



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**El RNA pequeño 1 de *Trichoderma atroviride* modula la  
colonización de la raíz y la inmunidad de *Arabidopsis  
thaliana* mediante el silenciamiento del gen *PRIM2***

Tesis que presenta

**Eyra Judith Hernández Hernández**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. J. Sergio Casas Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., febrero de 2026



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**El RNA pequeño 1 de *Trichoderma atroviride* modula la colonización de la raíz y la inmunidad de *Arabidopsis thaliana* mediante el silenciamiento del gen *PRIM2***” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Eyra Judith Hernández Hernández** y aprobada el **día 28 de enero de 2026** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

**Dr. J. Sergio Casas Flores**  
Director de la tesis

---

**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**  
Miembro del Comité Tutorial

---

**Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

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

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (No. 637779) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este proyecto fue financiado por el proyecto de Fronteras de la Ciencia: 2016-01-1538 otorgado al Dr. J. Sergio Casas Flores. Finalmente, agradecemos al LANBAMA por la secuenciación de muestras durante la realización del proyecto de tesis.

## Dedicatorias

### ***A mis maravillosos padres:***

*Porque aún separados por la distancia y el tiempo me conocen y siempre saben levantar mi ánimo y hacerme continuar. Si existe un Dios bondadoso, para mí ellos lo representan en esta tierra, ¡gracias!*

### ***A mis hermanos:***

*Marisol, Israel y Ana Rocío, mi definición de Hogar, ¡con ellos comparto la sangre, la vida, el camino, gracias!*

### ***A mi sobrinita:***

*¡Danna Carolina, por su presencia y su alegría, el alma nueva de la familia!*

## Agradecimientos

A la SECIHTI por la beca otorgada para realizar el posgrado.

Al IPICYT por brindarme los espacios para desarrollar el proyecto de tesis.

A mi director de tesis, el Doctor Sergio Casas, por su guía en cada paso de mi formación académica de doctorado y por su amistad.

A la Dra. Mitzuko, mi maestra, que con paciencia y dedicación me inició en el universo de las técnicas de biología molecular.

A mi comité de tesis, la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga, por contribuir con sus sugerencias al desarrollo de la tesis.

Al Dr. Saúl por su invaluable amistad y las recomendaciones que amablemente hizo para avanzar en los experimentos.

A Nicolás por su presencia y por sus valiosos consejos que me ayudaron a rescatar varios experimentos.

A Carmen González por su amistad transparente y por su auxilio en experimentos que no entendía.

A mis amigas Adriana, Mayra, Eva, Benita por su amor y su lealtad que me acompañaron durante el doctorado.

A mi tío el Padre Balta por cariño y consejos que me acompañan en mi desarrollo profesional.

A Fernanda Padrón por contribuir con su tesis de licenciatura a una parte de esta tesis, y por su paciencia en los experimentos con plantas.

A Dani Pacheco por su linda amistad y su cariño.

A Kin por su bonita amistad y su amabilidad dentro y fuera del laboratorio.

A Yaz, del L6, por transmitir su alegría en el ambiente de trabajo.

A Rafa por su amistad y por su disposición para ayudarme con análisis bioinformáticos.

A Emily por su cariño y su alegría que transmitió a todos en el laboratorio.

Al Dr. Gerardo por alentarme a continuar en los momentos que se pusieron difíciles.

A Montse, Vale, Rashmi, Zeltzin, Judith, por su compañía en el trabajo diario del laboratorio.

Fer Rosiles por su amistad y apoyo en experimentos.

A Guadalupe Gutiérrez por su apoyo con algunas técnicas moleculares.

A la Dra. Irene Beatríz Castaño por facilitarme reactivos para el western blot.

A la Dra. Ana María Estrada por su asesoría con la técnica de western blot.

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Antecedentes	8
Objetivo General	12
Objetivos específicos	12
Resultados	13
El <i>Ta_sRNA1</i> de <i>T. atroviride</i> regula negativamente los genes <i>PRIM2</i> , <i>JMJ19</i> y <i>WRR4</i> en <i>A.thaliana</i>	13
Los genes <i>PRIM2</i> , <i>JMJ19</i> y <i>WRR4</i> contribuyen positivamente al crecimiento vegetal, pero no son determinantes en su estimulación por <i>Trichoderma</i>	14
El <i>Ta_sRNA1</i> silencia post-transcripcionalmente al gen <i>PRIM2</i> , principalmente, a través del complejo AGO1 en <i>Arabidopsis</i>	19
El silenciamiento de <i>PRIM2</i> por <i>Ta_sRNA1</i> regula la colonización de la raíz por <i>Trichoderma</i>	22
<i>PRIM2</i> actúa como gen de susceptibilidad en respuesta a <i>B. cinerea</i> , pero no interfiere con la resistencia sistémica inducida por <i>Trichoderma</i>	24
El <i>Ta_sRNA1</i> silencia a <i>PRIM2</i> para equilibrar las respuestas PTI y ETI durante la infección por <i>B. cinerea</i>	29
Discusión	33
<i>Ta_sRNA1</i> actúa como un efector de RNA que regula finamente la expresión génica en <i>Arabidopsis</i> durante la colonización por <i>Trichoderma</i>	33
El gen de susceptibilidad <i>PRIM2</i> es blanco funcional del <i>Ta_sRNA1</i> , para modular la colonización de la raíz y el priming	34
El <i>Ta_sRNA1</i> silencia a <i>PRIM2</i> a nivel post-transcripcional mediante su asociación con el complejo AGO1 de <i>Arabidopsis</i>	36
Una acumulación excesiva del <i>Ta_sRNA1</i> compromete la activación de la resistencia sistémica inducida por <i>Trichoderma</i> , a través de la represión de <i>PDF1.2</i>	39
<i>PRIM2</i> coordina el balance entre las respuestas PTI y ETI durante la infección por <i>B. cinerea</i>	40
Conclusiones	41
Materiales y Métodos	44
Condiciones de crecimiento de plantas y microorganismos	44

Construcción de vectores sobreexpresantes de <i>PRIM2</i> y transformación de <i>A. thaliana</i>	45
Generación de la cepa sobreexpresante del <i>Ta_sRNA1</i> de <i>T. atroviride</i>	46
Ensayos de promoción de crecimiento y de reto con patógenos	47
Extracción de RNA total y análisis de expresión de genes	48
Ensayos de coexpresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	49
Preparación de genotecas de RNAs pequeños, secuenciación y análisis bioinformáticos	50
Ensayos de colonización de raíz por <i>T. atroviride</i>	51
Inmunoprecipitación de AGO1 y AGO2	52
Western blot	52
Detección de muerte celular y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en hojas de plantas retadas con <i>Botrytis cinerea</i>	53
Análisis estadístico	53
Literatura citada	54
Material suplementario	65
Anexo	82

## Lista de tablas

Tabla suplementaria 1. RNAs pequeños (sRNAs) de <i>T. atroviride</i> identificados mediante secuenciación de alta profundidad y sus principales genes diana predichos en <i>Arabidopsis thaliana</i> . Se utilizó la herramienta psRNATarget ( <a href="https://www.zhaolab.org/psRNATarget/">https://www.zhaolab.org/psRNATarget/</a> )	75
Tabla suplementaria 2. Genes blanco predichos del <i>Ta_sRNA1</i> en <i>A. thaliana</i> identificados mediante el programa psRNATarget	77
Tabla suplementaria 3. Porcentaje de identidad de la proteína JMJ19 con las 20 proteínas que contienen el dominio jumonji C en <i>A. thaliana</i>	79
Tabla suplementaria 4. Lista de oligonucleótidos usados en este estudio	80

## Lista de figuras

Fig. 1. El <i>Ta_sRNA1</i> de <i>T. atroviride</i> se acumula en presencia de <i>Arabidopsis</i> a diferentes tiempos	9
Fig. 2. La expresión de los genes blanco <i>PRIM2</i> y <i>JMJ19</i> , disminuyen en <i>A. thaliana</i> durante la interacción con <i>T. atroviride</i>	11
Fig. 3. El <i>Ta_sRNA1</i> de <i>T. atroviride</i> reprime la expresión de los genes <i>PRIM2</i> , <i>JMJ19</i> y <i>WRR4</i> en <i>Arabidopsis</i>	14
Fig. 4. <i>PRIM2</i> , <i>JMJ19</i> y <i>WRR4</i> regulan positivamente el crecimiento de <i>Arabidopsis</i> , pero no participan en su estimulación inducida por <i>T. atroviride</i>	18
Fig. 5. El <i>Ta_sRNA1</i> silencia post-transcripcionalmente al gen <i>PRIM2</i> , principalmente, a través del complejo AGO1 en <i>Arabidopsis</i>	21
Fig. 6. El silenciamiento de <i>PRIM2</i> por el <i>Ta_sRNA1</i> regula la colonización de la raíz por <i>T. atroviride</i>	24
Fig. 7. <i>PRIM2</i> actúa como gen de susceptibilidad frente a <i>B. cinerea</i> , pero no interfiere con la resistencia sistémica inducida por <i>Trichoderma</i>	28
Fig. 8. El <i>Ta_sRNA1</i> regula la homeostasis entre las respuestas PTI y ETI mediante el silenciamiento de <i>PRIM2</i> durante la infección por <i>B. cinerea</i>	32
Fig. 9. Modelo hipotético de la regulación de <i>PRIM2</i> mediada por el <i>Ta_sRNA1</i> y su impacto en la respuesta inmune de <i>Arabidopsis</i> durante la interacción con <i>Trichoderma atroviride</i>	42
Fig. suplementaria 1: Caracterización funcional del <i>Ta_sRNA1</i> y sus blancos predichos en <i>Arabidopsis</i> y cepa OE- <i>Ta_sRNA1</i> de <i>Trichoderma</i>	65
Fig. suplementaria 2. Caracterización molecular de las mutantes insercionales <i>prim2</i> , <i>jmj19</i> y <i>wrr4</i>	67
Fig. suplementaria 3. Estructura de dominios de <i>JMJ19</i> y alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con dominio <i>JmjC</i> de distintas especies vegetales	68
Fig. suplementaria 4. Superposición estructural de la proteína <i>JMJ19</i> con <i>JMJ14</i> de <i>A. thaliana</i> y con <i>JMJD2A</i> de humano	69
Fig. suplementaria 5. Análisis funcional del silenciamiento de <i>PRIM2</i> por el <i>Ta_sRNA1</i> , en líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> sobreexpresantes de <i>PRIM2</i> , <i>STTM</i> y expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	70
Fig. suplementaria 6. El <i>Ta_sRNA1</i> de <i>T. atroviride</i> es transferido a células de la raíz de <i>A. thaliana</i> en donde se asocia a las proteínas AGO1 y AGO2	71
Fig. suplementaria 7. El <i>Ta_sRNA1</i> se detectó en las fracciones inmunoprecipitadas (IP) de AGO1 y AGO2	73
Fig. suplementaria 8. Análisis bioinformáticos para la identificación de RNAs pequeños derivados de la interacción <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Trichoderma atroviride</i>	74

