz de regular la expresión de su blanco el gen de la proteína similar a calmodulina (*MuCML27*) que está involucrado en la respuesta a estrés abiótico (sequía y salinidad) y en la respuesta a patógenos como *B. cinerea* y *Pst* DC3000. El *At_ARNlnc1* podría estar funcionando en una manera similar generando en conjunto ARNp secundarios por medio de las ARN pol dependientes de ARN (RDR6) y las proteínas DCL4, involucradas en esta vía de generación de ARNp para regular varios aspectos de la biología de *Arabidopsis*, incluyendo las respuestas características a *Trichoderma* (Fei, *et al.*, 2013; Matzke, *et al.*, 2015; Pumplin y Voinnet, 2013).

El tamaño mayor de las rosetas de las mutantes *nsp4* y *ARNlnc1* en ausencia de *Trichoderma*, comparado con Col-0 indica que *NSP4* y *At_ARNlnc1* pueden jugar un papel en la regulación negativa del crecimiento en *Arabidopsis*. Adicionalmente, las mutantes ya no responden a la presencia del hongo, lo que sugiere que pueden ser insensibles a la presencia de *Trichoderma* o que las plantas llegaron al límite superior en la talla de la roseta de *Arabidopsis*.

La mutante *nsp4* no responde al "priming" inducido por *Trichoderma* cuando es retada con *Botrytis* y con *Pst* DC3000, debido a que no hay registros de la función

específica de *NSP4* en la inmunidad de las plantas y de acuerdo a los resultados obtenidos *NSP4* podría estar produciendo moléculas de señalización mediada por *Trichoderma* para propagar la defensa a partes distales de la planta. La expresión de los genes responsivos a SA y JA/ET resultó menor en la mutante *nsp4* comparado con Col-0. Estos resultados junto con los fenotipos de reto con patógenos y los datos de colonización soportan nuestra hipótesis de que la mutante *nsp4* está afectada en ambas vías y su papel en la generación de señales sistémicas. Otra posible explicación es que los productos de *NSP4*, putativamente nitrilos simples, jueguen un papel como agentes antimicrobianos y que sean muy importantes para contrarrestar a los patógenos *B. cinerea* y *Pst* DC3000, sin embargo, esto no explica la ausencia de respuesta sistémica en las vías del SA y JA/ET, ya que *T. atroviride* sobrecoloniza a las raíces de la mutante.

La expresión del gen *PDF1.2* se vio afectada de manera negativa en la mutante *ARNInc1* lo que correlaciona con su susceptibilidad al hongo patógeno *B. cinérea*. Nuestros resultados de susceptibilidad a un hongo patógeno se asemejan a los obtenidos por Zhu y col. (2014), que observaron un mayor daño por *Fusarium oxysporum* en mutantes de quince *ARNInc* en *A. thaliana*. Del mismo modo el aumento en la expresión de *PR-1a* y la resistencia de la mutante *ARNInc1* a *Pst* DC3000 se asemejan a los resultados obtenidos por Seo y col. (2017), que reportaron un incremento en la resistencia en las líneas sobreexpresantes de Elf18-Induced lncRNA1 (ELENA1) a *P. syringae* y un incremento en la transcripción del gen *PR-1a*. La disminución en la inducción de los genes *PR-1a* y *PDF1.2* en *nsp4* correlaciona con el daño de las plantas de esta línea contra *Pst* DC3000 y *B. cinerea*, respectivamente.

De acuerdo a los resultados presentados, se puede concluir que *NSP4* y *At_ARNInc1* codifican para moléculas que tiene un papel importante en la modulación de la resistencia sistémica mediada por *Trichoderma* y en el crecimiento de la planta, sin embargo, es necesario adentrarse más en el tema para ampliar el conocimiento de dichas moléculas y resaltar su importancia dentro de la inmunidad de las plantas.

Conclusiones

Tres ARNp de 24 nt de *Arabidopsis* se acumulan durante la interacción de la planta con *Trichoderma*.

