



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

“Infiriendo redes de coexpresión de genes de
Arabidopsis thaliana durante su interacción con
Trichoderma spp.”

Tesis presentada por
Javier David Vega Arroy

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la tesis
Dr. J. Sergio Casas Flores
Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez

San Luis Potosí, S.L.P., octubre del 2024



Constancia de aprobación de tesis

La tesis “**Infiriendo redes de coexpresión de genes de *Arabidopsis thaliana* durante su interacción con *Trichoderma spp.*”**” presentada para obtener el grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Javier David Vega Arroy** y aprobada el día 29 de **octubre del 2024** 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

Codirector de tesis

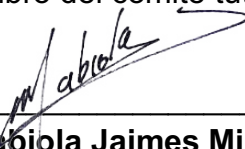
Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez

Codirector de tesis



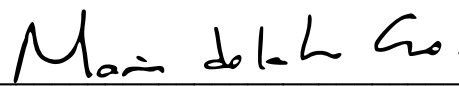
Dr. Antonio de León Rodríguez

Miembro del comité tutorial



Dra. Fabiola Jaimes Miranda

Miembro del comité tutorial



Dra. María de la Luz Guerrero González

Miembro del comité tutorial



Créditos Institucionales

Este proyecto fue elaborado en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular (DBM) y el Laboratorio de Bioinformática e Inteligencia Artificial del Centro Nacional de Supercómputo (CNS) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de Dr. J. Sergio Casas Flores y Dr. Cesaré Moisés Ovando Vázquez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) con el número de registro 763150.

Durante la realización del trabajo; este proyecto recibió apoyo del proyecto Fronteras de la Ciencia FC-2016-1-1538 otorgados al Dr. J. Sergio Casas Flores.

Agradecimientos

A mis padres Javier Vega Rodríguez y María de la Cruz Arroy Gonzales por enseñarme el valor del trabajo, promover mi sueño para ser científico y por dirigirme siempre por el buen camino.

A mi abuelo Gregorio Arroy Solís, gracias viejo por los buenos consejos de vida.

A toda mi familia y a mi novia por todo el cariño expresado.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez, a la Dra. Fabiola Jaimes Miranda, a la Dra. María de la Luz Guerrero González, quienes formaron parte del comité evaluador, por su tiempo y sus acertadas sugerencias y aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Saul Jijón Moreno por el apoyo técnico, por sus asesorías y consejos durante el desarrollo del presente trabajo.

Al IPICYT por abrir las puertas de la institución para continuar con mi formación.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Estrés en plantas	2
Resistencia local	3
Resistencia sistémica adquirida (SAR, de sus siglas en inglés <i>acquired systemic resistance</i>)	4
Resistencia sistémica inducida (ISR, de sus siglas en inglés <i>induced systemic resistance</i>)	6
<i>Trichoderma</i> como organismo benéfico	8
Hipoxia en las plantas	9
La era de las ciencias ómicas	11
Transcritómica	11
Redes de coexpresión	12
Justificación	13
Objetivos	14
Metodología	15
Discusión de resultados	18
“infiriendo redes de coexpresión de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> durante su interacción con <i>Trichoderma</i> spp.”	18
Conclusiones	33
Bibliografía	35
Anexos	44

Lista de figuras

Figura 1. Resistencia Sistémica Adquirida (SAR).	5
Figura 2. Resistencia Sistémica Inducida (ISR).	8
Figura 3. Análisis de expresión diferencial.	21
Figura 4. Análisis de enriquecimiento de ontología genética.	23
Figura 5. Análisis diferencial de redes.	25
Figura 6 Comunidades de la red de genes de co-expresión <i>A. thaliana</i> (<i>T.atroviride</i>).	27
Figura 7. Comunidades de la red de genes de co-expresión <i>A. thaliana</i> (<i>T.virens</i>).	29
Figura 8. Validación del transcriptoma.	31
Figura 9. Propuesta de esquema de trabajo.	33

Abreviaturas

PAMP	De sus siglas en inglés, Pathogen-associated molecular pattern
PWM	De sus siglas en inglés position weight matrixl
BP	De sus siglas en inglés biological process
WT	De sus siglas en inglés wild-type
PR	De sus siglas en inglés Pathogenesis-related
ETS	De sus siglas en inglés effector-triggered susceptibility
NB-LRR	De sus siglas en inglés nucleotide binding-leucine rich repeat
PTI	De sus siglas en inglés immunity triggered PAMPs
ROS	De sus siglas en inglés reactive oxygen species
PRR	De sus siglas en inglés Pattern-recognition receptors
Pip	De sus siglas en inglés pipecolic acid
AzA	De sus siglas en inglés azelaic acid
G3P	De sus siglas en inglés glycerol-3-phosphate
SAR	De sus siglas en inglés acquired systemic resistance
ISR	De sus siglas en inglés induced systemic resistance
MAMPs	De sus siglas en inglés microorganisms -associated molecular pattern

Resumen

“Infiriendo redes de coexpresión de genes de *Arabidopsis thaliana* durante su interacción con *Trichoderma* spp.”

La interacción planta-*Trichoderma* se ha estudiado desde hace unas décadas debido a que el hongo promueve el crecimiento vegetal y estimula dos tipos de resistencia sistémica que vuelven a la planta resistente contra el ataque de patógenos; 1) la resistencia sistémica inducida relacionada con las vías de señalización del ácido jasmónico/etileno y 2) la resistencia sistémica adquirida vinculada con las vías de señalización del ácido salicílico. Además, se ha observado que después de interaccionar con *Trichoderma* las plantas generan resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico como sequía, altas concentraciones salinas y altas temperaturas, por mencionar algunos. Sin embargo, falta esclarecer como trabajan las vías de señalización en la planta después de ser inoculadas con *Trichoderma* que le permiten responder con cierta resistencia a futuras situaciones de estrés biótico y/o abiótico. Para poder abordar esta problemática de manera integral analizamos el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* después de interaccionar con *T. virens* o *T. atroviride* y en condiciones control (sin interacción). Para este propósito realizamos un análisis transcriptómico convencional y un análisis mediante redes de coexpresión. No encontramos efecto en la inducción de genes cuando se compararon los genes inducidos por ambas especies (p -val 0.055) sugiriendo que ambas especies de *Trichoderma* generan una respuesta en la planta de manera equiparable. El análisis de enriquecimiento y ontológico corrobora lo reportado en la literatura, se observaron procesos enriquecidos como: proceso metabólico de camalexinas (GO:0052317), respuesta a ácido salicílico (GO:0009751), respuesta al ácido jasmónico (GO:0009753) y la respuesta a hipoxia (GO:0071456). A partir de un análisis de coexpresión de redes hipotetizamos que los mecanismos de defensa de la planta pueden estar relacionados con algunos mecanismos hipóxicos. Identificamos un factor de transcripción ERF071 que es necesario para responder a la hipoxia y podría tener un papel secundario en los mecanismos de defensa de la planta contra patógenos.

Palabras clave: Hipoxia, transcriptómica, redes de coexpresión, resistencia sistémica, análisis de enriquecimiento.

Abstract

“Inferring gene co-expression networks of *Arabidopsis thaliana* during its interaction with *Trichoderma* spp.”

The plant-*Trichoderma* interaction has been studied for a few decades because the fungus promotes plant-growth and stimulates two types of systemic resistance that make the plant resistant against pathogen attack; induced systemic resistance linked to jasmonic acid/ethylene signaling pathways and acquired systemic resistance linked to salicylic acid signaling pathways. Furthermore, it has been observed that after interacting with *Trichoderma*, plants generate resistance to different types of abiotic stress such as drought, high saline concentrations, high temperatures, etc. However, it remains to be clarified how the signaling pathways work in the plant after being inoculated by *Trichoderma* allows it to respond with certain resistance to future situations of biotic and/or abiotic stress. To address this problem comprehensively, we analyzed the transcriptome of *Arabidopsis thaliana* after interacting with *T. virens* or *T. atroviride* and under control conditions (without interacting). For this purpose we performed a conventional transcriptomic analysis and an analysis using co-expression networks. We found no effect on gene induction when the genes induced by both species were compared (p -val 0.055), suggesting that both *Trichoderma* species generate a response in the plant in a comparable manner. The enrichment and ontology analysis corroborates what was reported in the literature when enriched processes were observed such as: metabolic process of camalexins (GO:0052317), response to salicylic acid (GO:0009751) and response to jasmonic acid (GO:0009753). From a network co-expression analysis, we hypothesized that plant defense mechanisms may be related to some hypoxic mechanisms. We identified a transcription factor ERF071 that is necessary to respond to hypoxia and could play a secondary role in plant defense mechanisms against pathogens. When we worked with the *erf071* mutant we observed that it was sensitive to hypoxia using a dip hypoxia assay. We also observed that inoculation with *Trichoderma* promoted resistance against hypoxia. Subsequently, with a pathogen challenge test using *B. cinerea*, we observed that *erf071* failed to trigger resistance against the pathogen despite previously interacting with *Trichoderma*. The opposite phenotype was observed in the wild-type where the interaction with *Trichoderma* generated resistance against *B. cinerea*.

Keywords: Hypoxia, transcriptomics, co-expression networks, systemic resistance, enrichment analysis.

Introducción

Podemos definir a las plantas como organismos sésiles cuyas células poseen paredes celulares compuestas por celulosa y que poseen la maquinaria necesaria para realizar la fotosíntesis (Keeling., 2004; Bowles et al., 2023).

En la naturaleza, las plantas cohabitan con una gran diversidad de organismos como bacterias, arqueas, hongos, animales herbívoros y otras plantas; de tal manera que constantemente forman diferentes tipos de asociaciones. Estas interacciones simbióticas se pueden clasificar en mutualismo, comensalismo y parasitismo (Relman, D.A., 2008; Leung & Poulin.,2008).

Las plantas como organismos sésiles han evolucionado para responder a los factores bióticos y abióticos mediante la reprogramación de su expresión génica (Gull et al., 2019), de tal manera que las plantas deben ajustar su metabolismo, su desarrollo y su reproducción para mitigar o contrarrestar los efectos negativos del estrés.

En particular, el estrés biótico priva directamente al hospedero de sus nutrientes, genera daño en los tejidos y si no es contrarrestado de manera adecuada puede desencadenar la muerte del hospedero (Gull et al., 2019). Por otra parte, existen microorganismos mutualistas que al interactuar con la planta desencadenan efectos positivos como una mejora en la absorción de los nutrientes, la promoción del crecimiento vegetal y la resistencia contra organismos patógenos (Rodríguez et al., 2019).

Las plantas responden a los microorganismos al reconocer moléculas conservadas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, siglas en inglés, *Pathogen-associated molecular pattern*) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, de sus siglas en inglés *microorganisms -associated molecular pattern*) (Jones & Dangl, 2006). Se ha reportado que las vías de señalización de la respuesta inmune en las plantas después de interactuar con patógenos u organismos benéficos tienen puntos de convergencia, pero no está claro qué factores determinan que la planta distinga entre ambos y se establezca una relación mutualista o de parasitismo (Rodríguez et al., 2019).

Se han propuesto metodologías para entender las relaciones planta-microorganismo a partir de la implementación de las ciencias ómicas, herramientas bioinformáticas y el uso de datos masivos (Aizat et al., 2018; Rodríguez et al., 2019). Al combinar el conocimiento biológico, con los datos experimentales y el modelado computacional se puede llegar a comprender mejor los mecanismos de interacción entre organismos (Karlebach & Shamir, 2008).

Particularmente, la transcriptómica es una herramienta que proporciona información sobre la expresión génica de un organismo. Esta metodología se basa en la purificación y caracterización de moléculas de ARN mensajeros que participan en un proceso celular específico bajo un estímulo determinado (Wirthmueller et al., 2013). Debido a la gran información que nos proporciona la transcriptómica, recientemente se ha empleado esta técnica como una estrategia ampliamente utilizada para descifrar las interacciones ecológicas entre organismos de diferentes reinos.

El análisis de redes de coexpresión, a partir de datos transcriptómicos, ha resultado ser una buena metodología para el análisis de expresión génica debido a la integración de variables que nos pueden evidenciar relaciones funcionales a partir de los patrones de expresión (Tzfadia et al., 2016; Ballouz et al 2015). Una asociación génica implica que dos o más genes comparten una relación funcional ya sea que estén involucrados en el mismo proceso biológico; o que estén involucrados en vías compensatorias con función aparente no relacionada. En otras palabras, una coexpresión génica potencialmente podría evidenciar una relación biológica funcional (Boucher & Jenna, 2013).

Estrés en las plantas

El estrés se define como una condición desfavorable o atípica que tenga como resultado alteraciones en el metabolismo o el desarrollo del individuo (Lichtenthaler, H. K., 1998). En la naturaleza, las plantas están sometidas constantemente a factores abióticos y bióticos los cuales pueden desencadenar estrés. El estrés abiótico es provocado por factores fisicoquímicos como la temperatura, la salinidad, la humedad, la cantidad y la calidad de luz, por mencionar algunos (Gull et al., 2019; Rejeb et al., 2014). Por otro lado, se define al estrés biótico como cualquier alteración causada por algún otro organismo vivo o entidad biológica como los virus (Gull et al., 2019; Rejeb et al., 2014).

Lichtenthaler (1998), menciona que existen notables diferencias entre el estrés a corto y largo plazo además de estrés moderado y estrés intenso; ya que, según sea el tipo de estrés, las plantas responden mediante diferentes mecanismos. Generalmente, el estrés abiótico moderado está determinado por el ambiente donde se desarrollan las plantas y no siempre culmina en la muerte ya que algunas plantas que son sometidas a algún tipo de estrés abiótico llegan aclimatarse (Verma et al., 2013). Por otra parte, el estrés biótico priva directamente al huésped de sus nutrientes, genera daño a los tejidos vegetales y si no es contrarrestado por la planta de manera adecuada, termina en la muerte del hospedero ya que, el estrés biótico generalmente es grave y de tiempo prolongado. Cuando el estrés es grave excede los límites de tolerancia de la planta sobrecargando su capacidad de adaptación y

como resultado se genera un daño permanente o termina en la muerte del huésped (Gull et al., 2019; Lichtenthaler, H. K., 1998).

Estas tensiones denominadas conjuntamente como estrés pueden desencadenar en la planta, la reprogramación de la expresión génica, cambios en el metabolismo celular, cambios en la asimilación de dióxido de carbono (CO₂), alteraciones en la fase vegetativa y fase reproductiva (Gull et al., 2019; He et al., 2018; Zinta et al., 2016).

Con la finalidad de mitigar los daños causados por factores bióticos, las plantas han desarrollado diferentes barreras de defensa que incluyen mecanismos físicos, químicos e inmunes (Nishad et al., 2020; Gull et al., 2019; He et al., 2018; Jones & Dangl., 2006). Dentro de las barreras físicas podemos mencionar la formación de la cutícula cerosa, engrosamiento de la pared celular, la presencia de espinas, estomas y tricomas. En contraste las barreras químicas incluyen la síntesis de compuestos que pueden ser tóxicos para los atacantes o pueden atraer a los antagonistas naturales de los atacantes de las plantas. Estos compuestos son de naturaleza química muy variada como terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, antibióticos, pequeños péptidos, etc. (Chaudhary et al., 2018; Li et al., 2020; Ziv et al., 2018).

La respuesta inmune de las plantas ocasionada por el estrés biótico se puede clasificar en respuesta local o respuesta sistémica (Kamle et al., 2020; Jones & Dangl, 2006). La respuesta local depende de la inmunidad innata de cada célula y se desencadena en el sitio de la infección (Jones & Dangl, 2006). Por el contrario, existen dos tipos de resistencia sistémica; la resistencia sistémica inducida (ISR, de sus siglas en inglés, *Induced Systemic Resistance*) y la resistencia sistémica adquirida (SAR, de sus siglas en inglés *Acquired Systemic Resistance*) ambas caracterizadas por la participación de señales químicas que emanan de los sitios de infección y viajan hacia tejidos distales o a otras plantas para anticipar una respuesta inmune antes de ser atacadas por los patógenos (Jones & Dangl, 2006; Ausubel, 2005; Chisholm et al., 2006; Riedlmeier et al., 2012; Dempsey & Klessig et al 2012).