## Resumen

El RNA pequeño 1 de *Trichoderma atroviride* modula la colonización de la raíz y la inmunidad de *Arabidopsis thaliana* mediante el silenciamiento del gen *PRIM2*

*Trichoderma* spp. establece asociaciones simbióticas con las raíces de las plantas, promoviendo el crecimiento vegetal y activando la resistencia sistémica contra fitopatógenos. Durante esta interacción, *Trichoderma* libera RNAs pequeños (sRNAs) que pueden dirigirse contra genes del hospedero, modulando su fisiología para favorecer una relación mutuamente benéfica. No obstante, el papel específico de estos sRNAs aún no se ha caracterizado del todo. En este estudio, identificamos 31 sRNAs de *Trichoderma atroviride* que se acumulan durante la interacción con *Arabidopsis thaliana*. Nos centramos en el *Ta\_sRNA1*, que se acumula en fases temprana y tardía de la colonización. Demostramos que el *Ta\_sRNA1* es transferido a las raíces de *A. thaliana*, donde se carga en las proteínas ARGONAUTA 1 y 2, y dirige el silenciamiento postranscripcional de *PRIM2*, gen que codifica la subunidad grande de la primasa de DNA. El silenciamiento de *PRIM2* fue confirmado mediante el uso de líneas de *Arabidopsis* sobreexpresantes del *Ta\_sRNA1*, así como mediante cepas de *T. atroviride* que lo sobreproducen. En ambos casos, se observó una regulación negativa de *PRIM2*, validándolo como blanco funcional del sRNA. Estas líneas también presentaron mayor resistencia a *Botrytis cinerea*, correlacionada la inducción de genes de defensa, acumulación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y reducción de la muerte celular; indicando que el silenciamiento de *PRIM2* activa una respuesta tipo priming y potencia la señalización oxidativa característica de la inmunidad tipo PTI. Sin embargo, una sobreacumulación del *Ta\_sRNA1* en combinación con *Trichoderma* afectó negativamente la resistencia sistémica inducida (ISR), reflejada en una baja expresión de *PDF1.2*, alta expresión de *PR-1a* y mayor susceptibilidad a *B. cinerea*. Estos resultados sugieren que la dosis adecuada del *Ta\_sRNA1* es esencial para el equilibrio funcional entre las vías JA/ET y SA durante la activación de la ISR. Además, mutantes de *prim2* fueron más resistentes a *B. cinerea* y menos colonizadas por *Trichoderma*, mientras que las líneas sobreexpresantes de *PRIM2* mostraron un fenotipo opuesto. En conjunto, estos hallazgos establecen a *PRIM2* como un gen de susceptibilidad (gen-S) y posicionan al *Ta\_sRNA1* como un regulador central tanto de la colonización simbiótica como de la respuesta inmune frente a patógenos.

**PALABRAS CLAVE.** Molécula efectora, interacción hongo-planta, priming, señalización JA/ET, resistencia sistémica inducida, gen de susceptibilidad (gen-S), *Botrytis cinerea*.

## Abstract

The small RNA 1 of *Trichoderma atroviride* modulates root colonization and immunity in *Arabidopsis thaliana* through silencing of the *PRIM2* gene

The establishment of symbiotic associations between *Trichoderma* fungi and plants enhances the plant growth and resistance to pathogens that cause disease. During the interaction, *Trichoderma* spp. can release small RNAs (sRNAs) that may target host genes, potentially, facilitating the development of a mutual beneficial relationship, but the precise role of sRNAs remains unclear. In this study, we performed sRNA deep-sequencing and identified 31 candidate sRNAs produced by *Trichoderma atroviride* that exhibit significant changes in accumulation levels when cocultured with *Arabidopsis thaliana*. Among these, we examined the role of *Ta\_sRNA1* from *Trichoderma* a highly abundant sRNA, with biphasic accumulation during plant interaction. We demonstrated that *Ta\_sRNA1* is transferred to plant roots, where it associates with *A. thaliana* ARGONAUTE (AGO) -1 and AGO2 proteins. Once inside the plant cells, *Ta\_sRNA1* targets the *PRIM2* gene, encoding the large subunit of DNA primase. In *Arabidopsis*, *Ta\_sRNA1* overexpression or inoculation with a *Ta\_sRNA1*-overexpressing strain reduced *PRIM2* transcript levels, validating *PRIM2* as a functional in planta target. The *Ta\_sRNA1* overexpressing lines displayed enhanced resistance to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*, accompanied by increased expression of defense-related genes, elevated hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) accumulation and reduced cell death. These phenotypes indicate that *Ta\_sRNA1* promotes priming activation and PTI-associated ROS production by repressing *PRIM2*. However, sustained *Ta\_sRNA1* accumulation disrupted *Trichoderma*-induced systemic resistance (ISR), correlating with reduced *PDF1.2* and elevated *PR-1a* expression, suggesting that fine-tuned sRNA dosage is essential for maintaining JA/ET-SA equilibrium during ISR. Moreover, *Arabidopsis prim2* mutant exhibited enhanced resistance to *Botrytis* and were less root colonized by *Trichoderma*, as *Ta\_sRNA1* overexpressing lines; whereas overexpression of *PRIM2* resulted in increased susceptibility to the pathogen and showed more root colonization by *Trichoderma*, strongly supporting that *PRIM2* is a susceptibility gene. Altogether, our findings establish *Ta\_sRNA1* as a cross-kingdom regulatory RNA to control colonization and coordinate systemic immunity, positioning it as a central regulator of beneficial symbiosis and defense against *B. cinerea*.

KEY WORDS. Effector molecule, cross-kingdom, priming, induced systemic resistance (ISR), JA/ET signaling, *Botrytis cinerea*, susceptibility gene (S-gene).

## Introducción

En su ambiente natural, las plantas enfrentan factores bióticos y abióticos que afectan su crecimiento y desarrollo. Debido a su riqueza nutricional, estos organismos autótrofos son constantemente atacados por herbívoros, insectos, hongos, bacterias, virus, nemátodos y oomicetos. En consecuencia, en el curso de su evolución, las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa para detectar y combatir a los patógenos. Antes de activar su compleja inmunidad innata, las plantas cuentan con una capa pasiva de defensa contra patógenos no especializados. Esta capa está mediada por barreras físicas estructurales y químicas, que incluyen a la pared celular, una capa cerosa y compuestos antimicrobianos preformados, por mencionar algunos ejemplos (Dangl y Jones, 2001). Si los patógenos logran superar estas barreras pasivas, se activa la primera línea de inmunidad por la detección de patrones moleculares asociados a patógenos, a microbios, o a daño mecánico (PAMPs, MAMPs o DAMPs, respectivamente, por sus siglas en inglés), mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) localizados en la membrana celular de la planta. Esta interacción genera una respuesta inmune temprana, denominada “inmunidad desencadenada por PAMPs” (PTI, por sus siglas en inglés), la cual limitará la propagación de los patógenos (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Para contrarrestar la PTI algunos patógenos han desarrollado moléculas efectoras para suprimir esta respuesta y que desencadena la susceptibilidad inducida por efector (ETS, por sus siglas en inglés). Como mecanismo adaptativo, las plantas cuentan con genes R, los cuales codifican para proteínas de resistencia, que reconocen a los efectores y desencadenan una respuesta más rápida y robusta, conocida como inmunidad activada por el efector (ETI, por sus siglas en inglés). La ETI es mediada por proteínas receptoras intracelulares con dominio de unión a nucleótido (NB) y dominio de repetidos ricos en leucina (LRR), que pertenecen a la familia de proteínas de receptores inmunes NLR. Las proteínas NB-LRR contienen, en el extremo N-terminal, el dominio Toll interleukin 1 receptor (TIR) o el dominio coiled-coil (CC) y son codificadas por los genes *R* (Jang-Kyun *et al.*, 2013; Huang *et al.* 2019). Un componente clave de la ETI es la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés), una respuesta

común contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, que dependen de tejido vivo durante las etapas iniciales de la infección. La HR también activa la resistencia sistémica adquirida (SAR, de sus siglas en inglés) en sitios alejados de la infección. La SAR se caracteriza por la acumulación de ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés) y de genes *RELACIONADOS A LA PATOGENICIDAD* (PR, por sus siglas en inglés) (Durrant y Dong, 2004). Por otro lado, los patógenos necrotróficos, insectos herbívoros o daño mecánico y los microorganismos benéficos, activan una vía de defensa dependiente de las fitohormonas jasmonato y etileno (JA/ET). Un marcador típico de la vía es la expresión del gen PDF1.2 (PLANT DEFENSIN 1.2). Cabe destacar que las vías del SA y del JA/ET son generalmente antagónicas, y el factor de transcripción NPR1 actúa como un modulador clave en esta interacción (Durrant y Dong *et al.*, 2004; Pieterse *et al.*, 2014).