La expresión de *NSP4* y *At_ARNInc1* están afectados en las vías del silenciamiento mediadas por ARNp en presencia de *Trichoderma*.

NSP4 y *At_ARNInc1* participan en la regulación negativa del crecimiento en *Arabidopsis*.

La mutante *nsp4* es más sensible a *Pst* DC3000 y no responde al "priming" inducido por *Trichoderma* contra *B. cinerea* y *Pst* DC3000.

La mutante *ARNInc1* no desencadena al "priming" en la presencia del hongo mutualista contra *B. cinerea*

Las mutantes *ARNInc1* y *nsp4* están afectadas en la expresión de genes de respuesta a SA y JA/ET

Referencias

Amselem, J. *et al.* (2011) 'Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*', *PLoS Genetics*, 7(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1002230.

Argumedo-Delira, R. *et al.* (2009) 'Revisión / Review EL GÉNERO FÚNGICO', *Rev. Int. Contam. Ambient*, 25(4), pp. 257–269.

Burow, M. *et al.* (2009) 'The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*', *Plant Physiology*, 149(1), pp. 561–574. doi: 10.1104/pp.108.130732.

Conrath, U. (2011) 'Molecular aspects of defence priming', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 16(10), pp. 524–531. doi: 10.1016/j.tplants.2011.06.004.

Cuppels, D. A. (1986) 'Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato', *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), pp. 323–327. doi: 10.1128/aem.51.2.323-327.1986.

Dautt-Castro, M. *et al.* (2020) 'TBRG-1 a Ras-like protein in *Trichoderma virens* involved in conidiation, development, secondary metabolism, mycoparasitism, and biocontrol unveils a new family of Ras-GTPases', *Fungal Genetics and Biology*, 136(2055). doi: 10.1016/j.fgb.2019.103292.

Estrada-Rivera, M. *et al.* (2020) 'IPA-1 a Putative Chromatin Remodeler/Helicase-Related Protein of *Trichoderma virens* Plays Important Roles in Antibiosis Against *Rhizoctonia solani* and Induction of *Arabidopsis* Systemic Disease Resistance', *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 0(0), p. MPMI-04-19-0092. doi: 10.1094/mpmi-04-19-0092-r.

Fei, Q., Xia, R. and Meyers, B. C. (2013) 'Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks', *Plant Cell*, 25(7), pp. 2400–2415. doi: 10.1105/tpc.113.114652.

Gai, Y. P. *et al.* (2018) 'A novel LncRNA, MuLnc1, associated with

environmental stress in mulberry (*Morus multicaulis*)', *Frontiers in Plant Science*, 9(May), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2018.00669.

Garay-Arroyo, A. *et al.* (2014) 'LA HOMEOSTASIS DE LAS AUXINAS Y SU IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO DE *ARABIDOPSIS THALIANA*', 33(1), pp. 13–22.

Infante, D. *et al.* (2009) 'Trichoderma MECHANISMS OF ACTION AGAINST PHYTOPATHOGEN FUNGI', *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), pp. 14–21.

Ishiga, Y. *et al.* (2011) 'Arabidopsis seedling flood-inoculation technique: A rapid and reliable assay for studying plant-bacterial interactions', *Plant Methods*, 7(1). doi: 10.1186/1746-4811-7-32.

Jelenska, J. *et al.* (2017) 'Flagellin peptide flg22 gains access to long-distance trafficking in Arabidopsis via its receptor, FLS2', *Journal of Experimental Botany*, 68(7), pp. 1769–1783. doi: 10.1093/jxb/erx060.

Kim, E. D. y Sung, S. (2012) 'Long noncoding RNA: Unveiling hidden layer of gene regulatory networks', *Trends in Plant Science*, 17(1), pp. 16–21. doi: 10.1016/j.tplants.2011.10.008.

King, E. O. *et al.* (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, pp.301-307

Kong, X. Y., Kissen, R. and Bones, A. M. (2012) 'Characterization of recombinant nitrile-specifier proteins (NSPs) of Arabidopsis thaliana: Dependency on Fe(II) ions and the effect of glucosinolate substrate and reaction conditions', *Phytochemistry*, 84, pp. 7–17. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.08.004.