Resistencia local

Los MAMPs/PAMPs presentes en los microorganismos actúan como ligandos específicos para receptores transmembranales ubicados en la membrana celular de las plantas. Estas proteínas receptoras se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR, de sus siglas en inglés *Pattern-recognition receptors*) (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2009). Esta interacción entre ligando-receptor induce respuestas celulares como la respuesta transcripcional rápida, un reajuste de

moléculas redox y la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés *reactive oxygen species*), lo que finalmente desencadena una respuesta inmune en la planta conocida como inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, de sus siglas en inglés *PAMPs triggered immunity*) (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, C., 2009). Esta comunicación entre reinos se debe a un complejo y delicado proceso de coevolución sujeto a la selección natural (Jones & Dangl, 2006; Cummins et al., 2017; Gouveia et al., 2017).

Algunos microorganismos poseen moléculas conocidas como efectores con la capacidad de suprimir la inmunidad de la planta, lo que da como resultado la susceptibilidad activada por efectores (ETS, de sus siglas en inglés *effector-triggered susceptibility*) (Jones & Dangl, 2006; Ramírez-Valdespino et al., 2019). Las moléculas efectoras pueden ser reconocidas por receptores citoplasmáticos de las plantas conocidos como receptores de unión a nucleótidos y de repeticiones ricas en leucina (NB-LRR, de sus siglas en inglés nucleotide binding-leucine rich repeat). Las proteínas NB-LRR pueden reconocer efectores de patógenos de diferentes reinos y activan una segunda respuesta de defensa conocida como inmunidad activada por efectores (ETI, de sus siglas en inglés *effector-triggered immunity*) lo que comúnmente desencadena la muerte celular en el sitio infectado; por esta razón la ETI es eficaz contra patógenos biotróficos (organismo que viven en relación con el hospedero) pero no contra los patógenos necrotróficos; ya que estos últimos obtienen nutrientes a partir de células muertas. Este mecanismo de zigzag de la defensa de la planta fue propuesto por Jones & Dangl (2006) y se conoce como modelo coevolutivo de resistencia/susceptibilidad.

Resistencia sistémica adquirida (SAR, de sus siglas en inglés *acquired systemic resistance*)

Las plantas después de ser atacadas por organismos patógenos desarrollan un tipo de resistencia contra ataques posteriores en tejidos distales. Este tipo de resistencia mejorada se conoce como SAR y se sabe que es eficaz para evadir microorganismos biótrofos/hemi-biótrofos (Conrath, U., 2006). Generalmente la SAR es desencadenada por patógenos, aunque también se ha reportado la inducción de SAR por especies benéficas asociadas a la raíz como *Trichoderma* spp. (Frías et al., 2013; Govrin & Levine., 2002; Nawrocka & Małolepsza., 2013). La SAR se caracteriza por una acumulación de ácido salicílico (SA, de sus siglas en inglés *salicylic acid*) por la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), la movilidad de moléculas como el glicerol-3-fosfato (G3P), el ácido azelaico (AzA) y la señalización de lípidos. En conjunto estos factores sensibilizan a la planta para responder más eficaz y rápidamente contra ataque

posteriores (Malamy et al., 1990; Maldonado et al., 2002; Kachroo et al., 2020; Kachroo et al., 2022).

El SA es esencial durante el estrés en las plantas. Se han propuesto dos vías biosintéticas del SA en plantas una citosólica y la otra cloroplástica, sin embargo, ambas empiezan con el corismato como precursor (Chen et al., 2009). Se ha reportado que en *Arabidopsis thaliana* las vías de señalización del SA son activadas por la proteína receptora NPR1 (No expresor de genes PR-1) (Liu et al., 2020). NPR1 es un coactivador transcripcional de genes relacionados con la patogénesis (PR, de sus siglas en inglés *pathogenesis related*). Tras la acumulación de SA, NPR1 se transloca al núcleo donde interactúa con factores de transcripción de dominio básico/cremallera Leu (bZIP)(TGA) para activar la respuesta SAR (Spoel et al., 2003; Weigel et al., 2005; Chen et al., 2019). El tránsito de moléculas móviles en la planta es importante para desencadenar la SAR. Algunas de estas moléculas viajan por el floema de la planta para transmitir la señal sistémica (Park et al., 2007; Singh et al., 2017). Otras como el MeSA se presentan en estado gaseoso y se transmiten por el aire para promover la SAR en tejidos distales o en otras plantas vecinas (Shulaev et al., 1997) (Figura 1).

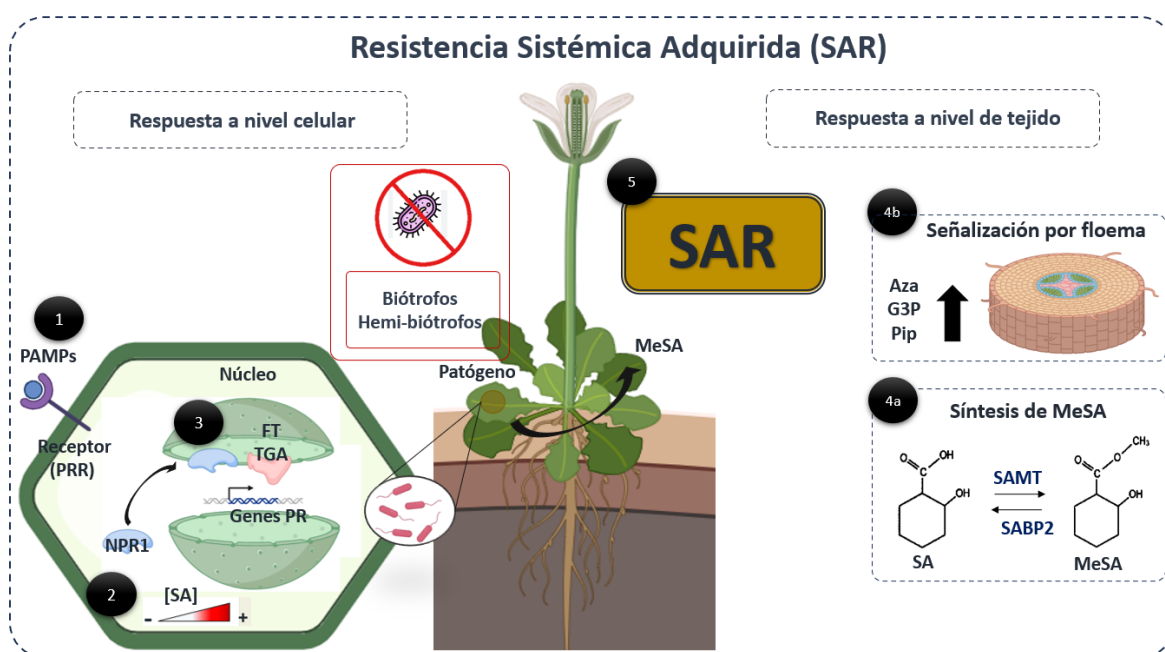


Figura 1. Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). 1 Punto de infección inicial en tejido foliar por el patógeno y reconocimiento de este a través de la interacción entre PRR y PAMPs. 2. Acumulación de SA 3. Tras la acumulación de SA, NPR1 se transloca al núcleo donde interactúa con los factores de transcripción (bZIP)(TGA) para activar la respuesta SAR. 4a. Cuando la concentración de SA llega a cierto umbral se induce SAMT una enzima que convierte el SA en éster metílico (MeSA)

un compuesto volátil que se transmite por el aire para activar SAR en tejidos distales. 4b También se ha reportado la participación del floema para transportar moléculas no volátiles y activar SAR en tejidos distales.

Resistencia sistémica inducida (ISR de sus siglas en inglés *induced systemic resistance*)

La ISR es un mecanismo por el cual la planta mejora de manera sistémica la resistencia contra fitopatógenos necrotróficos e insectos herbívoros. Este mecanismo se desencadena después de que la planta interacciona con grupos específicos de bacterias, oomicetos y/u hongos considerados como beneficios mutualistas (Pieterse et al., 2014; Romera et al., 2019). Los organismos que logran inducir la ISR se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR de sus siglas en inglés *Plant growth-promoting rhizobacteria*) para todos aquellos microorganismos que pertenecen al reino bacteria y los que pertenecen al reino fungi se denominan hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF de sus siglas en inglés *Plant growth-promoting fungi*). Los PGPR y PGPF viven en comunidades cercanas a las raíces vegetales, área denominada como rizosfera. La rizosfera es una zona muy dinámica donde constantemente ocurre una transferencia de masa y energía por lo cual es considerada como una zona de interés para el estudio de la ecología trófica. Dentro de los microorganismos PGPR podemos mencionar algunas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*; mientras que *Trichoderma* y hongos micorrizicos son algunos ejemplos de PGPF (Pieterse et al., 2014; Romera et al., 2019).

Después de la colonización de las raíces vegetales por los organismos benéficos, se desencadena un reajuste hormonal en la planta donde el JA/ET (de sus siglas en inglés *jasmonic acid / ethylene*) tienen un papel predominante independiente a la señalización del SA (Pieterse et al., 1996; Pieterse et al., 1998; Ahn et al., 2007). Además del papel de las hormonas la ISR se caracteriza por la expresión de genes que usualmente se usan como marcadores para esta vía de señalización como *PDF1.2* y *LOX2*, debido a que se ha observado su expresión después de que la célula vegetal reconoce un PAMPs/MAMPs (Cao et al., 1997). *PDF1.2* codifica para una defensina vegetal, la cual se acumula en tejidos foliares después de la interacción planta-microorganismo.

Manners et al. (1998) reportó que la secuencia promotora de *PDF1.2* responde al JA pero no al SA cuando usaron como gen reportero β -glucuronidasa (GUS). Estas observaciones son congruentes con el hecho de que el JA y SA se rigen por distintas vías de señalización. Por otra parte, *LOX2* codifica para una lipooxigenasa que cataliza la hidroperoxidación de lípidos que contienen una estructura cis,cis-1,4-

pentadieno. *LOX2* puede usar como sustrato el ácido linoleico e iniciar la vía de síntesis del JA (Bell et al., 1995; Bannenberg et al., 2009).

Se ha reportado que en *A. thaliana* la señalización del JA está regulada con precisión por el factor de transcripción MYC2. MYC2 interacciona con el extremo C-terminal de la proteína represora dominio jasmonato-zim (JAZ). En estado de reposo MYC2 y JAZ forman una interacción proteica que bloquea parcialmente la cascada de señalización de JA. Sin embargo, en presencia del conjugado Ja-iso-leucina (JA-Ile) se rompe dicha interacción y MYC2 pasa a un estado activo (Wu et al., 2020; Song et al., 2022). Suza & Staswick (2008) reportaron que el componente con mayor actividad biológica funcional es el conjugado JA-Ile; el cual es sintetizado por la enzima JASMONATE RESISTANT 1 (JAR1) que a su vez es dependiente de adenosín trifosfato (ATP). Cuando se acumula una gran cantidad de JA-Ile en el citosol celular, el transportador JAT1/AtABCG16 facilita el transporte de Ja-Ile hacia el núcleo donde interactúa con JAZ para degradarlo a través del proteosoma 26S (Li et al., 2017) liberando así a MYC2 (Figura 2).

Además de ser un regulador central de la señalización del SA, NPR1 también desempeña una importante función en la señalización del JA (Spoel et al., 2003). NPR1 interactúa con miembros de la familia TGA/OBF de factores de transcripción bZIP, que se ha demostrado se unen específicamente al motivo TGACG en los promotores diana, regulando así la transcripción genética (Zhou et al., 2000). Los genes *LOX2*, *VSP* y *PDF1.2* que responden a JA contiene en uno o más motivos TGACG en sus promotores, este hecho sugiere la represión de estos genes causada por NPR1 lo cual podría explicar el comportamiento antagónico entre el JA y el SA (Spoel et al., 2003).

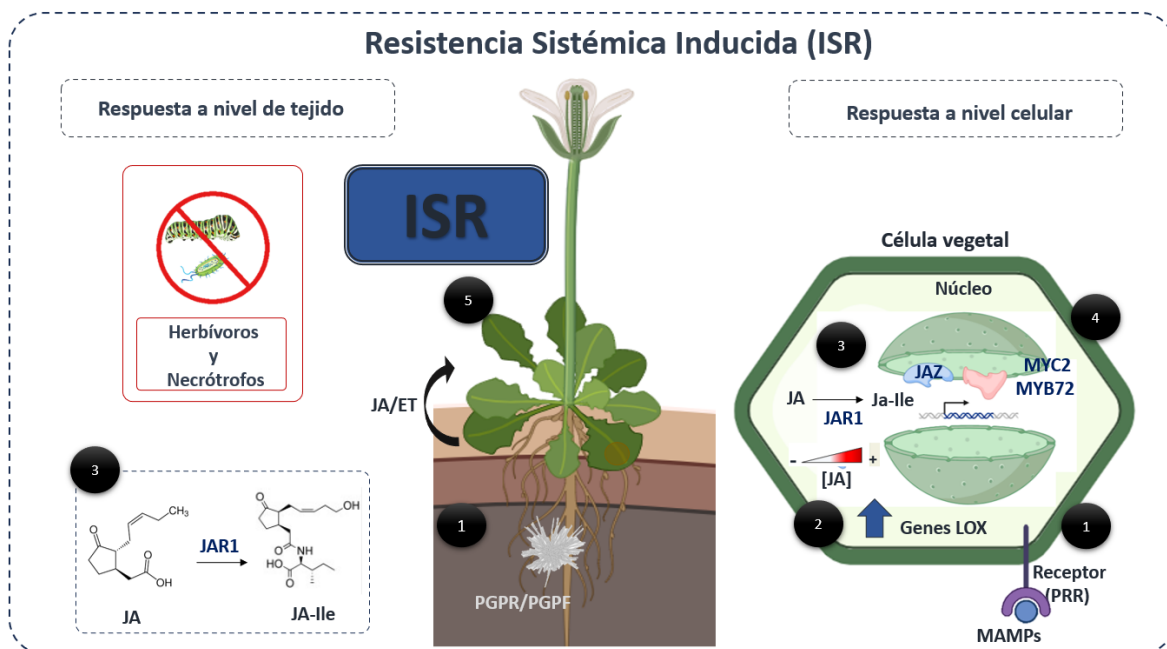


Figura 2. Resistencia Sistémica Inducida (ISR). 1 Los PGPR/PGPF interaccionan con la raíz de la planta huésped y se produce el reconocimiento a través de la interacción entre PRR y MAMPs. 2. La interacción entre PRR y MAMPs induce la expresión de genes LOX los que intervienen en la síntesis de JA. 3 Tras la acumulación de JA la enzima JAR1 sintetiza el conjugado Ja-Ile. 4. El conjugado JA-Ile se transloca al núcleo e interacciona con el represor JAZ para liberar a MYC2. El factor de transcripción MYC2 junto con MYB72 activan la respuesta ISR. La señal sistémica que desencadena la ISR en los tejidos distales está relacionada con la transducción de señales del JA/ET

***Trichoderma* como organismo benéfico**

En décadas recientes investigaciones científicas se han enfocado en el estudio de las interacciones benéficas debido a las implicaciones que éstas tienen y sus potenciales aplicaciones en la agricultura (Bhattacharyya & Jha., 2012). Dentro de los organismos benéficos mutualistas más estudiados se encuentra a los hongos filamentosos y cosmopolitas del género *Trichoderma*.

Trichoderma spp. son considerados agentes de biocontrol debido a su capacidad de antagonizar patógenos en la rizosfera, además un bioestimulante por promover el crecimiento de las plantas. Algunos mecanismos reportados que *Trichoderma* usa para antagonizar a los fitopatógenos son la síntesis de compuestos antibióticos, el micoparasitismo, y la competición por el espacio y los nutrientes (Pal & Gardener, 2006; Tyśkiewicz et al., 2022).

Existen reportes de la inducción de la SAR y la ISR en plantas después de ser colonizadas por algunas especies del género *Trichoderma* a pesar de que estas rutas se consideran antagónicas debido a la diafonía de las hormonas (JA/ET, SA) (Salas-Marina et al., 2011; Salas-Marina et al., 2015; Shores et al., 2010; Harman et al., 2004; Adnan et al., 2019). Salas-Marina et al (2011) observaron que plantas de *A. thaliana* inoculadas con *T. atroviride* se volvieron resistentes contra la bacteria hemibiotrófica *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 y el hongo necrotrófico *B. cinérea*. Además, observaron la inducción de los genes *PR-1a* y *PR-2* involucrados en la SAR. Del mismo modo observaron la inducción de *PDF1.2* y *LOX-1* relacionados con la ISR. Este reporte muestra la inducción y modulación de la SAR y la ISR por *Trichoderma* para evadir y contrarrestar futuros ataques por patógenos sin importar su estilo de vida.