El ataque por patógenos necrotróficos avirulentos, la colonización por microorganismos benéficos y señales abióticas puede inducir una respuesta de “priming” efectivo, que aumenta y fortalece las defensas de la planta frente a ataques posteriores de patógenos. Este proceso involucra cambios metabólicos, fisiológicos y epigenéticos que reprograman las respuestas de defensa. Estos cambios incluyen aumento de deposiciones de callosa en la pared celular, rápido cierre de estomas después de la detección de un patógeno, y alteraciones de la estructura de la cromatina, para aumentar el acceso a la maquinaria transcripcional, que deriva en aumento de los niveles de expresión de genes que codifican para factores de transcripción, relacionados con la defensa de las plantas (Van der Ent *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2014; Mauch-Mani *et al.*, 2017). En conjunto, el “priming” hace que la planta sea más efectiva en la defensa contra patógenos o a otros tipos de estrés.

Los patógenos necrotróficos, que dependen de células muertas del hospedero para su nutrición, secretan moléculas efectoras que interactúan específicamente con las proteínas de susceptibilidad del hospedero en una interacción tipo gen a gen para causar enfermedad (H.H. Flor, 1971). En estas interacciones, la resistencia solo ocurre cuando la planta expresa un gen *R* que codifica para una proteína que reconoce a la molécula efectora derivada, (directa o indirectamente) del gen *Avr* del patógeno correspondiente (Dangl y Jones, 2001).

Tanto los patógenos como los simbiontes mutualistas y los organismos plaga pueden secretar efectores en el espacio apoplástico (efectores apoplásticos) o introducirlos directamente en el citoplasma de la célula huésped (efectores citoplasmáticos) (Cai *et al.*, 2019). Estos efectores incluyen proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos secundarios que modulan diversas funciones fisiológicas del hospedero. Por ejemplo, varios patógenos bacterianos emplean el sistema de secreción tipo III, un mecanismo especializado que permite la inyección directa de proteínas efectoras al interior de la célula vegetal, donde interfieren con vías de señalización de defensa. Un ejemplo paradigmático es la coronatina, una fitotoxina producida por *Pseudomonas syringae*, que mimetiza al jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), la forma activa del ácido jasmónico (JA). Esta molécula se une al receptor COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE 1) promoviendo la degradación de los represores JAZ (*JASMONATE ZIM-DOMAIN*), lo que resulta en la activación de genes regulados por JA. Dado que las vías de defensa mediadas por JA y ácido salicílico (SA) son antagónicas, esta activación suprime la señalización por SA, debilitando así la respuesta inmune del hospedero y favoreciendo la infección por *P. syringae* (Liu *et al.*, 2021; Sakata *et al.*, 2021;). Por otro lado, los patógenos eucariotas suelen secretar proteínas efectoras dentro de las células vegetales a través de péptidos señal que dirigen su transporte mediante la vía secretora convencional. No obstante, se ha observado que algunos patógenos como *Magnaporthe oryzae* y *Phytophthora infestans* liberan efectores que carecen de esta señal canónica, lo que sugiere la existencia de rutas de secreción alternativas. Una de las más destacadas es el uso de vesículas extracelulares (EV, por sus siglas en inglés), las cuales han sido implicadas en el transporte de proteínas, metabolitos e incluso RNA hacia las células hospedero (Giraldo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017; Cai *et al.*, 2019). Esta vía no convencional representa una estrategia sofisticada de los patógenos para manipular la fisiología de la planta sin ser detectados fácilmente por los receptores de inmunidad asociados a patrones moleculares.

La efectividad de la respuesta inmune frente a una infección microbiana depende de una reprogramación génica compleja y precisa. Aunque numerosos estudios han profundizado en los receptores PRR, las proteínas de resistencia (R) y los efectores proteicos, en los últimos años ha cobrado relevancia el papel regulador de los RNAs

pequeños (sRNAs) y de la maquinaria de interferencia por RNA (RNAi). Estos componentes emergen como elementos clave en la regulación de la expresión génica durante la respuesta inmunes de las plantas, en la virulencia de los patógenos, así como en los procesos de comunicación planta-microbio (Huang *et al.*, 2019). Existe evidencia de que los sRNAs pueden actuar como moléculas efectoras móviles entre el huésped y sus organismos asociados, induciendo silenciamiento génico en *trans*. Estos RNAs participan en mecanismos de silenciamiento génico tanto a nivel transcripcional (TGS) como post-transcripcional (PTGS) (Brodersen *et al.*, 2008), y recientemente se han identificado como reguladores clave en las respuestas PTI y ETI (Weiberg *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). El silenciamiento por RNA inicia a partir de moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA). En plantas, los sRNAs se clasifican principalmente en microRNAs (miRNA) y *small interfering RNAs* (siRNAs, por sus siglas en inglés). Los miRNA se originan a partir de genes que codifican para miRNAs. Los miRNAs se generan a partir de genes codificantes específicos, transcritos en el núcleo por la RNA Pol II como pri-miRNAs, los cuales adoptan estructuras de tallo-asa. Estas estructuras son procesadas por la enzima ribonucleasa tipo III Dicer-like (DCL), que primero corta pri-miRNA para formar el pre-miRNA, y, posteriormente genera los miRNA maduros mediante un segundo corte en el núcleo. El dúplex maduro miRNA/miRNA\* es metilado en su extremo 3' por la metiltransferasa HEN1, lo que incrementa su estabilidad y protege contra degradación. Posteriormente, es transportado al citoplasma por la proteína HASTY1 (HST1). Por otro lado, los siRNAs se originan a partir de secuencias con repeticiones invertidas, transcritos sentido-antisentido o elementos transponibles. Estas secuencias son convertidas en RNA de doble cadena (dsRNA, *double stranded RNA*, por sus siglas en inglés) por la acción de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs, de sus siglas en inglés) en plantas. En eucariotas, las moléculas de dsRNA son procesadas por ribonucleasas tipo III, como Dicer o sus proteínas homólogas (*Dicer-like*), generando dúplex de sRNA de 21 a 24 nucleótidos (nt). Estos fragmentos se clasifican en diferentes tipos según su origen y función, incluyendo los siRNAs trans-acting (ta-siRNAs), siRNAs secundarios en fase (phasiRNAs), siRNAs derivados de transcritos antisentido natural (nat-siRNAs), siRNAs heterochromáticos (hc-siRNAs)

y siRNAs largos no codificantes (lncRNAs) (Deleris *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2019). Estos sRNAs ejercen su función reguladora mediante la interacción con proteínas de la familia ARGONAUTA (AGO), que forman el complejo silenciador inducido por RNA (RISC, por sus siglas en inglés). Este complejo es guiado hacia los transcritos blanco por complementariedad de bases, provocando su degradación o la inhibición de su traducción (Weiberg *et al.*, 2013). Ejemplos notables de esta comunicación bidireccional incluyen a miRNA166 y miRNA159, secretados por plantas de algodón para contrarrestar al hongo patógeno *Verticillium dahliae*. Estos miRNAs ingresan al hongo, y silencian genes relacionados con su virulencia, contribuyendo así a resistencia de la planta (Zhang *et al.*, 2016). En sentido inverso, *V. dahliae* libera sRNAs que se cargan en la proteína AGO1 de *Arabidopsis*, para reprimir genes de defensa de la planta y facilitar la infección (Wang *et al.*, 2016). Así mismo, el hongo necrotrófico *B. cinerea* produce sRNAs efectores como Bc-siR3.1 y Bc-siR5, que son secretados en células de *A. thaliana* y tomate (*Lycopersicon esculentum*), y emplean la maquinaria de RNAi de la planta para silenciar genes involucrados en la inmunidad, y promover su patogenicidad (Weiberg *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los sRNAs regulan de forma secuencial tanto activadores como represores de la inmunidad vegetal, modulando el momento y la intensidad de la respuesta inmune para garantizar una defensa eficaz, con un bajo costo energético durante la infección. Por ejemplo, en las etapas tempranas de la infección por *P. syringae*, el miR863-3p de *Arabidopsis* degrada a los mRNAs de dos reguladores negativos de la defensa, *ATYPICAL RECEPTOR-LIKE PSEUDOKINASE1 (ARLPK1)*, y *ARLPK2*, promoviendo así la activación de las respuestas inmunes. En etapas posteriores, el mismo miR863-3p reprime transcripcionalmente a *SERRATE (SE)*, un regulador positivo esencial para la acumulación del propio miR863-3p, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación negativa. El silenciamiento de *SE* reduce los niveles de miR863-3p, estableciendo un bucle de retroalimentación negativa que atenúa la respuesta inmune una vez controlada la infección (Niu *et al.*, 2016).

Aunque aún no se comprende del todo cómo los sRNAs son liberados hacia el hospedero, se ha propuesto que ciertos patógenos fúngicos de plantas emplean vesículas extracelulares (EVs) como vehículos para secretar y transferir sRNAs al

interior de las células vegetales, con el fin de manipular sus procesos celulares (Cai *et al.*, 2019). Estas EVs, esenciales para la comunicación célula a célula y las interacciones planta-microbio, pueden contener ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Cai *et al.*, 2019). Un ejemplo notable es el patógeno *B. cinérea*, capaz de internalizar EVs tipo exosomas liberadas por plantas de *Arabidopsis*. Dichas vesículas transportan sRNAs hacia las células fúngicas, donde silencian genes clave para su patogenicidad, interfiriendo así con su capacidad infectiva (Cai *et al.*, 2019).