Liu, J. *et al.* (2012) 'Genome-wide analysis uncovers regulation of long intergenic noncoding RNAs in arabidopsisC W', *Plant Cell*, 24(11), pp. 4333–4345. doi: 10.1105/tpc.112.102855.

Liu, X. *et al.* (2015) 'Long Non-coding RNAs and Their Biological Roles in Plants', *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13(3), pp. 137–147. doi: 10.1016/j.gpb.2015.02.003.

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression

data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Ma, L. *et al.* (2015) 'Angiosperms are unique among land plant lineages in the occurrence of key genes in the RNA-Directed DNA methylation (RdDM) Pathway', *Genome Biology and Evolution*, 7(9), pp. 2648–2662. doi: 10.1093/gbe/evv171.

Ma, L. *et al.* (2013) 'On the classification of long non-coding RNAs', *RNA Biology*, 10(6), pp. 924–933. doi: 10.4161/rna.24604.

Marra, R. *et al.* (2006) 'Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach', *Current Genetics*, 50(5), pp. 307–321. doi: 10.1007/s00294-006-0091-0.

Matzke, M. A. *et al.* (2015) 'RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants', *Annual Review of Plant Biology*, 66(1), pp. 243–267. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114633.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962) 'Murashige1962Revised.Pdf', *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 474–497.

Navarro, L. *et al.* (2006) 'A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling', *Science*, 312(5772), pp. 436–439. doi: 10.1126/science.1126088.

Nejat, N. y Mantri, N. (2018) 'Emerging roles of long non-coding RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses', *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(1), pp. 93–105. doi: 10.1080/07388551.2017.1312270.

Olmedo-Monfil, V. O. and Casas-Flores, S. (2014) Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture, Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. *Elsevier*. doi: 10.1016/B978-0-444-59576-8.00032-1.

Peláez, P. y Sanchez, F. (2013) 'Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: Similarities and differences', *Frontiers in Plant Science*, 4(SEP), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2013.00343.

Penninckx, A. M. A. *et al.* (1996) Pathogen-induced systemic activation of a

plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway, *The Plant Cell*, 8(December), pp. 2309–2323.

Pieterse, C. M. J. *et al.* (2009) 'Networking by small-molecule hormones in plant immunity', *Nature Chemical Biology*, 5(5), pp. 308–316. doi: 10.1038/nchembio.164.

Ponting, C. P., Oliver, P. L. y Reik, W. (2009) 'Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs', *Cell*, 136(4), pp. 629–641. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.006.

Popova, O. V. *et al.* (2013) 'The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in Arabidopsis', *Molecular Plant*, 6(2), pp. 396–410. doi: 10.1093/mp/sst023.

Pruss, G. J., Nester, E. W. y Vance, V. (2008) 'Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* induces host defense and development-dependent responses in the infiltrated zone', *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), pp. 1528–1538. doi: 10.1094/MPMI-21-12-1528.

Pumplin, N. y Voinnet, O. (2013) 'RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence', *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), pp. 745–760. doi: 10.1038/nrmicro3120.

Quinn, J. J. y Chang, H. Y. (2016) 'Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function', *Nature Reviews Genetics*, 17(1), pp. 47–62. doi: 10.1038/nrg.2015.10.

Ramirez-Prado, J. S. *et al.* (2018) 'Plant Immunity: From Signaling to Epigenetic Control of Defense', *Trends in Plant Science*, 23(9), pp. 833–844. doi: 10.1016/j.tplants.2018.06.004.

Ren, B. *et al.* (2019) 'Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation', *Science*, 365(6456), pp. 919–922. doi: 10.1126/science.aav8907.

Salas-Marina, M. A. *et al.* (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. doi: 10.1007/s10658-011-9782-6.

Salas-Marina, M. A. *et al.* (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(FEB), pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2015.00077.