Además de conferir resistencia contra patógenos, se ha reportado que *Trichoderma* logra aliviar el estrés abiótico en las plantas (Zaidi et al., 2014). Rawal et al. (2022) reportaron que la cepa de *Trichoderma asperelloides*-NT33 confería resistencia al estrés por déficit de agua en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) después de su inoculación. Otros estudios han reportado la resistencia contra bajas temperaturas en *S. lycopersicum* después de haber interactuado con *T. asperellum* (Cornejo-Ríos et al., 2021). Finalmente, se ha observado la tolerancia a la salinidad en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) después de su interacción con *T. atroviride* HN082102.1 (Zhang et al., 2022). En el presente estudio encontramos que *T. atroviride*(IMI206040) logró desencadenar la resistencia contra la hipoxia (déficit de oxígeno (O₂)). Además, hipotetizamos que la resistencia a la hipoxia se relaciona a nivel funcional con la respuesta de defensa de la planta contra los patógenos a través de la inducción de un factor de transcripción de la familia VII de respuesta a etileno (ERF-VII) (Vega-Arroy et al., 2024)

Hipoxia en las plantas

Las plantas son organismos aerobios que necesitan oxígeno para la respiración y su metabolismo energético. La hipoxia es un estado de deficiencia de oxígeno que, cuando las plantas detectan esta condición se adaptan modificando el crecimiento y el metabolismo (Loreti & Perata., 2020). En la naturaleza, las plantas experimentan hipoxia durante lluvias excesivas o en suelos inundados, lo que resulta en una disminución de la concentración de oxígeno en la rizosfera (Loreti & Perata., 2020). Se sabe que los factores de transcripción de la familia VII de respuesta al etileno (ERF-VII) disminuyen el estrés por hipoxia en las plantas (Giuntoli & Perata., 2018; Loreti & Perata., 2020). Por ejemplo, algunos tipos de arroz se han adaptado a la hipoxia gracias a factores de transcripción conocidos como “snorkels” que responden al etileno, permitiéndoles adaptar su crecimiento en ausencia de O₂

(Nagai et al., 2022). En *A. thaliana* el oxígeno controla la estabilidad de las proteínas pertenecientes a la familia ERF-VII (Zubrycka et al., 2023; White et al., 2018; Loreti & Perata., 2023).

Los ERF-VII son factores de transcripción caracterizados por un residuo de cisteína (Cys) en su extremo amino terminal (N-terminal). En condiciones normales de oxígeno la Cys se oxida constitutivamente por una clase de enzimas llamadas cisteína oxidasas de plantas (PCO). Cuando la Cys es oxidada, los ERF-VII son degradados por el proteasoma (Weits et al., 2014). Bajo condiciones de hipoxia los ERF-VII son estables dado que el déficit de oxígeno impide la oxidación del residuo Cys, por lo que los ERF-VII se translocan al núcleo donde activan la transcripción de genes anaeróbicos (Gasch et al., 2014). Hinz et al. (2010) observaron que el factor de transcripción RAP2.2 (*At3g14230*) de *A. thaliana* era necesario para hacer frente a la hipoxia. La sobreexpresión de *RAP2.2* dio como resultado una mejor supervivencia de las plantas bajo estrés por hipoxia, mientras que las líneas que contenían la versión mutante del gen presentaron tasas de supervivencia más bajas que las líneas silvestres (WT) (Hinz et al., 2010). El ERF074 (*At1g53910*) con una cisteína N-terminal es necesario para mitigar la hipoxia. ERF074 es blanco de las proteínas PCO1 y PCO2 para su posterior degradación en condiciones de normoxia; en ausencia de O₂ ERF074 se acumula en el núcleo donde induce genes de respuesta a la hipoxia como el gen *ADH1* (Licausi et al., 2011; Weits et al., 2014).

En la naturaleza, cualquier proceso biológico es el resultado de un complejo mecanismo de asociación e interconexión de genes que trabajan juntos para responder a una necesidad fisiológica. Algunos autores han propuesto que la hipoxia pudiera desencadenar la resistencia contra patógenos en las plantas, sugiriendo así vías de señalización cruzada entre la hipoxia y la activación del sistema inmunológico (Tang & Liu., 2021).

En resultados previos, a partir de un transcriptoma y un análisis de redes de coexpresión génica hipotetizamos que el locus *At2G47520* inducido por *T. atroviride* y/o *T. virens* puede tener un papel dual mitigando la hipoxia y de manera directa o indirecta modifica la expresión de genes relacionados con la defensa (Vega-Arroy et al., 2024). El locus *At2G47520* codifica para un factor de transcripción ERF071 el cual tiene el dominio proteico de interés AP2/ERF y una cisteína N-terminal que es blanco de las PCO. El dominio AP2/ERF es de unión a DNA que potencialmente se une a la secuencia promotora GCC-box conocida por estar presente en genes involucrados en la resistencia a patógenos en *A. thaliana* (Brown et al., 2003; Gutterson & Reuber., 2004).

La era de las ciencias ómicas

El hecho de que *Trichoderma* spp. estimule y prepare a las plantas contra futuros desafíos bióticos y abióticos sugiere un complejo mecanismo de respuesta por parte de la planta hacia su simbionte asociado. A pesar de existir una gran cantidad de estudios científicos sobre la interacción planta-*Trichoderma* desde hace algunas décadas, hace falta integrar la información que nos lleve a dilucidar las complejas vías de señalización entrecruzadas en la planta que le permiten adaptarse al estrés y sobrevivir. Con el desarrollo de las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc.) se abre una oportunidad para analizar este fenómeno desde una perspectiva totalmente integral. Dai & Shen (2022) definen a las ciencias ómicas como el análisis y sondeo de datos masivos que representan la composición y función de un sistema biológico completo bajo un estado y/o estímulo determinado.

González-López et al. (2021) a partir de un enfoque proteómico observaron que el secretoma de *T. atroviride* estaba enriquecido en enzimas como endopeptidasas, glicosidasas y deshidrogenasas mientras que el secretoma de las plantas estaba enriquecimiento en peroxidasas y enzimas relacionadas con el catabolismo de metabolitos secundarios. Evidenciando así, como este tipo de interacciones planta-*Trichoderma* tienen gran actividad química transformando moléculas y metabolitos secundarios.

A partir de un análisis metabolómico (análisis masivo de metabolitos presentes en una célula o tejido), se destaca la participación de los azúcares en la inmunidad innata contra patógenos bacterianos en *A. thaliana*, el pretratamiento exógeno con fructosa, glucosa, sacarosa o glicerol aumentó la inmunidad innata contra la infección causada por el patógeno bacteriano *Pseudomonas surgery pv. soupe* (Pst) DC3000 (Qian et al., 2015).

Transcriptómica

En particular, la transcriptómica (análisis de todos los ARNm en un organismo, órgano o tejido) ha hecho grandes aportaciones al entendimiento de cualquier proceso biológico evidenciando la regulación de la expresión génica a un nivel transcripcional (Lowe et al., 2017).

A partir de análisis transcriptómicos se ha podido dar grandes avances en el entendimiento de la interacción planta-*Trichoderma*. Aplicando la transcriptómica en plantas de tomate inoculadas con *Trichoderma harzianum* T34 dio como resultado la identificación de 11 factores de transcripción en la planta relacionados con la defensa sistémica (ISR y SAR) pertenecientes a diferentes familias, entre ellos MYB13, ERF3, MADS box, por mencionar algunos (Aamir et al., 2023). De palma et

al. (2019) reportó la regulación diferencial de una gran cantidad de genes que codifican transportadores de nutrientes, lo cual indicó un fuerte efecto en los procesos de nutrición de las plantas de tomate después de su interacción con *T. harzianum*, profundizando en la expresión genética se evidenció la participación de la metilación de la citosina y mecanismos de empalme alternativos en la interacción planta-*Trichoderma* (De palma et al.,2019). Otro estudio transcriptómico interesante fue publicado por De palma et al (2021) quienes inocularon plantas de tomate con *Trichoderma longibrachiatum* y reportaron una reprogramación transcripcional. Además, identificaron transcritos de genes relacionados con procesos fotosintéticos, floración, y mecanismos de defensa, que condujeron a un fenotipo de recuperación mejorada al estrés hídrico

Recientemente se han propuesto metodologías basadas en los patrones de coexpresión de genes que permiten la construcción de grupos de genes con potencial agrupación funcional, como el análisis de redes de coexpresión (García-Ruiz et al., 2021).

Redes de coexpresión

En particular, el análisis de transcriptoma mediante redes de coexpresión ha mostrado tener óptimos resultados para identificar genes reguladores clave, marcadores genéticos y módulos biológicamente funcionales (Zhang et al., 2019; Al-Harazi et al., 2021). El análisis de redes de coexpresión se fundamenta en la teoría de grafos originada en 1736 por Leonhard Euler. Sin importar la complejidad de una red, esta estará formada por nodos (punto de origen de la ramificación) y aristas (ramificación que surge del nodo) (Euler,1741). El análisis de redes aplicado en la transcriptómica es una metodología novedosa que permite descubrir comunidades de genes cuyos niveles de ARNm están altamente correlacionados entre las muestras. La anotación posterior de las comunidades a menudo revela funciones biológicas y potencialmente enriquecimientos funcionales (García-Ruiz et al., 2021; Montenegro, J. D., 2022). Pons & Latapy (2005), definen a una comunidad como un subgrafo denso, dentro de un grafo disperso y propusieron una medida de similitud entre nodos la cual se fundamenta en caminos aleatorios para poder identificar comunidades en redes complejas. A partir de las medidas de centralidad de un nodo podemos identificar nodos importantes centrales (HUB) que aportan mayor estabilidad a la red y discernir de aquellos nodos que no influyen mucho sobre la misma (Wang et al., 2022).

Justificación

El estudio de la interacción planta-*Trichoderma* como una simbiosis benéfica tiene repercusiones significativas en la agricultura sostenible y en la protección del medio ambiente debido a su potencial uso como agente de biocontrol. Además, su uso como bioestimulante del crecimiento y desarrollo vegetal contribuye potencialmente al fortalecimiento de la seguridad alimentaria.

En el grupo de genómica funcional y comparativa, estudiamos la interacción planta-*Trichoderma* desde hace algunas décadas con el propósito de identificar genes que estén involucrados en la defensa de la planta y la promoción del crecimiento inducidos por este hongo benéfico. Nuestro laboratorio ha contribuido de manera sustancial a la generación de conocimiento bajo métodos convencionales y proponiendo metodologías novedosas haciendo uso de las ciencias ómicas. Por otra parte, en el laboratorio de inteligencia artificial y bioinformática del Centro Nacional de Supercómputo (CNS), abordamos diferentes problemáticas haciendo uso de datos masivos y alta capacidad de cómputo. La colaboración entre ambos laboratorios demuestra como la interdisciplinariedad en la ciencia favorece la resolución de problemas proponiendo soluciones desde diferentes perspectivas. Por estas razones, en este proyecto nos propusimos analizar la interacción planta-*Trichoderma*, usando como modelo de estudio a la planta *Arabidopsis thaliana* y al hongo benéfico *Trichoderma* spp. con el propósito de desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes en la planta después de ser inoculada con el hongo benéfico. Este trabajo se desarrolló en dos etapas: la primera fue realizar un análisis bioinformático usando datos transcriptómicos para identificar genes relevantes durante este fenómeno de estudio. Posteriormente, se planteó caracterizar la función de los genes candidatos de manera experimental usando fenotipos mutantes de la planta y ensayos de reto con patógeno y reto con hipoxia.

En el presente estudio, analizamos el papel de *At2G47520* inducido por *T. atroviride* para mitigar el estrés hipóxico e indagar acerca de su función en los mecanismos de defensa, trabajando con líneas silvestre de *A. thaliana* y mutantes *erf071* (SALK_052858C) con y sin interacción con *T. atroviride*.

Objetivos

- Objetivo general

Realizar el análisis transcriptómico y determinar los mecanismos de defensa de *Arabidopsis thaliana* durante su interacción con *Trichoderma* spp. a partir de redes de coexpresión.

- Objetivos particulares

1. Analizar la expresión diferencial de los genes de *A. thaliana* durante su interacción con *Trichoderma atroviride* o *Trichoderma virens* a las 48, 72 y 96 horas de interacción.
2. Inferir *in silico* una red de coexpresión de los genes de *Arabidopsis thaliana* usando herramientas bioinformáticas.
3. Validar de manera experimental la expresión de genes candidatos del análisis de redes de coexpresión mediante RT-PCR .

Metodología

Condiciones de crecimiento para *Arabidopsis thaliana* y *Trichoderma* spp.

Se utilizó el ecotipo Columbia (Col-0) de *Arabidopsis thaliana* como planta modelo de estudio y *T. atroviride* (imi206040) y *T. virens* como organismos colonizadores para el ensayo de interacción. las cepas de *Trichoderma* se inocularon y crecieron en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 28°C en oscuridad. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 se esterilizaron mediante lavados consecutivos con solución de hipoclorito de sodio al 20% y solución de etanol al 75%. Posteriormente, las semillas se enjuagaron con agua destilada en condiciones estériles. Las semillas de *A. thaliana* se germinaron en medio Murashige y Skoog (MS) [4.4 g/L]. Posteriormente, se incubaron durante 12 días a 37±1°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Ensayo de interacción *Arabidopsis thaliana*–*Trichoderma* spp.

A los 12 días de edad las plantas fueron inoculadas con *T. atroviride* o *T. virens*. Para los grupos control se utilizaron plantas sin inocular. Posteriormente, se colectaron muestras biológicas a las 48, 72 y 96 horas después de la inoculación (hpi) tanto para los grupos control como para las diferentes interacciones. Las muestras colectadas fueron congeladas en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Extracción de ARN, preparación de genotecas y secuenciación

En trabajos previos se generaron las genotecas como se describe a continuación. La extracción de material genómico se realizó utilizando el método reportado por Ferdous et al., (2012) con ligeras modificaciones. El ADN fue precipitado con isopropanol a -20°C durante la noche. La integridad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa [0,8%]. Para purificar el ARN, las muestras se trataron con ADNasa utilizando el kit comercial TURBO DNA-free™ KIT (Ambion, Life Technologies). El ARN se cuantificó en el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek®) a la DO de 260 y 280 nm (nanómetros). La integridad del ARN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante [1%]. Finalmente, se generaron 27 librerías a partir del ARN total y se secuenciaron de manera pareada con la tecnología illumina Hiseq 2500 por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, LANGEBIO.

Recolección y procesamiento de datos

Se realizó un análisis transcriptómico de 27 librerías durante la interacción de *A. thaliana* con *T. atroviride* y *T. virens* en tres tiempos de interacción 48, 74 y 94 hpi, y sus respectivos controles. Cada biblioteca de interacción (*Arabidopsis* (*T.atroviride*) y *Arabidopsis*(*T.virens*)) y controles (*A. thaliana* sin interacción)

consistió en 3 réplicas biológicas independientes. Los conjuntos de datos de expresión génica se procesaron utilizando el software R versión 4.2.1 (2022-06-23 ucrt) (<https://www.R-project.org/>) y RStudio Team (2022). RStudio: Desarrollo integrado para R. RStudio, PBC, Boston, MA URL (<http://www.rstudio.com/>) versión 2022.7.1.554.

Análisis de calidad y mapeo de las lecturas al genoma de referencia

Se realizó un análisis de calidad de los archivos FASTQ. Los fragmentos con un Phred > 30 se consideraron de alta calidad y se utilizaron para el mapeo. Las lecturas se mapearon a un genoma concatenado de referencia (*A.thaliana-T.atroviride-T.virens*). El genoma concatenado se realizó a partir de los genomas de referencia reportados por TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource) versión TAIR10 y para *T. atroviride* y *T. virens* reportados por Ensembl Fungi (<https://fungi.ensembl.org>) versión IMI_206040_v2.0 y ASM17099_v1 respectivamente. El mapeo de las lecturas se realizó utilizando el software HISAT2 y un script bash (Kim et al., 2019). Las lecturas mapeadas se cuantificaron con la herramienta featureCounts del paquete SubRead (Liao et al., 2019). Con estas cuantificaciones, se generó una matriz de conteos con un script R propio.

Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión génica diferencial se realizó con el paquete edgeR utilizando la matriz de cuentas como elemento de entrada. Los factores de normalización y variabilidad se calcularon con las funciones calcNormFactors(x) y estimateDisp(x) respectivamente. Posteriormente, los datos se ajustaron mediante una prueba de razón de verosimilitud (función glmFit(x)) y se calculó un coeficiente para contrastes múltiples con la función glmQLFTest(x). Finalmente, se realizaron contrastes para identificar cambios en la expresión génica en condiciones control y en condiciones de interacción planta-microorganismo, con lo cual se generó una matriz de expresión diferencial para cada contraste (Robinson et al., 2010).