Por otro lado, diversos microorganismos que habitan en la rizósfera contribuyen de manera positiva al crecimiento y salud de las plantas. Entre ellos destacan los hongos micorrízicos arbusculares y las bacterias del género *Rhizobium*, ambos capaces de establecer asociaciones simbióticas con una amplia variedad de especies vegetales. Los hongos micorrízicos forman micorrizas con la mayoría de las plantas terrestres, mientras que las bacterias rizobianas interactúan específicamente con leguminosas, induciendo la formación de nódulos radiculares donde fijan nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>), convirtiéndolo en forma asimilables para la planta y promoviendo así su desarrollo (Ren *et al.*, 2019). Recientemente, se ha descubierto que fragmentos de RNA derivados de RNAs de transferencia (tRFs) producidos por *Bradyrhizobium japonicum* pueden transferirse a plantas de soya (*Glycine max*). Una vez en la célula vegetal, estos tRFs se cargan en proteínas ARGONAUTA 1 (AGO1) y dirigen el silenciamiento por corte de mRNAs de genes que actúan como reguladores negativos de la nodulación. En consecuencia, los tRFs actúan como efectores trans-kingdom que promueven la formación de nódulos, favoreciendo así la simbiosis rizobiana (Ren *et al.*, 2019). La simbiosis entre las plantas y microorganismos benéficos, como hongos micorrízicos o bacterias rizobianas, no solo incrementa la disponibilidad de nutrientes, sino que también mejora las propiedades físicas y mecánicas del suelo, repercutiendo favorablemente en el rendimiento de los cultivos (Heydari *et al.*, 2021). Estudios bioinformáticos recientes sugiere que el hongo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* produce un miRNA, denominado Pmic-miR-8, con potencial para ser transferido a las células de *Eucalyptus grandis*, donde podría silenciar genes con

dominio NB-ARC, asociados a inmunidad, facilitando así la colonización micorrízica (Wong-Bajracharya *et al.*, 2022).

Por otro lado, la mayoría de las angiospermas establecen interacciones mutualistas con hongos promotores del crecimiento, como los del género *Trichoderma* (Salas-Marina *et al.*, 2011). Diversas especies, como *T. virens* y *T. atroviride*, son capaces de inducir resistencia sistémica en las plantas frente a patógenos necrotróficos y (hemi)-biotróficos. En particular, las proteínas Sm1 y Epl1 desempeñan un papel clave en la activación de las defensas sistémicas de plantas de tomate y *Arabidopsis*, además de estimular su crecimiento y desarrollo (Salas-Marina *et al.*, 2015). Estudios experimentales han demostrado que las vías de señalización activadas por *Trichoderma* están mediadas predominantemente por JA/ET y SA, las cuales actúan de forma diferenciada contra patógenos necrotróficos y hemibiotróficos, respectivamente (Salas-Marina *et al.*, 2011). El hongo *Trichoderma* spp. puede ser empleado como agente de biocontrol debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y oomicetos fitopatógenos, mediante competencia por nutrientes, antibiosis y micoparasitismo (Estrada-Rivera *et al.*, 2020; Dautt-Castro *et al.*, 2020). Además, se han identificado componentes clave de la maquinaria de sRNAs en *Trichoderma*. Su genoma codifica tres proteínas Argonauta (*ago1*, *ago2* y *ago3*), dos enzimas Dicer (*dcr1* y *dcr2*) y tres RNAs polimerasas dependientes de RNA (*rdr1*, *rdr2* y *rdr3*), lo que sugiere un papel relevante de los sRNAs en la regulación de las interacciones planta-hongo (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013; Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Villalobos-Escobedo *et al.*, 2022). Mutantes de *T. atroviride* en genes *Dicer*, presentan alteraciones en el desarrollo y metabolismo del hongo, y la delección de un microRNA-like (milRNA2) afecta significativamente su desarrollo, destacando la relevancia funcional de estos elementos reguladores (Villalobos-Escobedo *et al.*, 2022). Además, análisis de bibliotecas de sRNAs de cepas silvestre y mutantes por RNAi de *T. atroviride* revelaron que la mayoría de estos sRNAs dependen de Dcr2 (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013; Villalobos-Escobedo *et al.*, 2022). Estudios recientes sugieren que la maquinaria de sRNAs en *Arabidopsis thaliana* participa activamente en la promoción del crecimiento inducido por *Trichoderma*, en la activación de resistencia sistémica y en la represión del gen *NSP4*, que codifica la proteína especificadora de nitrilos 4, en respuesta a *T.*

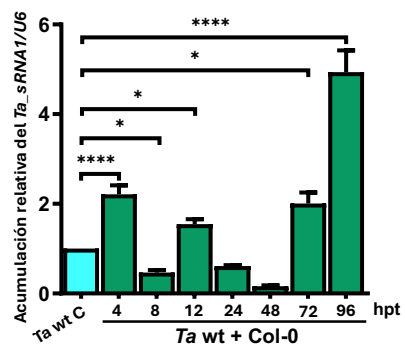
*atroviride*. Análisis bioinformáticos han identificado al menos 37 sRNAs fúngicos con potencial para dirigirse a genes de *Arabidopsis* durante esta interacción benéfica (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019; Rebolledo-Prudencio *et al.*, 2020). No obstante, hasta ahora, no existe evidencia experimental concluyente de que los hongos benéficos del género *Trichoderma* utilicen sRNAs como efectores para modular el establecimiento de relaciones mutualista con las plantas.

### **Antecedentes**

El presente proyecto se basa en un conjunto de genotecas de RNAs pequeños, generadas por nuestro grupo de trabajo a partir de raíces de *A. thaliana* inoculadas con *T. atroviride*, recolectadas en diferentes tiempos postinoculación: 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Los análisis bioinformáticos incluyeron la remoción de adaptadores y RNAs estructurales, así como la evaluación de la calidad de las lecturas. Posteriormente, los sRNAs se mapearon contra los genomas de *T. atroviride* y *A. thaliana*, identificándose 6,650 sRNAs únicos de origen vegetal y 19,766 de origen fúngico. A partir de estos datos, se seleccionaron 31 sRNAs de *T. atroviride* (Tabla suplementaria 1) con base en tres criterios: 1) reproducibilidad entre réplicas biológicas; 2) predicción de blancos génicos en *A. thaliana*; y 3) ausencia de señales asociadas a productos de degradación (ver Materiales y Métodos). Entre ellos, se eligió un sRNA de 21 y 22 nucleótidos (nt) denominado *Ta\_sRNA1*, que presentó el mayor número de lecturas y un nivel de acumulación 5 veces mayor al del control. Análisis *in silico* indicaron que *Ta\_sRNA1* podría dirigirse a diversos genes de *A. thaliana*, utilizando un valor de expectación (“expectation value”)  $\leq 3.0$  como umbral de astringencia en la predicción de interacción con las dianas (Tabla suplementaria 2). Se seleccionaron tres genes diana potenciales de *Arabidopsis* por sus altos niveles de expresión durante la interacción con el hongo y a sus altos valores de afinidad predicha (expectación) con *Ta\_sRNA1*. Estos genes son: 1) *PRIM2*, que codifica la subunidad grande de la DNA primasa (TAIR) (Fig. suplementaria 1a); *PRIM2* ha sido implicado en la replicación del DNA y en la percepción y reparación del daño genómico en plantas; 2) *JMJ19* (*JUMONJI DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 19*), que codifica para un factor de transcripción de la familia Jumonji (TAIR), el cual contiene un dominio JmjC, asociado con actividad desmetilasa de histonas (Lu *et al.*, 2008; UniProt); 3) *WRR4* (*WHITE RUST RESISTANCE 4*), que

codifica para una proteína de resistencia de tipo TIR-NB-LRR, involucrada en la defensa frente al hongo *Albugo candida* (Borhan et al., 2008).

Para analizar la acumulación del *Ta\_sRNA1* en *T. atroviride* silvestre (wild-type) durante su interacción con *A. thaliana*, se realizó una cuantificación mediante stem-loop RT-qPCR, técnica especializada para medir la expresión de miRNAs (Chen et al., 2005; Varkonyi-Hellens, 2010). Como control endógeno se empleó el gen *U6* de *T. atroviride*. Se exploró su participación tanto en etapas tempranas de la interacción con la planta a las 4, 8, 12 y 24 horas post-tratamiento (hpt) como en etapas tardías (48, 72 y 96 hpt). Los resultados (Figura 1), mostraron que *Ta\_sRNA1* se acumula en el hongo a las 4 y 12 hpt, posteriormente, se encuentra transitoriamente reprimido a las 48 h postinoculación, pero su acumulación aumenta significativamente a las 72 h (1 vez más) y 96 h (4 veces más), en comparación con el hongo creciendo sin planta, lo cual sugiere un papel activo tanto en etapas iniciales como en etapas avanzadas de la interacción planta-hongo.