Sánchez, A. *et al.* (2016) 'The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of *Arabidopsis*', *Plant Journal*, 88(3), pp. 361–374. doi: 10.1111/tpj.13252.

Seo, J. S. *et al.* (2017) 'ELF18-INDUCED LONG-NONCODING RNA associates with mediator to enhance expression of innate immune response genes in *Arabidopsis*', *Plant Cell*, 29(5), pp. 1024–1038. doi: 10.1105/tpc.16.00886.

Vinale, F. *et al.* (2008) 'Trichoderma-plant-pathogen interactions', *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.

Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A. (1999) 'The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), pp. 85–97. doi: 10.1006/pmpp.1999.0213.

Wierzbicki, A. T. (2012) 'The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing', *Current Opinion in Plant Biology*, 15(5), pp. 517–522. doi: 10.1016/j.pbi.2012.08.008.

Wilusz, J. E. *et al.* (2009) 'Long noncoding RNAs: Functional surprises from the RNA world', *Genes and Development*, 23(13), pp. 1494–1504. doi: 10.1101/gad.1800909.

Wittstock, U. y Burow, M. (2010) 'Glucosinolate Breakdown in *Arabidopsis*: Mechanism, Regulation and Biological Significance', *The Arabidopsis Book*, 8(8), p. e0134. doi: 10.1199/tab.0134.

Wittstock, U. *et al.* (2016) 'NSP-dependent simple nitrile formation dominates

upon breakdown of major aliphatic glucosinolates in roots, seeds, and seedlings of *Arabidopsis thaliana* Columbia-0', *Frontiers in Plant Science*, 7(DECEMBER2016), pp. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2016.01821.

Yuan, J. *et al.* (2016) 'Systematic characterization of novel lncRNAs responding to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*', *BMC Genomics*, 17(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12864-016-2929-2.

Zhang, H. *et al.* (2013) 'Long non-coding genes implicated in response to stripe rust pathogen stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Molecular Biology Reports*, 40(11), pp. 6245–6253. doi: 10.1007/s11033-013-2736-7.

Zheng, Y. *et al.* (2017) 'Comprehensive Transcriptome Analyses Reveal that Potato Spindle Tuber Viroid Triggers Genome-Wide Changes in', *Journal of Virology*, 91(11), pp. 1–18.

Zhu, Q. H. *et al.* (2014) 'Long noncoding RNAs responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis thaliana*', *New Phytologist*, 201(2), pp. 574–584. doi: 10.1111/nph.12537

Anexo 1

Cambio del casete de resistencia de pEarleyGate100, pEarleyGate101 y pEarleyGate104 por el método de mutagénesis Quick Change Site Directed Mutagenesis home edition

El sistema de clonación Gateway está basado en la recombinación sitio-específica del bacteriófago lambda con el fin de recombinar secuencias entre plásmidos con sitios compatibles. Los plásmidos de destino pEarleyGate (Earley, *et al*, 2006) contienen el gen *ccdB* que es letal para la mayoría de las cepas de *E. coli* y un marcador de resistencia a kanamicina, ambas características permiten una adecuada selección de colonias que contengan el plásmido deseado. El plásmido de entrada compatible con los pEarleyGate también contiene el marcador de resistencia a kanamicina (Earley, *et al*, 2006). Con la finalidad de facilitar la selección de colonias usando antibióticos, se realizó un cambio del marcador de resistencia de kanamicina a espectinomicina en los plásmidos pEarleyGate100, pEarleyGate101 y pEarleyGate104 utilizando el método Quick Change Site directed mutagenesis home edition.

El plásmido pEarleyGate100 (pEG100; 11,649pb), sirve para sobreexpresar ARNnc bajo el promotor 35S, pEarleyGate101 (pEG101; 12, 454pb) contiene YFP y una etiqueta HA en el extremo C terminal y el pEarleyGate104 (pEG104; 12,505pb) contiene YFP en el extremo N terminal (Fig. 10A) (Earley, *et al*, 2006). El plásmido pEG100 servirá para sobreexpresar los At_ARNp dentro de un sistema heterólogo y las secuencias del *NSP4* y *At_ARNnc1* serán introducidas en pEG104, para comprobar que los At_ARNp hacen blanco se espera ver una reducción en la cantidad de transcrito o proteína de YFP.