Construcción y análisis de red de coexpresión

Se generaron dos redes de coexpresión génica (*Arabidopsis(T.virens)* y *Arabidopsis(T.atroviride)*). Cada uno de los resultados de los contrastes de expresión diferencial (*Arabidopsis(T.virens)* y *Arabidopsis(T.atroviride)*) se filtraron utilizando el estadístico de tasa de falsos descubrimientos (FDR) y un umbral de FDR = 0,001. Los genes resultantes se utilizaron para generar la matriz de correlación utilizando el método de Spearman. Método definido en la función cor(x) del paquete base R. Se realizó una prueba de correlación para cada correlación con las funciones cor.test(x) del paquete base R. Las correlaciones se filtraron utilizando un umbral de FDR = 0,001. Las correlaciones resultantes se utilizaron para construir

redes de coexpresión génica. El análisis y visualización de la red se llevó a cabo utilizando el paquete igraph con el lenguaje de programación R (Csardi & Nepusz., 2014).

Las dos redes de coexpresión *Arabidopsis(T. virens)* y *Arabidopsis(T. atroviride)* formadas por 1.185 y 1.179 nodos respectivamente se filtraron utilizando una puntuación. La puntuación es el producto de las medidas de centralidad, cercanía y autoridad. Utilizando la puntuación en orden decreciente, utilizamos los mejores 450 nodos y generamos dos subredes *Arabidopsis(T. virens)* y *Arabidopsis(T. atroviride)*.

Se identificaron comunidades para cada una de las redes (*Arabidopsis (T. virens)* y *Arabidopsis(T.atroviride)*) utilizando el algoritmo desarrollado por Pons & Latapi (2005) con la función cluster_walktrap(x) y parámetros por defecto.

Posteriormente, las comunidades con más de 50 nodos se compararon entre sí con base en las métricas de grado, puntuación de autoridad y cercanía.

Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional en las comunidades identificadas.

Discusión de resultados

“Infiriendo redes de coexpresión de genes de *Arabidopsis thaliana* durante su interacción con *Trichoderma* spp.”

En trabajos previos se realizó el ensayo de interacción *Arabidopsis-Trichoderma* para generar las genotecas. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, nos enfocamos en analizar la interacción *A. thaliana*–*Trichoderma* spp. a partir de datos transcriptómicos y de un análisis de redes de coexpresión. Se utilizaron dos especies del género de hongos *Trichoderma* consideradas como benéficas (*T. atroviride* y *T. virens*) para producir una respuesta por parte de la planta. Se recolectó tejido foliar y de raíz para las muestras de RNA total a las 48, 72 y 96 hpi (horas post inoculación). Posteriormente, se purificó el ARNm y se generaron 27 genotecas de cDNA; 9 genotecas control (planta sin interacción), 9 genotecas planta-*T. atroviride* y 9 genotecas planta-*T. virens*. Cada grupo de genotecas, consistió de 3 muestras por cada tiempo de interacción, representando así los triplicados técnicos.

Análisis de expresión diferencial y enriquecimiento funcional

Para obtener un panorama general sobre la inducción o represión de genes se realizó un análisis de expresión diferencial para cada una de las interacciones *Arabidopsis-T. atroviride* o *Arabidopsis-T. virens*., comparando las genotecas control vs las genotecas de interacción utilizando el software R versión 4.2.1 (Figura 3A-B). Con la finalidad de investigar similitudes y diferencias entre los genes inducidos en la planta entre cada una de las especies de *Trichoderma*, se realizó un diagrama de Venn y el grupo de intersección se sometió a un análisis t-student evidenciando que no hubo efecto estadístico significativo ($p\text{-val} = 0.055$) (Figura 3C), cuando se comparó el grupo de intersección de genes reprimidos, encontramos que *T. virens* fue más efectivo para la represión de genes ($p\text{-val} = 0.02$) (Figura 3D). Posteriormente, se filtraron las tablas de expresión diferencial usando como valor umbral un *False Discovery Rate* (FDR) de 0.001. Los genes con valor FDR menor a este umbral se usaron para un análisis de enriquecimiento de términos ontológicos. En los términos enriquecidos en cuanto a proceso biológico que fueron inducidos en la planta encontramos el proceso metabólico de camalexinas (GO:0052317), respuesta a ácido salicílico (GO:0009751) y respuesta al ácido jasmónico (GO:0009753), mientras que algunos procesos reprimidos fueron desarrollo de la raíz (GO:0048364) (Figura 4). Estos resultados fueron concordantes con la literatura (Garnica-Vergara et al., 2016; Salas-Marina et al., 2011; Jogaiah et al., 2018).

Análisis de coexpresión génica y redes diferenciales.

Posteriormente se realizó, un análisis de coexpresión génica seguido de un análisis diferencial de redes (como se detalla en la metodología), el cual mostró que los genes se reagrupan cuando se compararon las redes *A.thaliana(T.atroviride)* y *A.thaliana(T.virens)* contra las redes control (Figura 5A-B). Además, las redes control evidenciaron tener mayor número de aristas para cada caso. Cuando se comparó la interacción planta-*T.atroviride* con su respectivo control observamos que, la red control tuvo 33,222 aristas mientras que en interacción solo 9,826. Por otra parte, en la interacción planta-*T.virens* comparada con su respectivo control observamos que la red control tuvo 116,682 aristas mientras que en interacción tuvo 43,784 aristas. A pesar de que en ambos casos las redes de interacción tuvieron menor número de aristas se demostró que estas son específicas y tienen valores mayores de correlación de Spearman(rs) por lo tanto, el estímulo por *Trichoderma* spp. en la planta genera un ajuste en los datos ya que reduce el número de observaciones (aristas) y al mismo tiempo aumento el parámetro estadístico de asociación. En la red *A.thaliana(T.virens)* las aristas tuvieron valores de correlación mayores a $rs \geq 0.95$, en la red *A.thaliana(T.atroviride)* las aristas tuvieron valores de correlación mayores a $rs \geq 0.90$ por el contrario en las redes control los valores de correlaciones van desde $rs \geq 0.85$ (Figura 5C).

Durante el análisis de coexpresión génica se detectaron 3 comunidades (mayor a 100 nodos) para la red *A.thaliana(T.atroviride)*; las comunidades 9 (Ca9), 16 (Ca16) y 18 (Ca18). Por otra parte, se detectaron 4 grandes comunidades para la red *A.thaliana(T.virens)* las comunidades 5 (Cv5), 14 (Cv14), 22 (Cv22) y 41 (Cv41). Debido a que ciertos nodos no fueron detectados como miembros de una comunidad fueron descartados para los analisis posteriores(Figura 6 y 7). La asociación entre Ca9-Ca18 y Cv14-Cv22 sugieren que existe una relación funcional entre la hipoxia y los mecanismos de defensa contra hongos.

Los nodos HUB tienen una importancia significativamente mayor en comparación con otros nodos de la red. Para la selección de nodos HUB generamos un score definido por el producto aritmético de las medidas de centralidad: grado, autoridad y cercanía (Score = Grado * Autoridad * Cercanía). Posteriormente, usamos el top 50 de cada comunidad basándonos en el score generado. De esta manera, nos quedamos con 150 y 200 nodos HUB para las redes *A.thaliana(T.atroviride)* y *A.thaliana(T.virens)*, respectivamente. En ambos grupos de nodos HUB identificamos el locus At2G47520 el cual codifica para el factor de transcripción ERF071, miembro de la familia ERF-VII. A partir de un análisis de dominios conservados (CDD, de sus siglas en inglés *conserved domains database*) observamos que ERF071 tiene el dominio proteico AP2/ERF y una cisteína N-terminal típica de los ERF-VII; mismo que está presente en proteínas de las plantas que tienen un papel importante para evadir los patógenos como es el caso del factor

de transcripción ORA59; quien tiene un papel relevante en la defensa de las plantas mediando la señalización de JA.(Gutterson & Reuber., 2004). Posteriormente, mediante un análisis de matrices de pesos posicionales (PWM, de sus siglas en inglés position weight matrix) calculada a partir de secuencias homólogas alineadas observamos que ERF071 potencialmente puede unirse a la secuencia promotora GCC misma que está presente en genes relacionados con mecanismos de defensa de las plantas (Brown et al., 2003; Gutterson & Reuber., 2004).

Validación experimental

Finalmente, se realizó una validación del transcriptoma seleccionando genes candidato del analisis de redes. Para validar el transcriptoma se analizó la expresión diferencial de los genes candidato mediante RT-qPCR a las 48, 72 y 96 hpi. Posteriormente se compararon las expresiones génicas del transcriptoma y las expresiones de RT-qPCR usando el coeficiente de correlación de Spermán (ρ_s) (Figura 8).

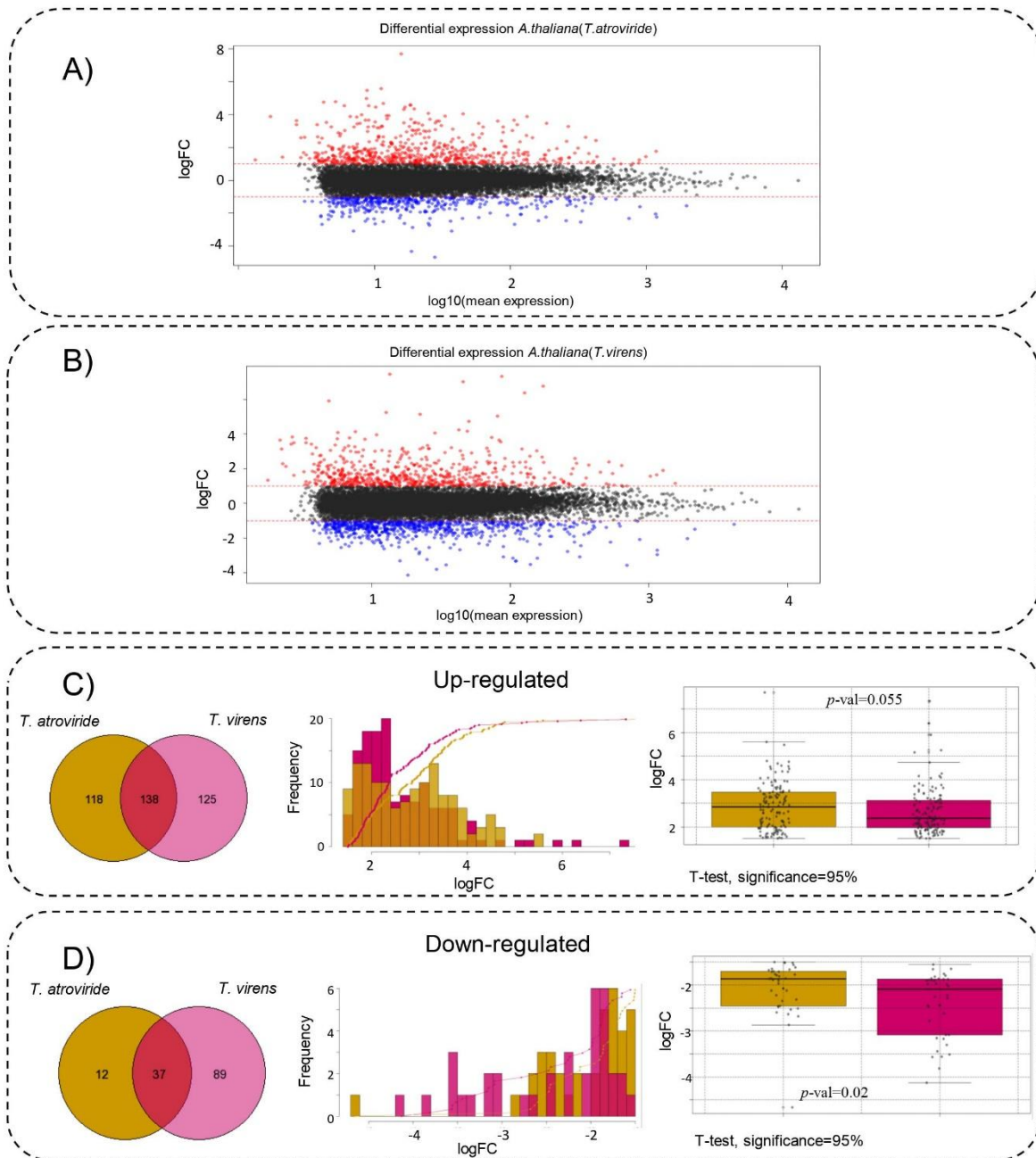


Figura 3. Análisis de expresión diferencial. (A) Gráfico de escala logarítmica promedio (MA-plot) del análisis de expresión diferencial de *A. thaliana* (*T. atroviride*). En el eje y se muestran los cambios $\log_2$ veces versus el eje x representa $\log_{10}$ la señal de expresión promedio. Los puntos rojos representan genes regulados positivamente; Los puntos azules representan genes regulados negativamente. (B) Gráfico MA del análisis de expresión diferencial *A.thaliana* (*T.virens*) . En el eje y se muestran los cambios $\log_2$ veces versus el eje x representa $\log_{10}$ la señal de expresión promedio. Los puntos rojos representan genes regulados positivamente; Los puntos azules representan genes regulados negativamente. (C) Comparación

de genes regulados positivamente en *A. thaliana* por *T. atroviride* frente a *T. virens*. El diagrama de Venn muestra los genes regulados por *T. atroviride*, *T. virens* o ambos. Panel central. Comparación de la distribución de frecuencia de genes regulados positivamente por *T. atroviride* y *T. virens*. Panel derecho. Resultados de la prueba t-student de genes regulados positivamente. Los puntos amarillos representan los genes inducidos por *T. atroviride* mientras que los puntos rosas fueron inducidos por *T. virens*. (D) Comparación de genes regulados negativamente en *A. thaliana* por *T. atroviride* frente a *T. virens*. Panel izquierdo. Diagrama de Venn que muestra genes regulados negativamente por *T. atroviride*, *T. virens* o ambos. Panel central. Comparación de la distribución de frecuencia de genes regulados negativamente por *T. atroviride* y *T. virens*. Panel derecho. Resultados del estadístico T-student de genes regulados negativamente. Los puntos amarillos representan los genes reprimidos por *T. atroviride* mientras que los puntos rosados fueron reprimidos por *T. virens*.