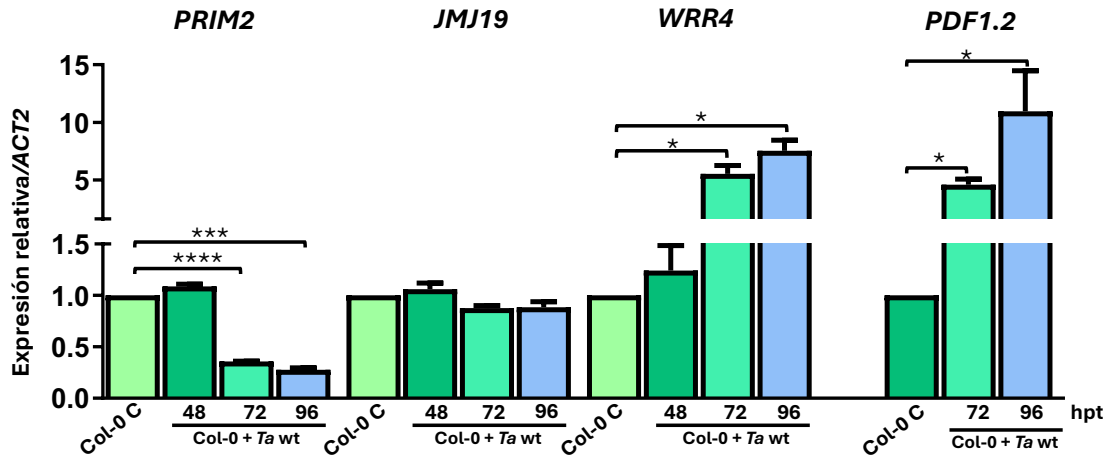


**Fig. 1. El *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* se acumula en presencia de *Arabidopsis* a diferentes tiempos.** Plantas de *A. thaliana* de 14 días fueron tratadas con *T. atroviride* wild-type (wt). El micelio fue recolectado a las 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas post-tratamiento (hpt) y se analizó la acumulación de *Ta\_sRNA1* mediante RT-qPCR con oligonucleótido “stem-loop”. La barra azul indica la acumulación del *Ta\_sRNA1* en *T. atroviride* (*T.a.* wt) en condiciones axénicas, mientras que las barras verdes corresponden a *T. atroviride* en interacción con *Arabidopsis* (*T.a.* wt + Col-0). El gen *U6* fúngico se utilizó como control endógeno para la normalización. La expresión relativa se calculó mediante el método de Livak y Schmittgen (2001). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (SEM) de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una

vía ( $\alpha \leq 0.05$ ); Se indican diferencias significativas con \* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Se evaluó la expresión de los genes diana predichos del *Ta\_sRNA1* (*PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4*) mediante RT-qPCR en raíces de *A. thaliana* tratada con *T. atroviride* y en plantas control no inoculadas, a las 48, 72 y 96 horas post-tratamiento (hpt). Los resultados mostraron que *PRIM2* fue significativamente reprimido a las 72 y 96 hpt. En contraste, *PDF1.2*, un marcador de resistencia que carece del sitio de unión para *Ta\_sRNA1*, mostró una inducción significativa durante la interacción con *T. atroviride* (Fig. 2). Posteriormente, se evaluó la expresión de *JMJ19* y *WRR4* para determinar si también eran reprimidos. *JMJ19* mostró una tendencia a la baja a las 72 y 96 hpt aunque sin alcanzar diferencia estadística. En el caso de *WRR4*, no se observó represión en estos tiempos; por el contrario, su expresión fue inducida (Fig. 2). No obstante, durante las etapas tempranas de la interacción (8, 12 y 24 hpt), *WRR4* sí mostró una disminución significativa en su expresión en comparación con plantas Col-0 sin inoculación a las 8, 12 y 24 hpt (Fig. suplementaria 1b). Por su parte, *JMJ19* solo presentó una regulación negativa significativa a las 4 hpt (Fig. suplementaria 1c), mientras que *PRIM2* fue el único que no mostró un incremento de expresión en ningún tiempo temprano analizado (Fig. suplementaria 1d), o cual refuerza su posible represión sostenida durante la interacción con el hongo. La comparación de la expresión de estos genes con los niveles de acumulación de *Ta\_sRNA1*, tanto en etapas tempranas como tardías (Fig. 1, Fig. 2 y Fig. suplementaria 1b-d), reveló una correlación negativa entre ambos. En particular, *PRIM2* mostró una expresión inversamente proporcional a la acumulación de *Ta\_sRNA1* en etapas tardías (Fig. 1 y Fig. 2), mientras que *WRR4* presentó una correlación negativa únicamente durante los tiempos tempranos de la interacción (Fig. 2 y Fig. suplementaria 1b). Estos resultados sugieren que el *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* podría modular la expresión de los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* en *A. thaliana*, lo que podría tener implicaciones en el desarrollo de la planta, la colonización de raíces por el hongo o la respuesta inmune inducida por *Trichoderma*. Además, se analizó si el *Ta\_sRNA1* se podía encontrar en hojas de Col-0 con y sin inoculación con *T. atroviride* wt. Los resultados no mostraron señal

de *Ta\_sRNA1* en hojas en interacción, ni en Col-0 control, comparadas con las líneas OE-At-sRNA1 (Fig. suplementaria 1e). Tampoco la expresión de *PRIM2* en hojas fue regulada a la baja con respecto a Col-0 control (Fig. suplementaria 1f). Estos resultados indican que la presencia y el efecto de *Ta\_sRNA1* es en la raíz de *Arabidopsis* en interacción con el hongo.



**Fig. 2.** La expresión de los genes blanco *PRIM2* y *JMJ19*, disminuyen en *A. thaliana* durante la interacción con *T. atroviride*. Plantas de *A. thaliana* de 14 días fueron tratadas *in vitro* con *T. atroviride* wt, y las raíces se recolectaron a las 48, 72 y 96 h de interacción (Col-0 + *T.a.* wt). La expresión de *PRIM2*, *JMJ19*, *WRR4* y *PDF1.2*, se evaluó mediante RT-qPCR, utilizando *ACT2* como gen de referencia. Plantas no inoculadas se usaron como control (Col-0 C). La expresión relativa se calculó mediante el método de Livak y Schmittgen (2001). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Se aplicó ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0.05$ ) para determinar diferencias significativas (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

## Objetivo General

Determinar el papel del *Ta\_sRNA1* en el silenciamiento de los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* de *A. thaliana*, como posibles blancos durante su interacción con *T. atroviride*, y su implicación en la modulación de una relación benéfica planta-hongo.

## Objetivos específicos

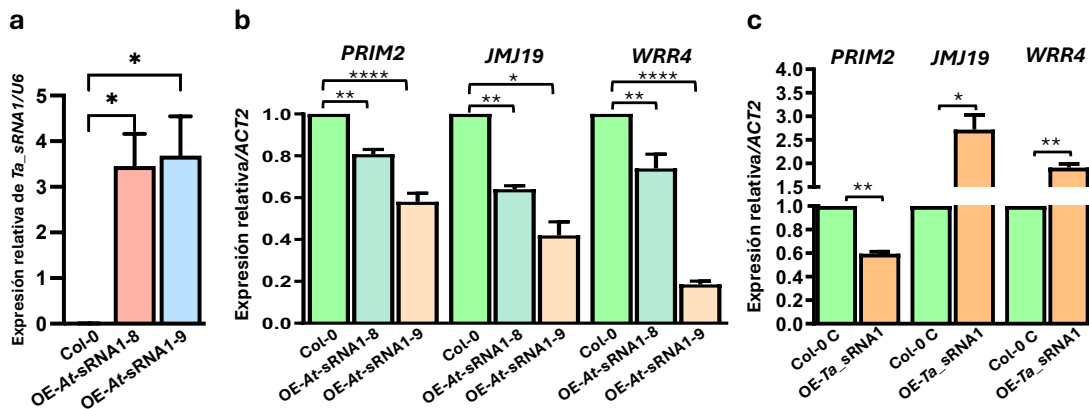
1. Evaluar la funcionalidad del *Ta\_sRNA1* producido por *T. atroviride* en la interferencia del mRNA de *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4*, utilizando líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el *Ta\_sRNA1*.
2. Determinar la contribución funcional del *Ta\_sRNA1* y de los genes blanco de Arabidopsis (*PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4*) en la promoción de crecimiento inducida por *T. atroviride*, empleando líneas mutantes de *A. thaliana*.
3. Analizar la interferencia del *Ta\_sRNA1* con el mRNA de *PRIM2* en un sistema heterólogo, utilizando tres estrategias: la versión silvestre, una versión mutante resistente al silenciamiento de *PRIM2* y una construcción STTM (Short Tandem Target Mimic) diseñada para bloquear específicamente al *Ta\_sRNA1*.
4. Caracterizar líneas que sobreexpresan *PRIM2* y *Ta\_sRNA1* en la inducción de resistencia sistémica contra patógenos necrotróficos, tanto en interacción con la cepa silvestre de *T. atroviride* como con una cepa que sobreexpresa el *Ta\_sRNA1*.
5. Establecer un modelo funcional que describa la participación del *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* en la modulación de los sistemas de defensa de *A. thaliana* y en la colonización de raíces, con el fin de favorecer el establecimiento de una interacción mutualista.

## Resultados

### **El *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* regula negativamente los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* en *A. thaliana***

Para confirmar el silenciamiento de los genes predichos como blancos del *Ta\_sRNA1* (*PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4*), se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 que sobreexpresan el *Ta\_sRNA1*. Para ello, se utilizó como base el precursor del miR319a, substituyendo la secuencia del miRNA por la del *Ta\_sRNA1* por medio de PCRs de empalme (Schwab *et al.*, 2006). Se seleccionaron dos líneas independientes estables, denominadas OE-*At-sRNA1*-8 y OE-*At-sRNA1*-9. La acumulación del *Ta\_sRNA1* fue cuantificada mediante “stem-loop” RT-qPCR (Chen *et al.*, 2005; Varkonyi-Hellens, 2010), mientras que la expresión de los genes blanco fue evaluada por RT-qPCR convencional. Las líneas OE-*At-Ta\_sRNA1*-8 y -9 presentaron un aumento de 2.0 y 2.5 veces (*fold change*) en la acumulación del *Ta\_sRNA1* respectivamente (Fig. 3a). Este incremento se correlacionó con una disminución significativa en la expresión de *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* en comparación con las plantas Col-0 (Fig. 3b), o que indica una posible regulación negativa mediada por el *Ta\_sRNA1* sobre estos genes.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de los mismos genes en raíces de plantas tratadas con una cepa de *T. atroviride* que sobreexpresa el *Ta\_sRNA1* (OE-*Ta\_sRNA1*). Para la construcción de esta cepa, se clonó la región del precursor del *Ta\_sRNA1* en el vector pHyg-GFP, bajo el control del promotor Ppki y el terminador *Tcbh2* de los genes que codifican para la piruvato cinasa (Zeilinger *et al.*, 1999) y para la cellobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* respectivamente (Casas-Flores *et al.*, 2006, ver Materiales y Métodos) (Fig. suplementaria 1f, g, h). En plantas inoculadas con esta cepa, únicamente *PRIM2* mostró una reducción significativa en su expresión a las 48 horas post tratamiento (hpt) (Fig. 3c). Estos hallazgos sugieren que el gen *PRIM2* es un blanco directo del *Ta\_sRNA1*, con un papel crucial en la interacción planta-hongo.