El cambio del marcador de resistencia de kanamicina (795 pb) por espectinomicina (792pb) se realizó por el método Quick Change Site directed

mutagenesis home edition, que consiste en eliminar el casete de resistencia inicial por medio de PCR. Para esto se diseñaron los oligonucleótidos (Tabla 3) con el programa QuikChange Primer Design[®] y se sintetizaron por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies). Los oligonucleótidos flanqueaban los extremos del marco de lectura abierto de kanamicina para que amplificaran todo el plásmido eliminando el casete de dicho antibiótico y fueron los mismos para los tres plásmidos debido a que en esa región su secuencia es idéntica (Fig. 10A). El marco de lectura abierto del casete secundario se amplificó del plásmido pBA-DC-myc (cortesía de la Dra. Catalina Arenas Huertero) que contenía la secuencia para espectinomicina (Fig. 10B), posteriormente se ligaron los dos productos de PCR con la DNA ligasa T4 (Thermo Scientific[™]) y se transformaron en *Escherichia coli* DB3.1. La selección de colonias positivas se realizó en medio LB con 50 µg/ml de espectinomicina. La secuencia de espectinomicina quedó bajo el promotor de kanamicina del vector original. Para confirmar la presencia del plásmido y la direccionalidad correcta de la nueva resistencia se realizó PCR con un oligonucleótido reverso que hibrida dentro de la secuencia del plásmido y con el oligonucleótido forward de la secuencia de espectinomicina (Fig. 10C y 11).

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para Quick Change

Secuencias	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)
pEARLEYGATE	TTATTATTTTCCTTCCTCTTTTCTACAGTAT TTAAAGATACCCC	TAGTACCTAGAATGCATGACCAA AATCCC
Casete de espectinomicina	TTATTTGCCGACTACCTTGGTGATCTCGC	ATGGGGGAAGCGGTGATCGC
pEG direccionalidad	TGCCTGTGATCACCGCG	