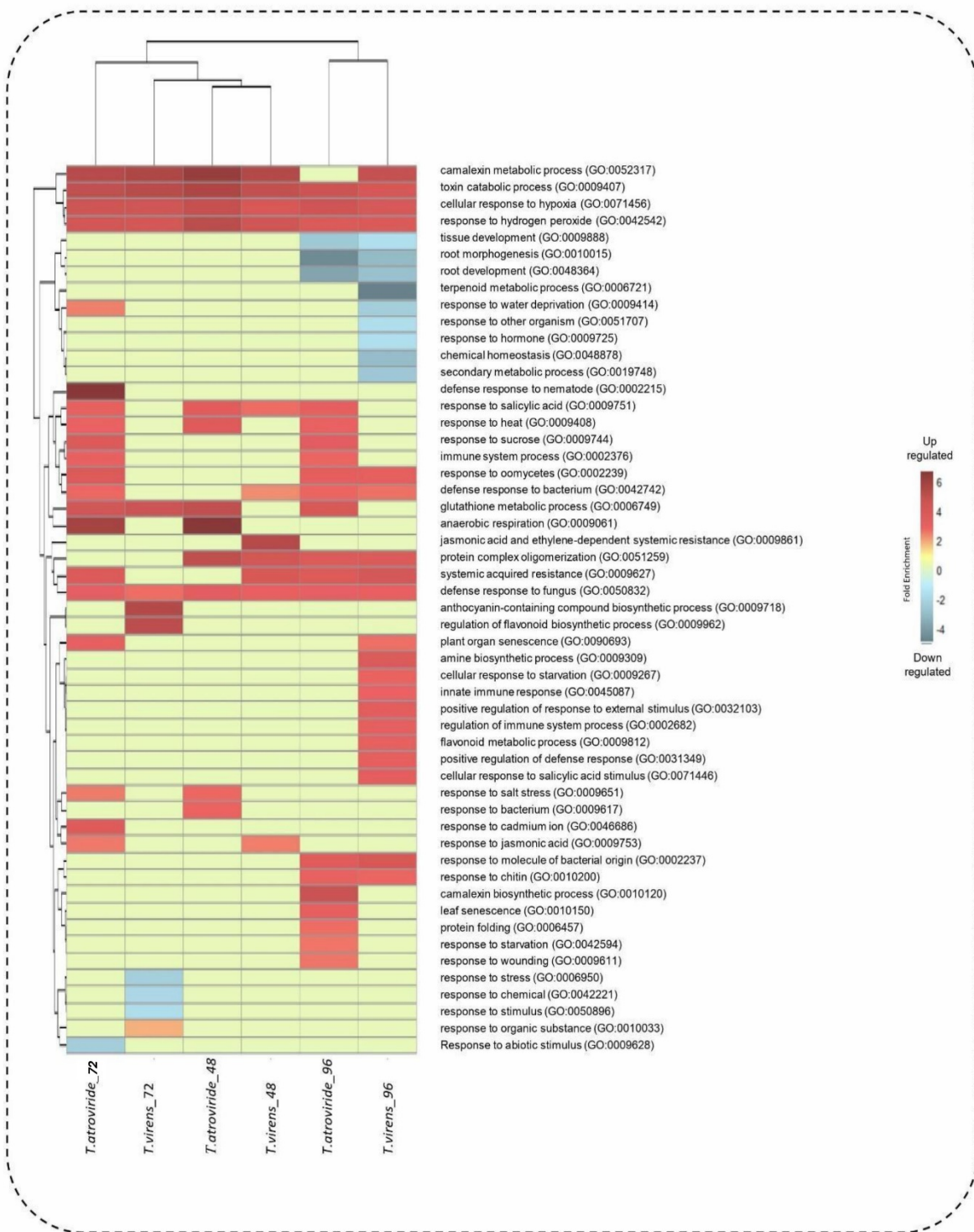


Figura 4. Análisis de enriquecimiento de Ontología Génica. Proceso biológico que fue regulado diferencialmente en *A. thaliana* durante su interacción con *Trichoderma* spp. Cada columna representa un contraste de expresión diferencial y cada fila

representa las ontologías de genes en términos de los procesos biológicos involucrados. El gradiente de color va del azul al rojo para procesos biológicos regulados negativa y positivamente.

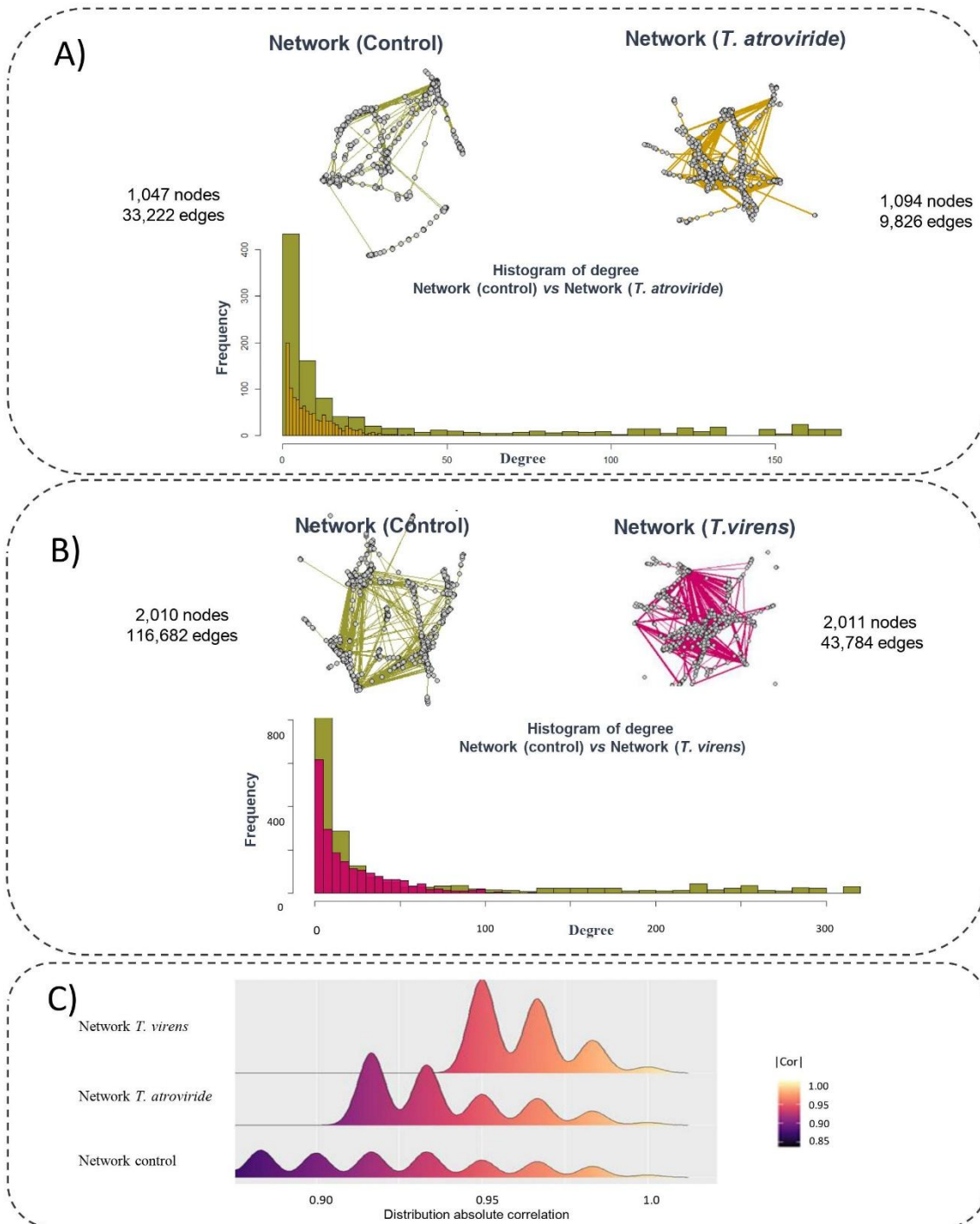


Figura 5. Análisis diferencial de redes. (A) Redes de coexpresión en condiciones control (bordes verdes) y en interacción con *T. atroviride* (bordes amarillos) e histograma de grado inferior. (B) Redes de coexpresión en condiciones control (bordes verdes) y en interacción con *T. virens* (bordes rosados) y el histograma de grado inferior. (C) Análisis de distribución de correlación para las redes de control, *T. atroviride* y *T. virens*. El gradiente de color va del negro al amarillo claro para

valores bajos y altos de correlación, respectivamente. El gráfico presenta el valor absoluto de la correlación.

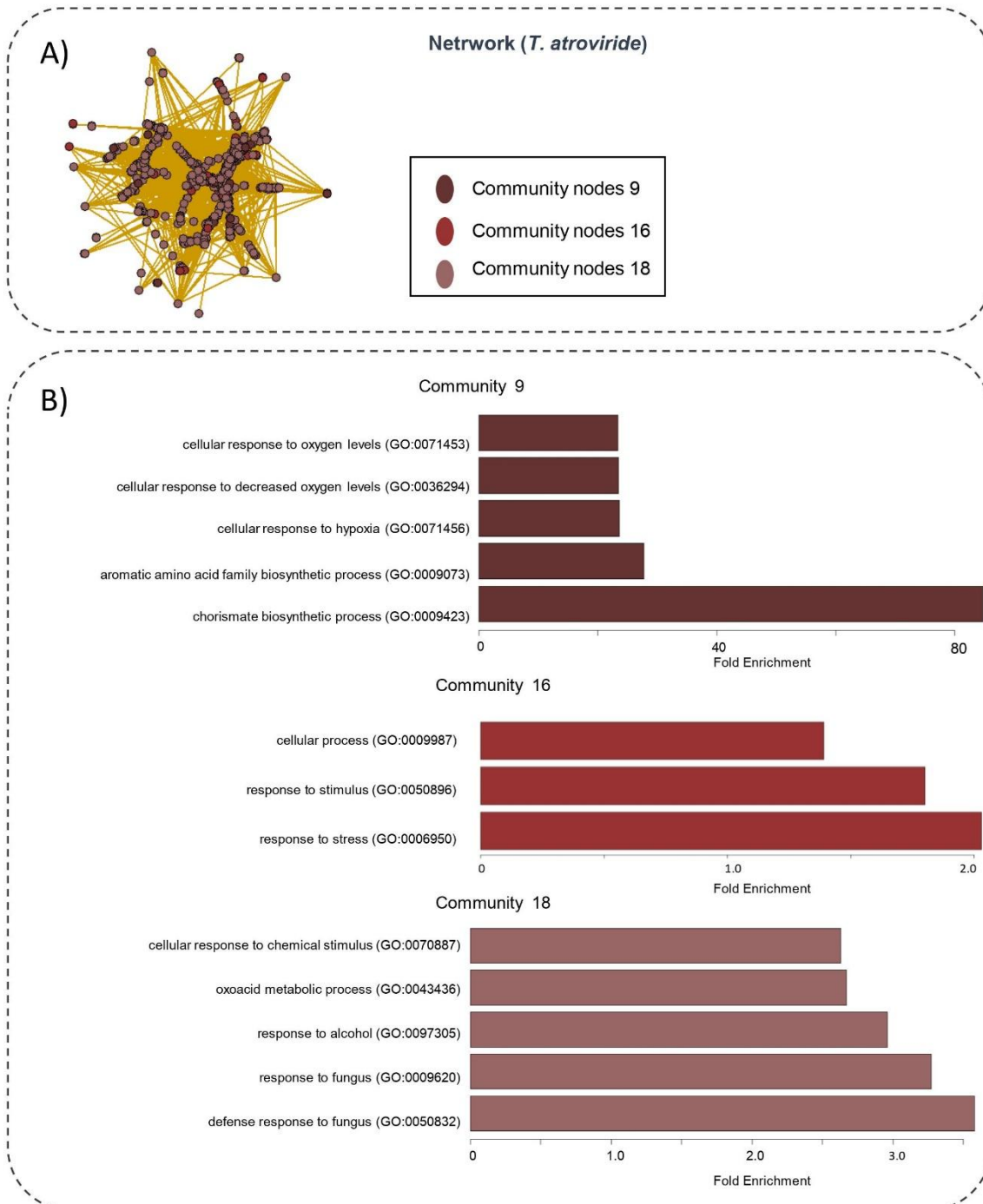


Figura 6. Comunidades de la red de genes de coexpresión *A.thaliana*(*T.atroviride*). (A) Comunidades de la red de genes de coexpresión *A.thaliana* (*T.atroviride*). Las comunidades se identificaron utilizando el algoritmo `cluster_walktrap(x)` del paquete `igraph`. Cada comunidad está representada por un color. (B) Análisis de enriquecimiento funcional. El color marrón oscuro representa la comunidad 9 (Ca9), el color marrón representa la comunidad 16 (Ca16) y el color marrón claro

representa la comunidad 18 (Ca18). En el eje y se muestran las ontologías de genes enriquecidos. En el eje x se observa la proporción de enriquecimiento.

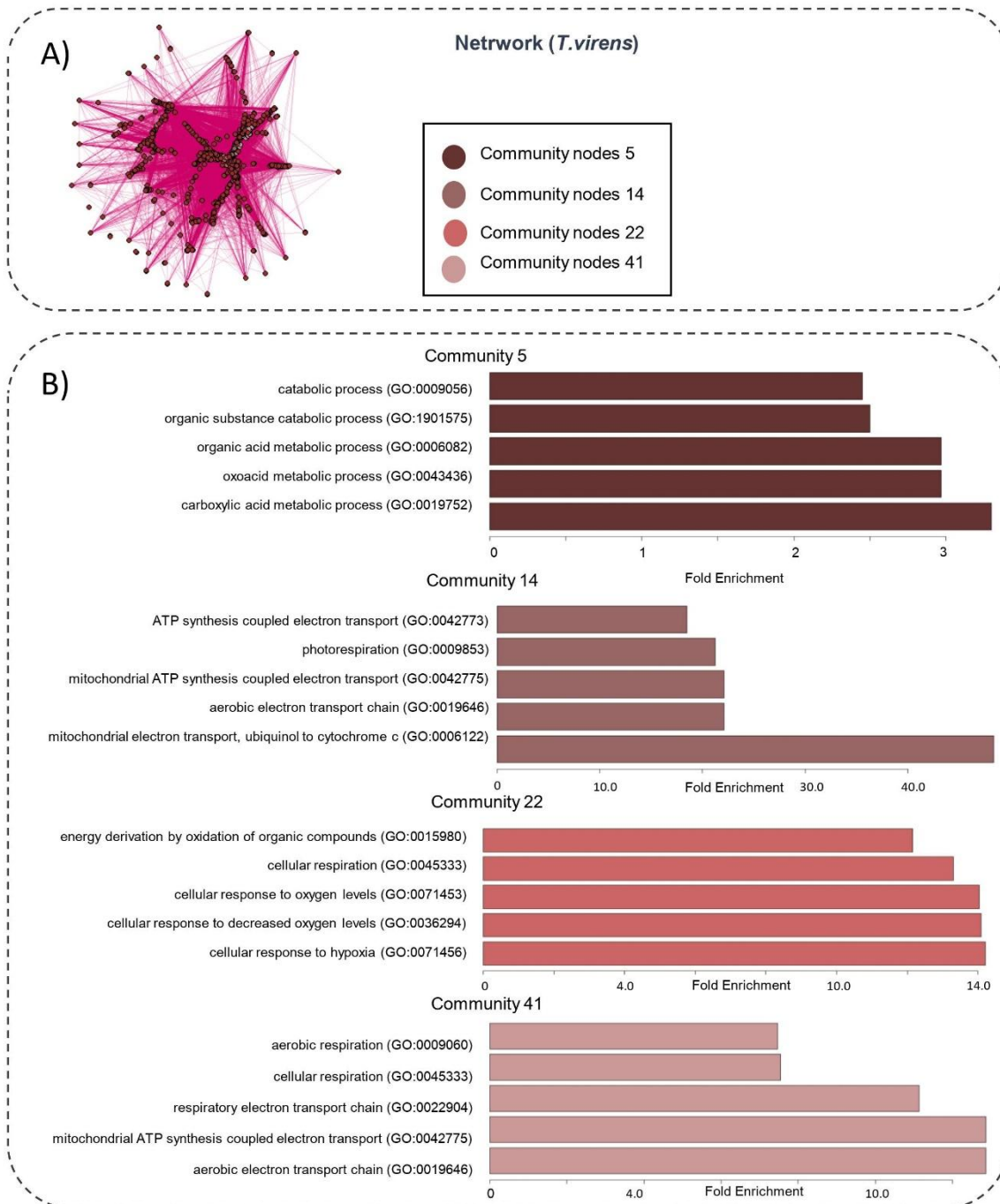


Figura 7. Comunidades de la red de genes de coexpresión *A.thaliana*(*T.virens*). (A) Comunidades de la red de genes de coexpresión *A.thaliana*(*T.virens*). Las comunidades se identificaron utilizando el algoritmo `cluster_walktrap(x)` del paquete `igraph`. (B) Análisis de enriquecimiento funcional. Las barras de color marrón oscuro y marrón claro representan Cv5 y Cv14 respectivamente. Las barras de color rosa oscuro y rosa claro representan Cv22 y Cv41 respectivamente. En el eje y se

muestran las ontologías de genes enriquecidos, en el eje x se observa la proporción de enriquecimiento.