**Fig. 3. El *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* reprime la expresión de los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* en *Arabidopsis*.** a, b) Plántulas completas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y de las líneas sobreexpresantes OE-*At-sRNA1*-8 y -9 (bajo la regulación del promotor 35S del CaMV) cultivadas en medio MS durante 14 días, fueron utilizadas para la extracción de RNA total. a) La acumulación del *Ta\_sRNA1* fue cuantificada mediante stem-loop RT-qPCR en plántulas completas, utilizando al RNA pequeño *At-U6* como control interno para normalización. b) La expresión de *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* se evaluó mediante RT-qPCR en las mismas líneas transgénicas, empleando *ACT2* como gen de referencia y el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) para el análisis relativo de la de expresión. c) Niveles transcripcionales de los mismos genes en raíces de plántulas Col-0 tratadas con la cepa sobreexpresante OE-*Ta\_sRNA1* a las 48 hpt. Las barras de error representan el error estándar de la media /SEM). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA unidireccional ( $\alpha \leq 0,05$ ), con significancia indicada como: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

### Los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* contribuyen positivamente al crecimiento vegetal, pero no son determinantes en su estimulación por *Trichoderma*

Una de las principales ventajas de la colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *Trichoderma* es la estimulación del crecimiento vegetal (Salas-Marina *et al.*, 2011). Para determinar si el silenciamiento de los genes blanco predichos del *Ta\_sRNA1*, (*PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4*), está relacionado a esta promoción del crecimiento, se caracterizaron mutantes insercionales de T-DNA para dichos genes (Fig. suplementaria 2). Plántulas de 14 días de edad de las líneas Col-0, *prim2*, *jmj19* y *wrr4* fueron tratadas en la raíz con conidias de *T. atroviride* silvestre, y a los 18 dpt, se documentó su fenotipo y se determinó el peso seco. En condiciones sin

tratamiento, las mutantes *prim2*, *jmj19* y *wrr4* presentaron un crecimiento ligeramente reducido respecto a Col-0, aunque sin diferencias significativas (Fig. 4a-f). Tras la inoculación con *Trichoderma*, las tres líneas mutantes presentaron un fenotipo similar al de Col-0 tratada (Fig. 4a-f), evidenciando que la estimulación del crecimiento por el hongo se mantiene pese a la ausencia funcional de estos genes. Por tanto, la supresión de *PRIM2*, *JMJ19* o *WRR4* por el *Ta\_sRNA1* no está relacionada con la promoción del crecimiento vegetal inducida por *T. atroviride*.

Para confirmar el papel del *Ta\_sRNA1* en este fenómeno, se realizaron ensayos adicionales con líneas transgénicas sobreexpresantes del *Ta\_sRNA1* (OE-At-sRNA1-8 y -9). Al comparar estas líneas con Col-0 a los 18 dpt no se detectaron diferencias significativas en ausencia del hongo (Fig. 4g, h), aunque sí mostraron un menor peso seco comparadas con Col-0. Asimismo, al ser tratadas con *T. atroviride wt*, mostraron un incremento de biomasa comparable al de Col-0, confirmando que la regulación negativa de *PRIM2*, *JMJ19* o *WRR4* por el *Ta\_sRNA1* no participa en la inducción del crecimiento por *Trichoderma*.

Hasta este punto, los datos indican que *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* son blancos putativos del *Ta\_sRNA1*, pero sin un rol determinante en la estimulación del crecimiento vegetal inducido por *Trichoderma*. A nivel funcional, *JMJ19* codifica para una proteína con dominios jumonji C (JmjC), jumonji N (JmjN) y un dedo de zinc de tipo C5HC2 (zf-C5HC2) (Fig. suplementaria 3a), los cuales se asocian con la actividad de desmetilasa de histonas. Específicamente, el dominio JmjC de *JMJ19* podría tener actividad de desmetilasa de lisinas en los siguientes contextos H3K4me3, H3K4me2 y H3K4me1 (Lu *et al.* 2008). Aunque *JMJ19* carece de los residuos conservados esenciales para la unión a Fe(II) y  $\alpha$ -cetoglutarato (Fig. suplementaria 3b), indica que podría ser una desmetilasa no funcional (Qian *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016), existe evidencia contradictoria. *Arabidopsis* codifica al menos 20 proteínas con dominio jumonji (ver Tabla suplementaria 3). Entre ellas, *JMJ14* ha sido caracterizada como una desmetilasa de histonas funcional y pertenece al mismo grupo filogenético que *JMJ19* (Dutta *et al.*, 2017; Klose *et al.*, 2006; Tsukada *et al.*, 2006). En este trabajo de tesis, se realizó un modelado estructural de *JMJ19* y *JMJ14* de *Arabidopsis*. El análisis mostró que *JMJ19* conserva los residuos clave esenciales para la actividad catalítica del dominio JmjC,

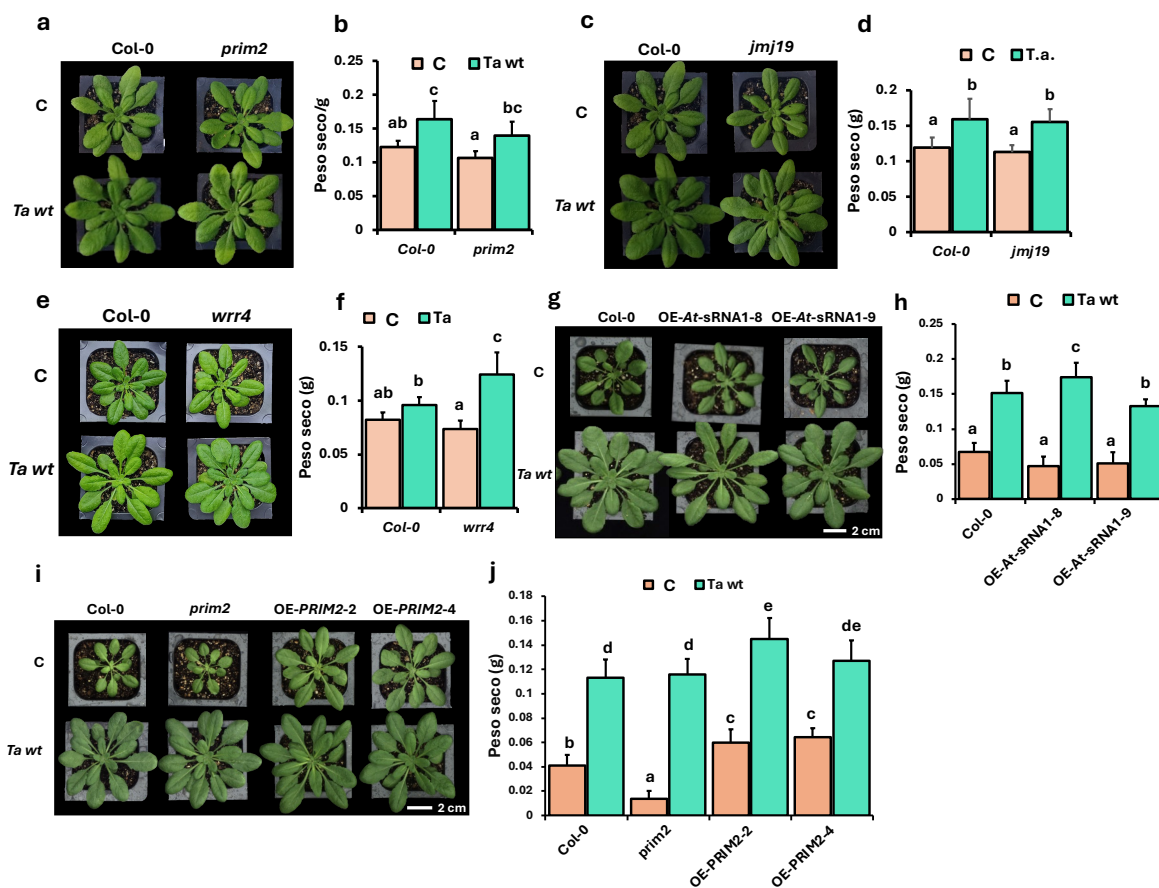
incluyendo los aminoácidos ácido aspártico 312 (D312) e histidina 397 (H397), esenciales para la coordinación de cofactores metálicos y la actividad desmetilasa (Fig. suplementaria 4a, b). Además, se observó una alta similitud estructural entre los dominios tipo dedo de zinc (zf-C5HC2) de ambas proteínas (Fig. suplementaria 4d). Por otro lado, se modeló también el dominio jumonji N (JmjN) de JMJ19, el cual mostró similitud estructural con el dominio JmjN de la proteína humana JMJD2A (Fig. suplementaria 4c), conocida por su actividad desmetilasa sobre lisinas H3K9 y H3K36 en sus formas di- y tri-metiladas. Estos hallazgos refuerzan la posibilidad de que JMJ19 conserve actividad enzimática, contrariamente a lo propuesto por estudios previos. El gen *WRR4* (también conocido como *WRR4A*) ha sido ampliamente caracterizado como un regulador positivo de la resistencia en *Brassicaceae* contra el patógeno biotrófico *Albugo candida*, agente causal de la roya blanca. Este gen está presente en varios ecotipos de *A. thaliana*, y en el ecotipo se han identificado 3 parálogos que codifican receptores inmunes de tipo TIR-NLR (Toll/Interleukin-1 Receptor–Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat). En particular, *WRR4A* confiere resistencia efectiva contra cuatro razas de *A. candida*, incluyendo la raza 2 (Ac2), raza 4 (Acem2), raza 7 (Ac7) y raza 9 (Ac9), como se ha demostrado en diversos estudios funcionales (Borhan *et al.*, 2008, 2010; Castel *et al.*, 2021; Redkar *et al.*, 2023). Estos hallazgos posicionan a *WRR4A* como un componente esencial de la inmunidad innata en *Arabidopsis*, capaz de reconocer y responder específicamente a distintos efectores de *A. candida*, y lo convierten en un blanco atractivo para estrategias de mejoramiento genético en especies afines.