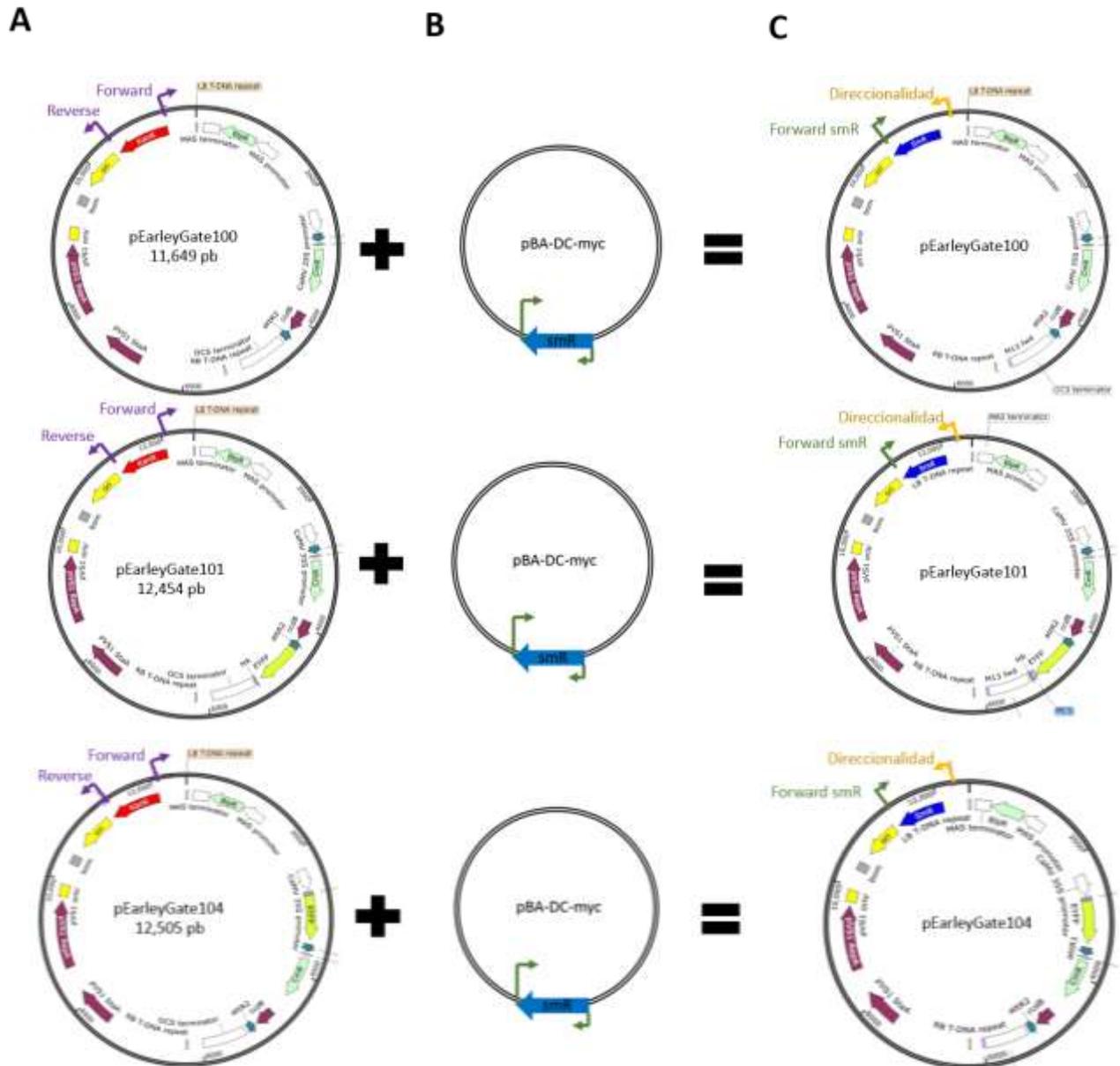


Fig. 10. Cambio del casete de resistencia de pEarleyGate100, pEarleyGate101 y pEarleyGate104 por el método de mutagénesis Quick Change Site Directed Mutagenesis home edition.

Mapa de los plásmidos parentales pEG100, pEG101 y pEG104 donde las flechas moradas representan la ubicación de los oligonucleótidos usados para amplificar el plásmido completo y en color rojo el marco de lectura abierto de kanamicina (A). Plásmido pBA-DC-myc (cortesía de la Dra. Catalina Arenas Huertero), en color azul el marco de lectura abierto de espectinomicina, las flechas verdes representan la posición de los oligonucleótidos (B). Plásmidos pEG100, pEG101 y pEG104 con el nuevo casete de resistencia, el oligonucleótido reverso usado para confirmar la correcta

posición del casete de espectinomycinina se muestran en naranja junto con el oligonucleótido forward de espectinomycinina en verde (C).

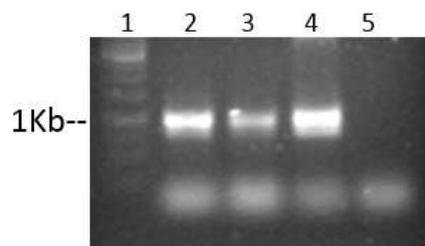


Fig. 11. Confirmación de la presencia de los plásmidos pEarleyGate100, 101 y 104 con el casete de resistencia de espectinomycinina.

La PCR se realizó con el oligonucleótido *forward* del casete de espectinomycinina y el oligonucleótido *reverse* que hibridaba dentro del plásmido, el producto esperado fue de 990 pb. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1**, Marcador de peso molecular de 1Kb; **2**, pEarleyGate100; **3**, pEarleyGate103; **4**, pEarleyGate104; **5**, Control negativo de PCR

Referencia

Earley, K. W. *et al.* (2006) 'Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics', *Plant Journal*, 45(4), pp. 616–629. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x.