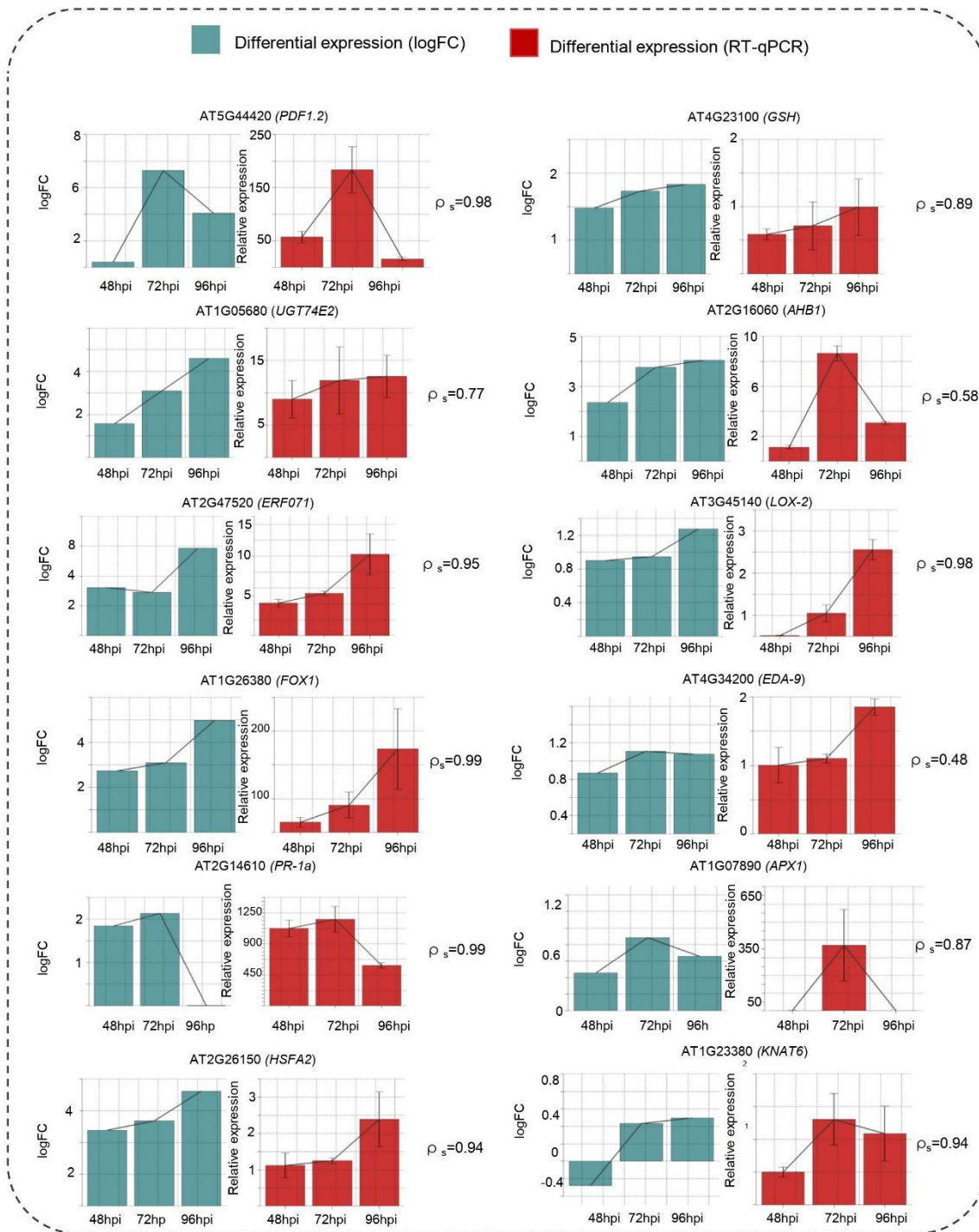


Figura 8. Validación del transcriptoma. La validación experimental del transcriptoma se realizó mediante RT-qPCR a las 48, 72 y 96 hpi. El experimento de validación se realizó por triplicado técnico y duplicado biológico. Valores de color azul obtenidos de expresión diferencial del transcriptoma; valores de color rojo obtenidos por RT-

qPCR. Las barras representan la desviación estándar (sd) del promedio de un triplicado. El coeficiente de correlación de Spearman (ρ_s).

Conclusiones

El análisis de redes de coexpresión genética es una metodología que nos permite observar cómo los genes expresados diferencialmente en *Arabidopsis thaliana* se asocian en módulos biológicamente funcionales para responder a una interacción con los hongos mutualistas *T. virens* y *T. atroviride*.

El análisis de redes permite identificar genes expresados diferencialmente relevantes durante la interacción planta-hongo a partir de las mediciones de centralidad. Esto permite la identificación de genes con funciones novedosas que se involucran y operan juntos para responder a un estímulo. El locus *At2G47520* destaca por tener un funcionamiento dual; primero mitigando el estrés por hipoxia y además evidenciando resistencia a los patógenos; lo cual explica la interconexión entre ambos procesos biológicos como se ejemplifica en el esquema (Fig. 9).

En conjunto, sentamos las bases sobre como *Trichoderma* spp. puede conferir resistencia al estrés hipóxico después de interactuar con *A. thaliana* mediante la inducción de ERF071(*At2G47520*)

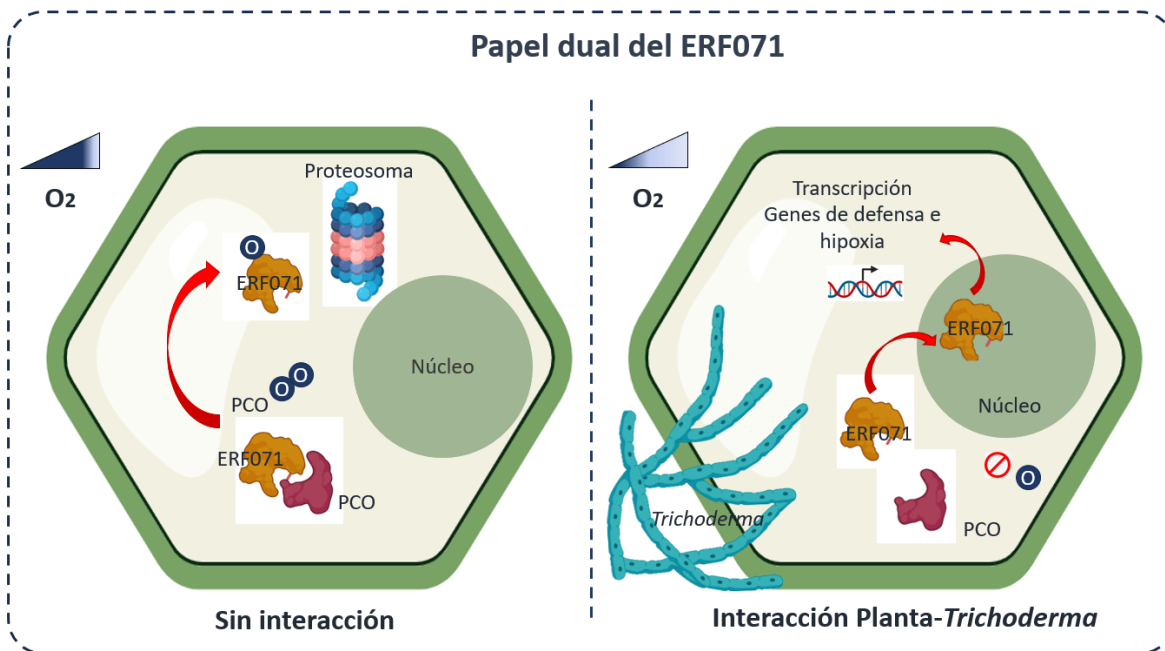


Figura 9. Esquema de resultados. Sin interacción el producto proteico de la expresión basal de ERF071 es degradado por la vía del proteosoma debido a que su cisteína N-terminal es oxigenada por la enzima PCO (de sus siglas en inglés plant cysteine oxidase). Durante la interacción con *Trichoderma* la concentración de oxígeno molecular disminuye en consecuencia no hay sustrato para la reacción catalizada por PCO y el factor de transcripción ERF071 con su cisteína intacta se

transloca al núcleo donde induce genes de defensa de la planta y genes de respuesta a hipoxia.

Como productos del desarrollo de este proyecto se publicó el artículo titulado “Inferring co-expression networks of *Arabidopsis thaliana* genes during their interaction with *Trichoderma* spp.” en el volumen 14 de la revista Scientific Reports con digital object identifier doi.org/10.1038/s41598-023-48332-w.

Bibliografía

- Abbas, M., Sharma, G., Dambire, C., Marquez, J., Alonso-Blanco, C., Proaño, K., & Holdsworth, M. J. (2022). An oxygen-sensing mechanism for angiosperm adaptation to altitude. *Nature*, 606(7914), 565-569.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1), 63-78.
- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, KA, Ghramh, HA, Huang, Z., ... y Lu, GD (2019). Defensa de las plantas contra hongos patógenos mediante hongos antagonistas con *Trichoderma* en foco. *Patogénesis microbiana* , 129 , 7-18.
- Ahn, I. P., Lee, S. W., & Suh, S. C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in Arabidopsis is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 759-768.
- Aizat, W. M., Ismail, I., & Noor, N. M. (2018). Recent development in omics studies. *Omics Applications for Systems Biology*, 1-9.
- Al-Harazi, O., Kaya, I. H., El Allali, A., & Colak, D. (2021). A network-based methodology to identify subnetwork markers for diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Frontiers in genetics*, 12, 721949.
- Ausubel, F. M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature immunology*, 6(10), 973-979.
- Ballouz, S., Verleyen, W. y Gillis, J. (2015). Orientación para la construcción y análisis de redes de coexpresión de RNA-seq: seguridad en números. *Bioinformática* , 31 (13), 2123-2130.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, M., & Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of Arabidopsis thaliana. *Lipids*, 44, 85-95.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bell, E., Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8675-8679.
- Boucher, B., & Jenna, S. (2013). Genetic interaction networks: better understand to better predict. *Frontiers in genetics*, 4, 290.

- Bowles, A. M., Williamson, C. J., Williams, T. A., Lenton, T. M., & Donoghue, P. C. (2023). The origin and early evolution of plants. *Trends in Plant Science*, 28(3), 312-329.
- Brown, R. L., Kazan, K., McGrath, K. C., Maclean, D. J., & Manners, J. M. (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1. 2 gene of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 132(2), 1020-1032.
- Brooks, D. M., Bender, C. L., & Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology*, 6(6), 629-639.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1), 57-63.
- Chaudhary, A., Bala, K., Thakur, S., Kamboj, R., & Dumra, N. (2018). Plant defenses against herbivorous insects: A Review. *IJCS*, 6(5), 681-688.
- Chen, J., Mohan, R., Zhang, Y., Li, M., Chen, H., Palmer, I. A., ... & Fu, Z. Q. (2019). NPR1 promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting CDK8. *Plant physiology*, 181(1), 289-304.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), 493-496.
- 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), 803-814.
- Cornejo-Ríos, K., Osorno-Suárez, M. D. P., Hernández-León, S., Reyes-Santamaría, M. I., Juárez-Díaz, J. A., Pérez-España, V. H., ... & Saucedo-García, M. (2021). Impact of *Trichoderma asperellum* on chilling and drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Horticulturae*, 7(10), 385.
- Cummins, M., & Huitema, E. (2017). Effector–Decoy Pairs: Another Countermeasure Emerging during Host–Microbe Co-evolutionary Arms Races?. *Molecular Plant*, 10(5), 662-664.
- Dai, X. y Shen, L. (2022). Avances y tendencias en el desarrollo de la tecnología ómica. *Fronteras en Medicina*.
- De Palma, M., Docimo, T., Guida, G., Salzano, M., Albrizio, R., Giorio, P., ... & Tucci, M. (2021). Transcriptome modulation by the beneficial fungus *Trichoderma longibrachiatum* drives water stress response and recovery in tomato. *Environmental and Experimental Botany*, 190, 104588.

Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... & Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(7), 2225-2245.

Frías, M., Brito, N., & González, C. (2013). The *Botrytis cinerea* cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. *Molecular Plant Pathology*, 14(2), 191-196.

Garnica-Vergara, A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., ... & López-Bucio, J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist*, 209(4), 1496-1512.

Gasch, P., Fundinger, M., Müller, J. T., Lee, T., Bailey-Serres, J., & Mustroph, A. (2016). Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved cis-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 28(1), 160-180.

Giuntoli, B., & Perata, P. (2018). Group VII ethylene response factors in Arabidopsis: regulation and physiological roles. *Plant physiology*, 176(2), 1143-1155.

Gonzalez-Lopez, M. D. C., Jijón-Moreno, S., Dautt-Castro, M., Ovando-Vázquez, C., Ziv, T., Horwitz, B. A., & Casas-Flores, S. (2021). Secretome analysis of Arabidopsis–*Trichoderma atroviride* interaction unveils new roles for the plant glutamate: glyoxylate aminotransferase GGAT1 in plant growth induced by the fungus and resistance against *Botrytis cinerea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6804.

Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A., & Fontes, E. P. (2017). Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in microbiology*, 7, 2139.

Govrin, E. M., & Levine, A. (2002). Infection of Arabidopsis with a necrotrophic pathogen, *Botrytis cinerea*, elicits various defense responses but does not induce systemic acquired resistance (SAR). *Plant molecular biology*, 48, 267-276.

Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants*, 1-19.

Gutterson, N., & Reuber, T. L. (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 465-471.

- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in plant science*, 9, 1771
- Hu XueYun, H. X., Tanaka, A., & Tanaka, R. (2013). Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples.
- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., & Ito, S. I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular plant pathology*, 19(4), 870-882.
- Jones, JD y Dangl, JL (2006). El sistema inmunológico de las plantas. *naturaleza* , 444 (7117), 323-329.
- Kachroo, P., Liu, H., & Kachroo, A. (2020). Salicylic acid: Transport and long-distance immune signaling. *Current Opinion in Virology*, 42, 53-57.
- Kachroo, A., Liu, H., Yuan, X., Kurokawa, T., & Kachroo, P. (2022). Systemic acquired resistance-associated transport and metabolic regulation of salicylic acid and glycerol-3-phosphate. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 673-681.
- Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A. K., Singh, R. K., & Kumar, P. (2020). Systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR): role and mechanism of action against phytopathogens. *Fungal biotechnology and bioengineering*, 457-470.
- Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(10), 770-780.
- Keeling, P. J. (2004). Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *American journal of botany*, 91(10), 1481-1493.
- Leung, T. L., & Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu/Life & Environment*, 107-115.
- Licausi, F., Van Dongen, J. T., Giuntoli, B., Novi, G., Santaniello, A., Geigenberger, P., & Perata, P. (2010). HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 62(2), 302-315.

- Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Y., Radojčić, A., Ding, Y., ... & Zhang, Y. (2020). Diverse roles of the salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in plant immunity. *The Plant Cell*, 32(12), 4002-4016.
- Li, P., Xu, Y., Zhang, Y., Fu, J., Yu, S., Guo, H., ... & Zhao, J. (2020). Metabolite profiling and transcriptome analysis revealed the chemical contributions of tea trichomes to tea flavors and tea plant defenses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(41), 11389-11401.
- Li, Q., Zheng, J., Li, S., Huang, G., Skilling, S. J., Wang, L., ... & Liu, P. (2017). Transporter-mediated nuclear entry of jasmonoyl-isoleucine is essential for jasmonate signaling. *Molecular Plant*, 10(5), 695-708.
- Lichtenthaler, H. K. (1998). The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the new York Academy of sciences*, 851, 187-198.
- Loreti, E., & Perata, P. (2020). The many facets of hypoxia in plants. *Plants*, 9(6), 745.
- Loreti, E., & Perata, P. (2023). ERFVII transcription factors and their role in the adaptation to hypoxia in Arabidopsis and crops. *Frontiers in Genetics*, 14.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., & Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983), 1002-1004.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., & Cameron, R. K. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature*, 419(6905), 399-403.
- Manners, J. M., Penninckx, I. A., Vermaere, K., Kazan, K., Brown, R. L., Morgan, A., ... & Broekaert, W. F. (1998). The promoter of the plant defensin gene PDF1. 2 from Arabidopsis is systemically activated by fungal pathogens and responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid. *Plant molecular biology*, 38, 1071-1080.
- Mona, S. A., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., Soliman, D. W. K., Wirth, S., & Egamberdieva, D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of integrative agriculture*, 16(8), 1751-1757.
- Montenegro, J. D. (2022). Gene co-expression network analysis. In *Plant bioinformatics: methods and protocols* (pp. 387-404). New York, NY: Springer US.

- Nagai, K., Kurokawa, Y., Mori, Y., Minami, A., Reuscher, S., Wu, J., ... y Ashikari, M. (2022). Los genes SNORKEL relacionados con la tolerancia a las inundaciones se pseudogenizaron en arroz cultivado normal. *Plantas*, 11 (3), 376.
- Nawrocka, J., & Małolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological control*, 67(2), 149-156.
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of plant defense system in response to microbial interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1298.
- Ni, X. L., Gui, M. Y., Tan, L. L., Zhu, Q., Liu, W. Z., & Li, C. X. (2019). Programmed cell death and aerenchyma formation in water-logged sunflower stems and its promotion by ethylene and ROS. *Frontiers in plant science*, 9, 1928.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.
- Park, S. W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., & Klessig, D. F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Hoffland, E., Van Pelt, J. A., & Van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell*, 8(8), 1225-1237.
- Pieterse, C. M., Van Wees, S. C., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., ... & Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(9), 1571-1580.
- Rawal, R., Scheerens, J. C., Fenstermaker, S. M., Francis, D. M., Miller, S. A., & Benitez, M. S. (2022). Novel *Trichoderma* isolates alleviate water deficit stress in susceptible tomato genotypes. *Frontiers in plant science*, 13, 869090.
- Rejeb, I. B., Pastor, V., & Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458-475.
- Relman, DA (2008). 'Hasta que la muerte nos separe': aceptar relaciones simbióticas. *Nature Reviews Microbiología*, 6 (10).
- Rodriguez, P. A., Rothballer, M., Chowdhury, S. P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., & Falter-Braun, P. (2019). Systems biology of plant-microbiome interactions. *Molecular plant*, 12(6), 804-821.