Debido a una mayor consistencia observada en la regulación negativa de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1* y a la limitada información disponible sobre su posible papel en la defensa vegetal, se decidió enfocar el estudio funcional en este gen. *PRIM2* constituye un componente clave del complejo Pol  $\alpha$ -primasa en *Arabidopsis thaliana* (Pedroza-García *et al.*, 2019). Codifica para la subunidad grande de la DNA primasa, con alta homología a sus ortólogos de levadura y humano, y desempeña una función crucial en la replicación del DNA (Pedroza-García *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2018). *PRIM2* actúa como una RNA polimerasa especializada en la síntesis de cebadores (*primers*) de RNA, necesarios para iniciar la replicación. Esta enzima garantiza la generación precisa de *primers* de 9 nucleótidos, sintetizados por la subunidad

pequeña PRIM1, los cuales son posteriormente transferidos al sitio activo de la DNA polimerasa para continuar la replicación de la cadena (Baranovskiy et al., 2016; Jain et al., 2018; Yuan et al., 2020). En humanos, PRIM2 ha sido identificado como un blanco potencial para terapias contra el cáncer debido a su papel crítico en la división celular (Liu et al., 2014). En *Arabidopsis*, este gen se expresa durante el desarrollo embrionario de la semilla y participa en el estrés inducido por radiación gamma, lo que sugiere un papel conservado en la reparación del DNA entre especies (Xiang et al., 2011; Pathak et al., 2016; Jung et al., 2019). Además, estudios recientes en melón (*Cucumis melo*, accession K18) han asociado la resistencia de ciertas accesiones al Virus de Nueva Delhi del enrollamiento de las hojas del tomate (ToLCNDV, de sus siglas en inglés al Tomato leaf curl New Delhi virus), con un locus de resistencia cuantitativa (QTL) en el cromosoma 11. Un análisis de 100 genomas de melón reveló que todas las accesiones resistentes compartían una mutación conservada en el gen que codifica para la subunidad grande de la DNA primasa (*PRiL*), ortólogo de PRIM2 (Wei y Lozano-Durán, 2023). Sorprendentemente, el silenciamiento del gen *PRiL* en *Nicotiana benthamiana*, seguido de un reto con tres geminivirus distintos, resultó en una reducción significativa de la infección por los tres virus. Estos resultados indican que *PRiL* desempeña un papel importante tanto en la replicación viral como en la susceptibilidad de la planta a los geminivirus (Siskos et al., 2023).

Para caracterizar el gen *PRIM2* de *A. thaliana*, se generaron plantas transgénicas que sobreexpresan *PRIM2* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV, por sus siglas en inglés). Se seleccionaron las líneas OE-*PRIM2-2* y OE-*PRIM2-4* con base en la estabilidad del transgén y los niveles elevados de expresión génica (Fig. suplementaria 5a, b). Estas líneas fueron utilizadas para evaluar el papel funcional de *PRIM2* en la promoción del crecimiento vegetal inducido por *T. atroviride*. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de *PRIM2* condujo a un incremento significativo en el peso seco en comparación con plantas Col-0 no tratadas con *Trichoderma*, mientras que la línea mutante *prim2* presentó un fenotipo de menor crecimiento, evidenciando por una reducción en el peso seco (Fig. 4i, j). Estos resultados respaldan el papel positivo de *PRIM2* en el crecimiento vegetal, posiblemente relacionado con su función esencial en la

replicación del DNA (Jain *et al.*, 2018). Por otro lado, todas las líneas analizadas respondieron positivamente al tratamiento con *Trichoderma* (Fig. 4i, j). En particular, OE-PRIM2-2 y -4 mostraron una inducción adicional del crecimiento, lo que sugiere que la promoción del crecimiento vegetal inducida por *T. atroviride* no depende del silenciamiento de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1*. Por el contrario, esto indica que dicho silenciamiento podría estar vinculado en otros procesos biológicos distintos al crecimiento, posiblemente vinculados con la defensa o la regulación del ciclo celular.



**Fig. 4. *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* regulan positivamente el crecimiento de *Arabidopsis*, pero no participan en su estimulación inducida por *T. atroviride*.** Plántulas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y de las mutantes *prim2* (a, b), *jmj19* (c, d) y *wrr4* (e, f); de Col-0 y las líneas OE-At-sRNA1-8 y -9 (g, h); así como Col-0, *prim2* y las líneas OE-PRIM2-2 y -4 (i, j), fueron tratadas con *T. atroviride* silvestre (wt) a los 14 días de edad. a, c, e, g, i) Fotografías representativas del fenotipo de las plantas tomadas a los 18 dpt con el hongo. b, d, f, h, j) Peso seco promedio de plantas completas correspondientes a las líneas mostradas en las secciones a, c, e, g, i, respectivamente. Cada tratamiento incluyó tres réplicas biológicas independientes con 28 plantas por réplica. Las barras de error

representan el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

### **El *Ta\_sRNA1* silencia post-transcripcionalmente al gen *PRIM2*, principalmente a través del complejo AGO1 en *Arabidopsis***

Para confirmar si *PRIM2* es un blanco directo del *Ta\_sRNA1*, se realizaron ensayos de coexpresión transitoria en *N. benthamiana*. Se coinfiltraron construcciones que expresan el gen *PRIM2* en su forma silvestre (*PRIM2*-wt) o una variante mutante resistente al *Ta\_sRNA1* (*PRIM2*-m, con cinco mutaciones sinónimas que no alteran la secuencia de aminoácidos; Fig. suplementaria 5c), junto con el *Ta\_sRNA1* o una estructura STTM (Short Tandem Target Mimic) diseñada como “esponja” para inhibir su función (Peng *et al.*, 2018). Los resultados mostraron que la coinfiltración de *Ta\_sRNA1* con *PRIM2*-wt redujo significativamente la acumulación de *PRIM2* en comparación con los controles sin *Ta\_sRNA1* o con la variante mutante *PRIM2*-m (Fig. 5a). Asimismo, las plantas coinfiltradas con *Ta\_sRNA1*, *PRIM2*-wt y el STTM mostraron niveles más altos de expresión de *PRIM2* que aquellos coinfiltrados con solo *Ta\_sRNA1* y *PRIM2*-wt (Fig. 5a), lo que indica que el STTM bloquea eficazmente la actividad del *Ta\_sRNA1*. En conjunto, estos resultados demuestran que el *Ta\_sRNA1* es responsable del silenciamiento de *PRIM2*, probablemente al promover la degradación de su mRNA o inhibir su traducción.

Para comprobar la funcionalidad de la estructura STTM en *Arabidopsis*, se generaron las líneas transgénicas At-STTM-4 y At-STTM-8, seleccionadas con base en la estabilidad del transgén (Fig. suplementaria 5h, i). En comparación con las plantas Col-0 tratadas con *Trichoderma*, las líneas At-STTM-4 y -8 mostraron niveles significativamente más altos de *PRIM2* a las 72 y 96 hpt con el hongo (Fig. 5b). Estos resultados sugieren que el *Ta\_sRNA1* es secuestrado eficazmente por la estructura STTM, lo que impide su capacidad de silenciar a *PRIM2*.