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), 15-26.

Salas-Marina, M. A., Isordia-Jasso, M. I., Islas-Osuna, M. A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Kessler, M., ... & Casas-Flores, S. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in Plant Science*, 6, 77.

Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*, 48, 21-43.

Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385(6618), 718-721.

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 787-799.

Singh, A., Lim, GH y Kachroo, P. (2017). Transporte de señales químicas en la resistencia sistémica adquirida. *Revista de biología vegetal integrativa* , 59 (5), 336-344.

Song, C., Cao, Y., Dai, J., Li, G., Manzoor, M. A., Chen, C., & Deng, H. (2022). The multifaceted roles of MYC2 in plants: toward transcriptional reprogramming and stress tolerance by jasmonate signaling. *Frontiers in Plant Science*, 13, 868874.

Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., ... & Pieterse, C. M. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., & Suprakash, R. (2014). Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res J Chem Sci*, 2231, 606X.

Suza, W. P., & Staswick, P. E. (2008). The role of JAR1 in jasmonoyl-L-isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *Planta*, 227, 1221-1232.

Tang, H., & Liu, H. (2021). Roles of single gene in plant hypoxia and pathogen responses. *Plant Signaling & Behavior*, 16(10), 1934295.

- Tyśkiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E., & Jaroszuć-Ściseł, J. (2022). Trichoderma: The current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2329.
- Tzfadia, O., Diels, T., De Meyer, S., Vandepoele, K., Aharoni, A. y Van de Peer, Y. (2016). CoExpNetViz: herramienta comparativa de construcción y visualización de redes de coexpresión. *Fronteras en la ciencia vegetal*, 6, 1194.
- Conrath, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant signaling & behavior*, 1(4), 179-184.
- Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). Trichoderma as a model to study effector-like molecules. *Frontiers in microbiology*, 10, 1030.
- Verma, S., Nizam, S., & Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. In *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective*, Volume 1 (pp. 25-49). Springer, New York, NY.
- Wang, M., Wang, H. y Zheng, H. (2022). Una mini revisión de las métricas de centralidad de nodos en redes biológicas. *Revista Internacional de Inteligencia y Dinámica de Redes*, 1 (1), 99-110.
- White, M. D., Kamps, J. J., East, S., Kearney, L. J. T., & Flashman, E. (2018). The plant cysteine oxidases from *Arabidopsis thaliana* are kinetically tailored to act as oxygen sensors. *Journal of Biological Chemistry*, 293(30), 11786-11795.
- Weigel, R. R., Pfitzner, U. M., & Gatz, C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(4), 1279-1291.
- Weits, D. A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H. M., Riegler, H., ... & Licausi, F. (2014). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature communications*, 5(1), 1-10.
- Wirthmueller, L., Maqbool, A., & Banfield, M. J. (2013). On the front line: structural insights into plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 761-776.
- Wu, F., Deng, L., Zhai, Q., Zhao, J., Chen, Q., & Li, C. (2020). Mediator subunit MED25 couples alternative splicing of JAZ genes with fine-tuning of jasmonate signaling. *The Plant Cell*, 32(2), 429-448.
- Zaidi, NW, Dar, MH, Singh, S. y Singh, EE. UU. (2014). Especies de *Trichoderma* como analgésicos abióticos en plantas. En *Biotecnología y biología de trichoderma* (págs. 515-525). Elsevier.

- Zhang, C., Wang, W., Hu, Y., Peng, Z., Ren, S., Xue, M., ... & Liu, T. (2022). A novel salt-tolerant strain *Trichoderma atroviride* HN082102. 1 isolated from marine habitat alleviates salt stress and diminishes cucumber root rot caused by *Fusarium oxysporum*. *BMC microbiology*, 22(1), 1-14.
- Zhang, M., Li, Q., Yu, D., Yao, B., Guo, W., Xie, Y., & Xiao, G. (2019). GeNeCK: a web server for gene network construction and visualization. *BMC bioinformatics*, 20(1), 1-7.
- Zhang, Q., Xie, Z., Zhang, R., Xu, P., Liu, H., Yang, H., ... & Li, L. (2018). Blue light regulates secondary cell wall thickening via MYC2/MYC4 activation of the NST1-directed transcriptional network in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 30(10), 2512-2528.
- Zinta, G., Khan, A., AbdElgawad, H., Verma, V., & Srivastava, A. K. (2016). Unveiling the redox control of plant reproductive development during abiotic stress. *Frontiers in plant science*, 7, 700.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 414-420.
- Ziv, C., Zhao, Z., Gao, Y. G., & Xia, Y. (2018). Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 1088.
- Zubrycka, A., Dambire, C., Dalle Carbonare, L., Sharma, G., Boeckx, T., Swarup, K., ... & Holdsworth, M. J. (2023). ERFVII action and modulation through oxygen-sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature communications*, 14(1), 4665.

Anexos

El capítulo 1 del presente proyecto sentó las bases para los siguientes experimentos que se presentan en este anexo.

En resultados previos (Capítulo I), basado en un análisis de redes de coexpresión genética, planteamos la hipótesis de la interconexión entre los mecanismos de respuesta a la hipoxia y los mecanismos de defensa relacionados con el JA en *A. thaliana* después de su interacción con *T. atroviride*. En este trabajo nos centramos en los 150 nodos HUB (Nodos centrales) propuestos en nuestro trabajo previo para la red *A. thaliana*(*T. atroviride*). Posteriormente, utilizando un análisis de correlación entre el puntaje de autoridad y el grado de los nodos, observando una correlación $r_s=0.92$ (Figura 1_anexo A), considerando que la importancia de un nodo es proporcional a su número de aristas, seleccionamos un grupo (Top15) para probar nuestra hipótesis de interconexión. Generamos una nueva red (Figura 1_anexo A) con los miembros del grupo top15 y pudimos observar que se generó una red de mayor cohesividad disminuyendo así su diámetro de 3.09 a 0.99. En la lista de nodos HUB encontramos el locus *at5g47520* que codifica para un factor de transcripción ERF071 de la familia de los ERF-VII. Se sabe que los ERF-VII son necesarios para hacer frente a la hipoxia en las plantas (Loreti & Perata., 2020; Giuntoli & Perata., 2018). ERF-VII tiene una cisteína N-terminal que sirve como sensor de oxígeno. La oxigenación de ERF-VII se lleva a cabo mediante las cisteínas oxidasas vegetales (PCO). En nuestros nodos HUB, además se encuentra el locus *at5g15120* que codifica PCO1. Interesantemente, *at5g15120* tiene una correlación de 0.95 con *at5g47520* (Figura 2_anexo B), debido a esto y a los informes en la literatura con proteínas homólogas, planteamos la hipótesis de que la interacción entre los nodos *at5g15120* y *at2g47520* representa una interacción proteína-proteína (IPP). Por estos motivos sugerimos que una correlación ≥ 0.95 es un buen parámetro de inicio para proponer interacciones físicas; en condiciones de normoxia, ERF-VII (*at2g47520*) es oxigenado por PCO1 (*at5g15120*) para degradarse a través del proteosoma. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Abbas et al (2022) donde observaron que PCO1 y ERF071 evidenciaron una interacción proteica mediante un análisis de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Durante la hipoxia no hay oxígeno como sustrato para PCO1 y los ERF-VII se translocan al núcleo donde regulan los genes de respuesta a la hipoxia y de manera directa o indirecta los genes de defensa contra patógenos.

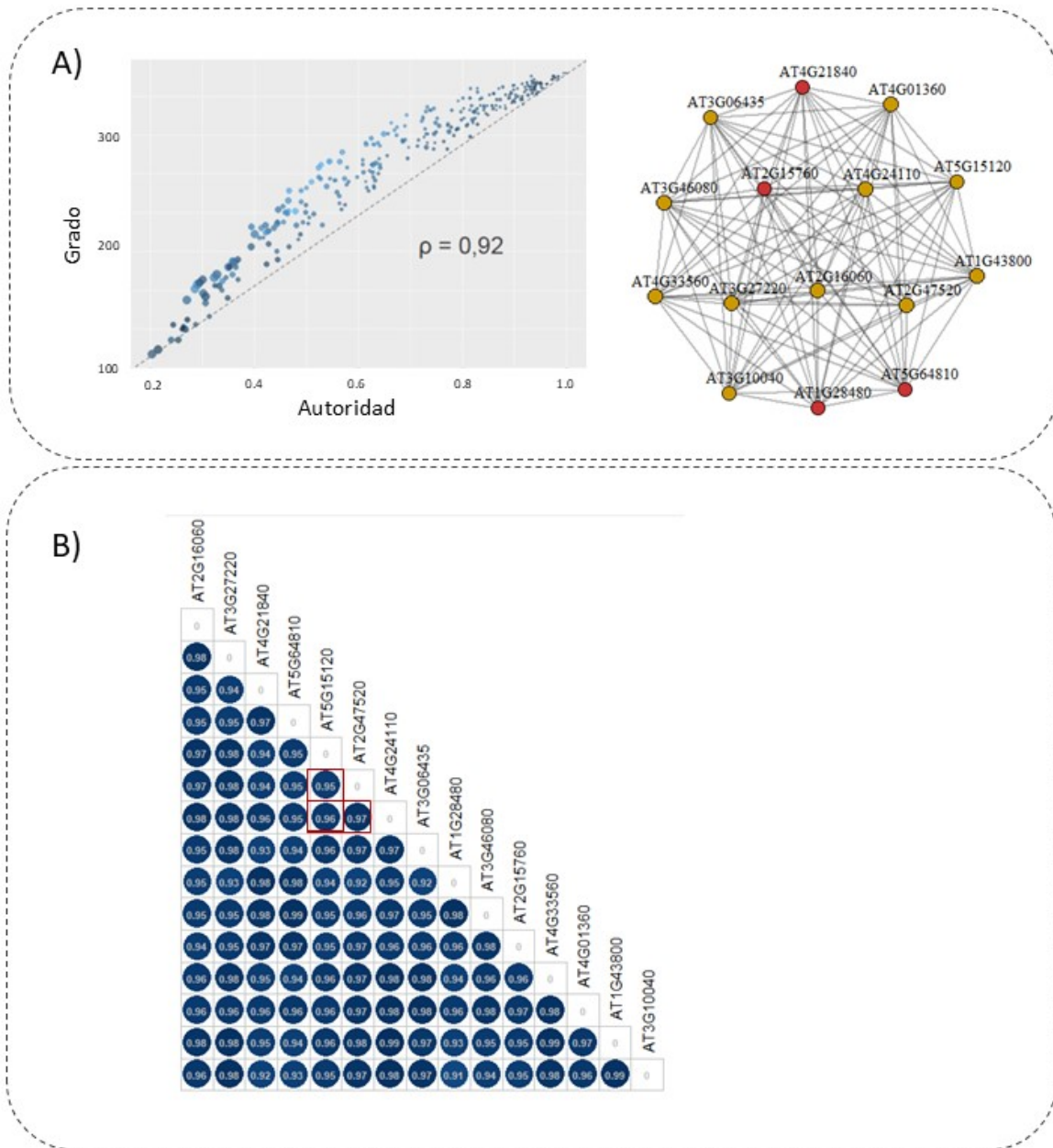


Figura 1_anexo. interacción física proteína-proteína (IPP) entre PCO1 y ERF071. A) Análisis de correlación entre la de grado y puntaje de autoridad (izquierda); Red de coexpresión genética (Top15 nodos). Los nodos amarillos representan genes con ontología génica en respuesta a la hipoxia; los nodos rojos son genes con ontología génica con mecanismos de defensa. B) Matriz de correlación entre nodos HUB (TOP15). El corplot muestra los valores de correlación de Spearman entre los nodos.

El mutante erf071 es susceptible a la hipoxia

Para recopilar evidencia experimental que respalde la participación de ERF071 en la hipoxia y la defensa de las plantas, se utilizaron líneas mutantes homocigotas erf071 y se desafiaron con patógeno necrótrofo *B. cinerea* y reto con hipoxia (48 h de inmersión en agua destilada (dH_2O) estéril en completa oscuridad).

ERF071 tiene una cisteína N-terminal que potencialmente se transloca al núcleo en ausencia de oxígeno para regular la expresión genética. Con el fin de confirmar esta interconexión de vías de señalización, generamos estrés hipóxico por inmersión en dH_2O estéril durante 48 horas en total oscuridad en las líneas Col-0 y erf071 con y sin interacción con *T. atroviride*.

El la mutante erf071 con interacción (erf071_(C/T)) resultó ser el grupo con mayor susceptibilidad a la hipoxia (Fig. 2_anexo) donde ninguna logró sobrevivir al doble estímulo (*T. atroviride* + hipoxia) a consecuencia de carecer de un gen que necesita para responder al doble estímulo, la mutante sin interacción erf071(S/T), aumentó su porcentaje de supervivencia al 37%. (Figura 2_anexo A). Por el contrario, la línea col-0 con interacción (col-0_(C/T)) resultó ser la que menor daño presentó, mostrando un porcentaje de supervivencia del 88%, cuando la línea WT no interactúa con el hongo (Col-0_(S/T)) el porcentaje de supervivencia disminuye al 63% (Figura 2_anexo A). Proponemos que la razón de esto es que el tratamiento previo con *T. atroviride* indujo ERF071 por adelantado, de tal manera que durante el desafiado posterior con hipoxia ya estaba preparado para mitigar el estrés. Nuestros resultados concuerdan con los informados anteriormente por Licausi et al (2010), donde analizan el papel central de ERF071 en la mitigación de la hipoxia después de trabajar con líneas sobreexpresantes de ERF071 y observar una tolerancia aumentada al déficit de O₂. Licausi et al (2010) mencionan que las plantas que sobreexpresaban ERF071 mostraron una mayor actividad de enzimas fermentativas como piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa y por ello mayor resistencia a la hipoxia.

En un estudio reciente Abbas et al (2022), propusieron una relación directa entre el contenido de clorofila y la adaptación a bajas concentraciones de oxígeno en *A. thaliana*, proponiendo que a menor concentración de oxígeno habrá menor concentración de clorofila. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Abbas et al (2022) (Figura 2_anexo), ya que la concentración de clorofila se vio afectada en la Col-0_(S/T) cuando esta línea fue sometida a hipoxia, pasando de 29.22 a 26.80 mg/mL de clorofila. En la figura 2B observamos cómo erf071_(S/T) y col-0_(C/T) también disminuyeron la concentración de clorofila tras inducir hipoxia. De acuerdo con nuestras observaciones de fenotipo (Fig. 2_anexo A) Col-0_(C/T) exhibió mayor resistencia a la hipoxia y al mismo tiempo evidenció el menor contenido de clorofila

después del tratamiento con hipoxia con 22,47 mg/mL. Por el contrario, la mutante erf071_(C/T), que resultó mostrar el daño más severo en la figura 2_anexo A, fue el único caso en el que la concentración de clorofila aumentó después de inducir la hipoxia pasando de tener 28.65 a 31.25 mg/mL. En conjunto, estos resultados indican que la planta modifica su metabolismo según su disponibilidad de oxígeno. Debido a que se requiere oxígeno para la síntesis de tetrapirrol, un precursor de la clorofila, creemos que col-0_(C/T) dejó de sintetizar clorofila debido a la deficiencia de oxígeno, lo que permitió a la planta mitigar el daño por hipoxia. En nuestro análisis transcriptómico del primer capítulo encontramos un enriquecimiento funcional en la senescencia foliar (GO:0010150) a las 96 hpi con *T. atroviride* (figura 4, capítulo 1). Se ha reportado previamente que la senescencia foliar va acompañada de una disminución en el contenido de clorofila. Pruzinská et al., (2005) menciona que durante la senescencia foliar la clorofila es catabolizada a metabolitos incoloros y sin fluorescencia. En este sentido sería interesante indagar sobre el rol de la clorofila como metabolito en la interacción planta-*Trichoderma*. Por el contrario, erf071_(C/T) continuó con la síntesis de clorofila a pesar de estar en condiciones hipóxicas, lo que llevó a su susceptibilidad al estrés por déficit de O₂ (figura 2_anexo B).

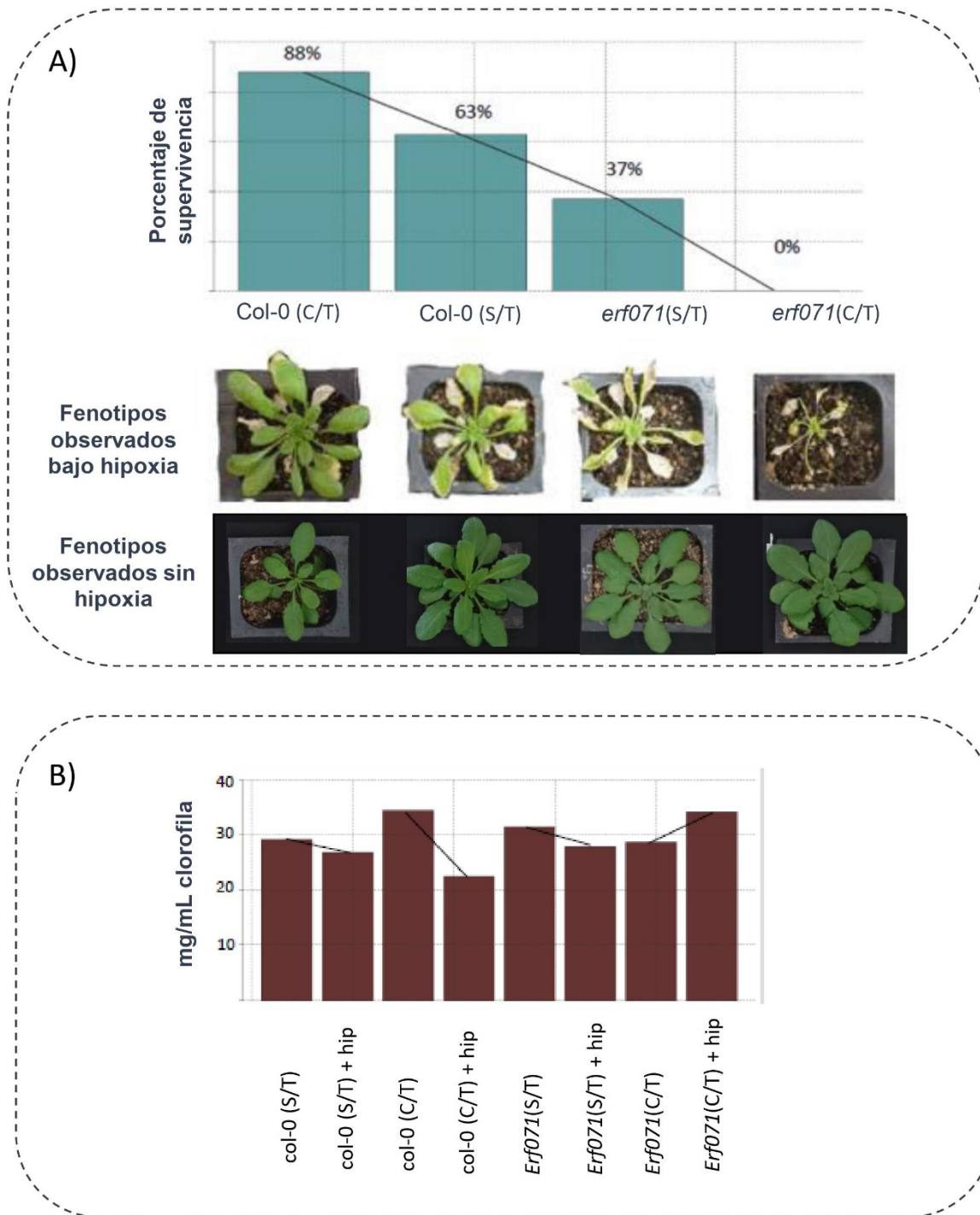


Figura 2_anexo. El mutante es susceptible a la hipoxia. A) Porcentaje de supervivencia en el eje x se presenta el % de supervivencia; el eje y representa los tratamientos B) Concentración de clorofila. El eje x presenta el contenido de clorofila en (mg/mL); el eje y presenta los tratamientos. Abreviaturas: hip:hipoxia; Col-0(S/T): línea WT sin interacción; Col-0(C/T): línea WT con interacción; erf071(S/T): línea mutante sin interacción; erf071(C/T): línea mutante con interacción;

La línea mutante erf071 es susceptible a *Botrytis cinérea*

ERF071 se encuentra el dominio proteico AP2/ERF (posición 49-106 aa) el cual está presente en proteínas con un rol en la resistencia a patógenos (Gutterson & Reuber., 2004). Para verificar si el factor de transcripción ERF071 (locus *at2g47520*) está involucrado en los mecanismos de defensa de la planta, realizamos un ensayo de desafío con patógeno usando al necrótrofo *B. cinérea* (Figura 3_anexo). Las líneas WT (Col-0) y el mutante erf071 se evaluaron con y sin interacción con *T. atroviride*. Las plantas que no fueron tratadas con *T. atroviride* fueron las que mostraron mayor daño foliar, con $\bar{x}=69.0 \pm 20$ y $69.9\% \pm 15.9$ de daño para col-0_(S/T) y erf071_(S/T), respectivamente (Figura 3_anexo A y 3_anexo B), sin diferencia estadística significativa (Figura 3_anexo A). Esta similitud entre el área de daño en estos grupos tiene sentido, ya que, aunque Col-0 tiene el locus *at2g47520*, que hipotetizamos es gen de defensa, no recibió el estímulo previo (inoculación con *T. atroviride*) que induce la expresión del mismo gen. Sin embargo, cuando Col-0 fue tratada previamente con *T. atroviride* (col-0_(C/T)), el área de daño disminuyó de 69 a 48,5 % en promedio, con un efecto significativo ($p.val=1.86 \times 10^{-3}$) cuando se utilizó el método no paramétrico de Kruskal Wallis test con un intervalo de confianza del 95% y el método False Discovery Rate (FDR) para comparaciones múltiples. Se observó una tendencia de menor área de daño en erf071_(C/T) cuando se compara con Col-0_(S/T) (Figura 3_anexo A) sin embargo no hubo efecto significativo. Sugerimos que erf071_(C/T) ganó cierta resistencia contra el patógeno al interactuar con *T. atroviride*, aunque no en la misma medida que col-0 porque no tiene todo su arsenal de genes de defensa. *B. cinerea* es un patógeno necrotrófico que induce la muerte celular en el huésped para colonizar. Para demostrar la muerte celular generada por el patógeno en *A. thaliana* utilizamos el ensayo de tinción con azul de tripán (Figura 3_anexo C). Este análisis cualitativo mostró que col-0_(S/T) y erf071_(S/T) evidenciaron tener el tejido foliar con mayor área de daño, seguidas de erf071_(C/T) y col-0_(C/T) que muestran la mayor resistencia.

El gen *PDF1.2* codifica una defensina vegetal y se utiliza como gen marcador para la ISR. Para confirmar si la resistencia a *B. cinerea* se debe a la inducción de la ISR analizamos la expresión de *PDF1.2* en Col-0 y el erf071 antes y después de su interacción con *T. atroviride*. Observamos que *PDF1.2* fue inducido en ambas líneas col-0_(C/T) y erf071_(C/T) después de su interacción, sin embargo, la inducción fue significativamente mayor ($p.val=0.01$) en Col-0_(C/T) que en erf071_(C/T) (Figura 3_anexo B). Estos resultados confirman nuestras observaciones previas en la determinación del porcentaje de daño foliar (figura 3_anexo A y 3_anexo B) donde ambas líneas exhiben menos daño foliar en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, Col-0_(C/T) resultó ser más eficaz para evadir el patógeno que el erf071_(C/T).

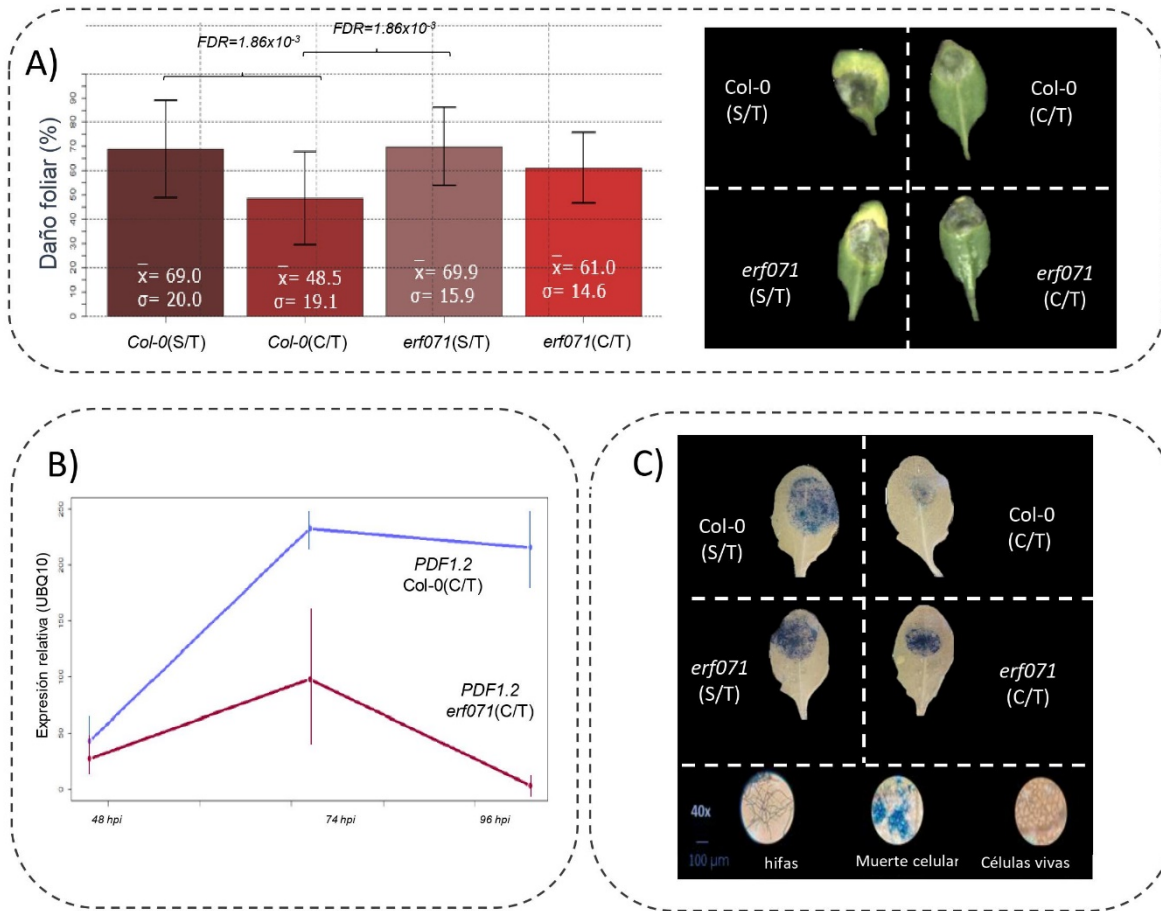


Figura 3_anexo. Ensayo de reto con patógenos. A) Porcentaje de área de daño foliar y observaciones de fenotipo. En el eje x se muestran los tratamientos, en el eje y se muestra el porcentaje de daño foliar. Se utilizó *B.cinerea* como patógeno necrotrófico; las barras negras representan la desviación estándar de tres replicas B) Expresión relativa de *PDF1.2*. Azul:WT; rojo: mutante. C) Muerte celular. La muerte celular se determinó mediante el ensayo de azul tripán.

Metodología anexo

Condiciones de crecimiento para *Arabidopsis thaliana* y *Trichoderma* spp.

Las condiciones de crecimiento fueron como se reportó en el capítulo 1. Brevemente, se utilizó el *A. thaliana* Col-0 y la mutante *erf071* (SALK_052858C) como plantas modelo de estudio y *T. atroviride* (imi206040) como organismo colonizador. *Trichoderma* spp. creció en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) a 28°C en oscuridad. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 y *erf071* (SALK_052858C) se esterilizaron mediante lavados consecutivos posteriormente se germinaron en medio Murashige y Skoog. Se incubaron durante ≈ 12 días a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

Ensayo de interacción *Arabidopsis thaliana*–*Trichoderma* spp.

El ensayo de interacción se realizó como se reportó en el capítulo 1. Brevemente, plantas de 12 días fueron inoculadas con *T. atroviride*. Para los grupos control se utilizaron plantas sin inocular. Posteriormente, se colectaron muestras biológicas a las 48, 72 y 96 horas. Las muestras colectadas fueron congeladas en nitrógeno líquido para su posterior uso.

Ensayo de respuesta a estrés hipóxico

Para evaluar la respuesta a hipoxia en plantas de *A. thaliana* col-0 y líneas mutantes *erf071* (SALK_052858C) se indujo estrés hipóxico por inmersión siguiendo el protocolo de Ni et al., (2019). Brevemente, se germinaron semillas de *A. thaliana* col-0 y líneas mutantes *erf071* (SALK_052858C) en medio Murashige y Skoog; a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 9 días. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas y crecieron con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad durante 10 días más. Posteriormente fueron inoculadas con *T. atroviride*. Se dejaron en readaptación 18 días más antes del ensayo de inmersión. Las plantas en maceta fueron sumergidas en dH_2O estéril hasta cubrir por completo el estrato superficial de tierra por 24 horas en completa oscuridad. Posteriormente se dejaron en recuperación 6 días para finalmente evaluar el porcentaje (%) de supervivencia.

Cuantificación de clorofila

La cuantificación de clorofila se realizó siguiendo el protocolo reportado por Sumanta y colaboradores (2014). Después del tratamiento con hipoxia se recolectaron las hojas de las plantas y se enjuagaron con dH_2O estéril. Se recolectó 1 gramo de hoja seca por planta. Se agregó 10 mL de metanol y se trituraron mecánicamente con mortero y pistilo. Posteriormente, la muestra fue centrifugada para separar las partículas sólidas (10,000 rpm; 1 min; 4°C). El extracto se diluyó

en metanol en las siguientes proporciones 1:10 v/v. Finalmente, se cuantificó la absorbancia de la solución con una longitud de onda 665.2 nm y 652.4 nm.

Ensayo reto con patógeno *Botrytis cinerea*

El ensayo de reto con patógeno se realizó siguiendo el protocolo reportado por Gonzalez-Lopez y colaboradores (2021). Plantas con dos semanas de edad fueron inoculadas con *T. atroviride* mientras que las plantas del grupo control se trataron con solución buffer. Dieciocho días después del tratamiento con *T. atroviride* se inocularon 24 hojas de 8 plantas usando al patógeno necrótrofo *B. cinérea*. Seis días después de la inoculación con *B. cinérea* se analizó el área de daño foliar con el software ImageJ. Los experimentos se realizaron por duplicado usando tres replicas técnicas en cada experimento.

Análisis bioinformático

En el capítulo anterior planteamos la hipótesis de una conexión de señalización entre los mecanismos de defensa de la planta y la hipoxia. Aquí filtramos la red de coexpresión *A.thaliana*(*T.atroviride*) centrándonos en aquellos genes con ontología génica en cuanto a proceso biológico de hipoxia y mecanismos de señalización de jasmonato. Posteriormente, se calculó las medidas de centralidad (grado, excentricidad, intermediación, cercanía y puntuación de autoridad) para cada uno de los 122 nodos y se generó una matriz de métricas con los datos (matriz de centralidad MC). La matriz MC se utilizó para los análisis estadísticos de correlación entre el grado y la puntuación de autoridad para cada nodo. Se seleccionó el top 15 para generar la red filtrada. Para calcular las métricas generales de la red se usaron el comando `diameter(x, directed = False, unconnected = True, weights = NULL)`.

Extracción de ARN

La extracción de material genómico se realizó como se reportó en el capítulo 1. Brevemente, el ADN fue precipitado con isopropanol a -20°C. La integridad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa [1%]. Para purificar el ARN, las muestras se trataron con ADNasa. El ARN se cuantificó en el equipo Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek®) a la DO de 260 y 280 nm (nanómetros). La integridad del ARN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante [1%].