Para determinar si el silenciamiento de *PRIM2* también afecta los niveles de proteína, se realizaron Western blots tras coinfiltraciones en *N. benthamiana*. Se detectaron niveles reducidos de la proteína de *PRIM2*-wt cuando se coexpresó con *Ta\_sRNA1*, mientras que la coinfiltración con STTM y *Ta\_sRNA1* restauró la

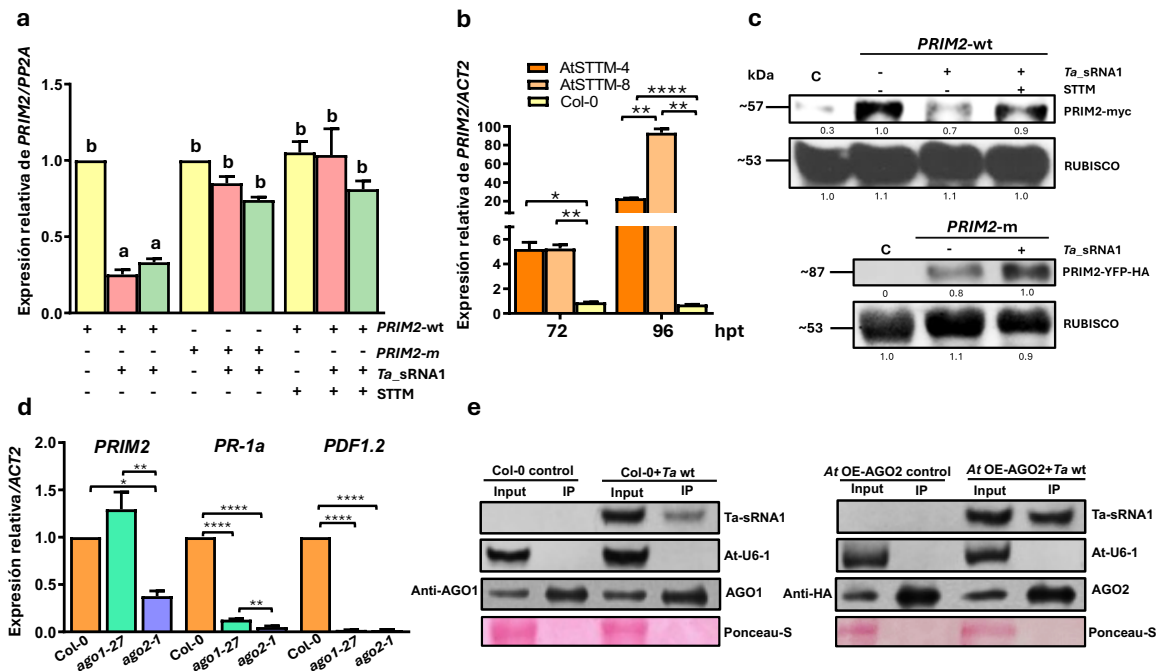
acumulación de la proteína (Fig. 5c, panel superior; Fig. suplementaria 5f, g). En contraste, la variante PRIM2-m en presencia de *Ta\_sRNA1* mostró niveles elevados de proteína incluso en presencia de *Ta\_sRNA1* (Fig. 5c, panel inferior; Fig. suplementaria 5h, i). Las muestras controles no infiltradas mostraron mínima señal con anticuerpos anti-myc o anti-HA, según correspondiera (Fig. 5c, panel superior e inferior). Estos hallazgos confirman que el *Ta\_sRNA1* suprime tanto la expresión de PRIM2 a nivel de RNA como su traducción, consolidando su papel como regulador postranscripcional clave en *Arabidopsis*.

Las proteínas AGO1 y AGO2 participan predominantemente en la carga de miRNAs y siRNAs, respectivamente, de 21-22 nt. Dado que el *Ta\_sRNA1* se predice con longitudes de 21 y 22 nt y presenta una Adenina (A) en su extremo 5' terminal, sugiere que es preferentemente cargado por el complejo de AGO2. Para evaluar el papel de AGO1 y AGO2 en la inmunidad vegetal y su relación con *PRIM2*, se analizó la expresión de los genes *PR-1a*, *PDF1.2* y *PRIM2* en raíces de plantas mutantes *ago1-27* y *ago2-1* de *Arabidopsis*. Los resultados mostraron una regulación negativa de *PRIM2* fue en la mutante *ago2-1*, mientras que en *ago1-27* se observó una ligera regulación positiva en comparación con Col-0 (Fig. 5d). Estos datos sugieren distintos roles de AGO1 y AGO2 en la regulación de *PRIM2*.

De manera interesante, los genes *PR-1a* y *PDF1.2* se encontraron significativamente regulados a la baja en raíces de *ago1-27* y *ago2-1* (Fig. 5d), lo que sugiere que ambas proteínas AGO están implicadas en la activación de la defensa sistémica contra patógenos. Estudios previos han reportado que las plantas *ago2-1* tratadas con *Trichoderma* y posteriormente retadas con *B. cinerea* mostraron un mayor daño por el patógeno en comparación con Col-0, mientras que las *ago1-27* exhibieron una resistencia incrementada frente a *Botrytis*, incluso sin tratamiento previo con *T. atroviride* (Rebolledo-Prudencio et al., 2022). Estos hallazgos sugieren la participación de AGO1 y AGO2 en la regulación de la ISR (Resistencia Sistémica Inducida) mediada por *Trichoderma*.

Para confirmar si el *Ta\_sRNA1* es cargado por AGO2 o AGO1 en *Arabidopsis*, se realizaron ensayos de interacción en plantas de *Arabidopsis* (Col-0 y líneas que sobreexpresan AGO2 fusionada a una etiqueta HA), utilizando un sistema de cocultivo con *Trichoderma* en el que las raíces estaban físicamente separadas del

micelio por una membrana de celofán, evitando el contacto directo. Se efectuaron inmunoprecipitaciones (IP) de AGO2-HA y AGO1 a partir de raíces colectadas a las 72 h de interacción con *T. atroviride* silvestre o con la cepa sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* (OE-*Ta\_sRNA1*), utilizando anticuerpos anti-HA y anti-AGO1), respectivamente. Los resultados revelaron que el *Ta\_sRNA1* se asocia tanto a AGO1 como a AGO2 en raíces en interacción tanto con *T. atroviride* silvestre (Fig. 5e; Fig. suplementaria 6a-b) como con la cepa OE-*Ta\_sRNA1* (Fig. suplementaria 6c-d). No se detectó *Ta\_sRNA1* en plantas sin contacto con el hongo. Además, la secuenciación de nueve clonas de cDNA del *Ta\_sRNA1* provenientes de IP-AGO1 e IP-AGO2 confirmó su identidad en ambos complejos (Fig. suplementaria 7). En conjunto, los resultados demuestran que el *Ta\_sRNA1* es transferido hacia las células de la raíz de *A. thaliana*, donde se incorpora principalmente en AGO1 y en menor grado en AGO2. Esto respalda su integración funcional en la maquinaria de silenciamiento de RNA en Arabidopsis para modular la expresión génica durante la interacción simbiótica con *Trichoderma*.



**Fig. 5. El *Ta\_sRNA1* silencia post-transcripcionalmente al gen *PRIM2*, principalmente, a través del complejo AGO1 en *Arabidopsis*.** a) Ensayo de co-expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se evaluaron los niveles relativos de *PRIM2* por RT-qPCR en hojas infiltradas

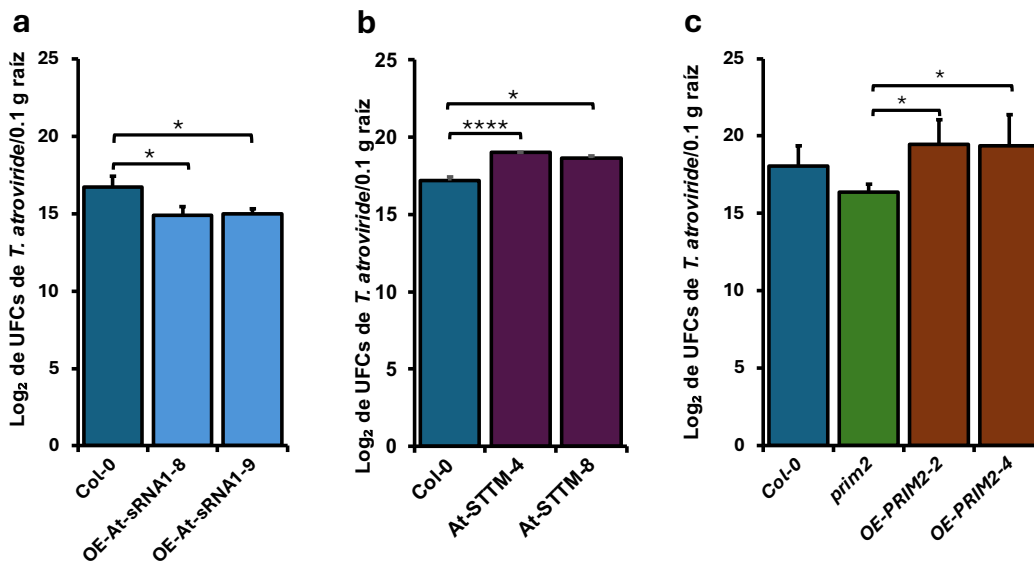
con combinaciones de *PRIM2*-wt o *PRIM2*-m (resistente al silenciamiento) y *Ta\_sRNA1*, con o sin el bloqueador STTM. De izquierda a derecha: vector vacío + *PRIM2* wt (barra amarilla); *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1* (barra naranja y verde, indican 2 plantas diferentes); vector vacío + *PRIM2*-m (barra amarilla); *PRIM2*-m + *Ta\_sRNA1* (barra naranja y verde, indican 2 plantas diferentes); *PRIM2*-wt + STTM (barra amarilla); *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1* + STTM (barra naranja y verde, indican 2 plantas diferentes). Se usó el gen *PP2A* de *N. benthamiana* como control endógeno. **b)** Expresión de *PRIM2* en raíces de plántulas Col-0 y líneas transgénicas At-STTM-4 y -8 tratadas o no con *T. atroviride* wt. El RNA se extrajo a las 72 y 96 hpt. La expresión de *PRIM2*-wt fueron determinados por RT-qPCR. El gen *ACT2* de *Arabidopsis* se utilizó como normalizador. **c)** Análisis de Western blot de *PRIM2*-wt (57 kDa, anti-Myc) y *PRIM2*-m (87 kDa, anti-HA) en hojas de *N. benthamiana* con los tratamientos descritos. Panel superior: *Nicotiana* control (C), *PRIM2*-wt sin el *Ta\_sRNA1*, *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1*, y *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1* + STTM (carriles 1, 2, 3 y 4). Panel inferior: C, *PRIM2*-m sin el *Ta\_sRNA1* y *PRIM2*-m + *Ta\_sRNA1* (carriles 1, 2 y 3). *Rubisco* se utilizó como control de carga. **d)** RT-qPCR de *PRIM2*, *PDF1.2* y *PR-1a* en raíces de plántulas Col-0 y mutantes *ago1-27* y *ago2-1*. *ACT2* se empleó como gen de referencia. **e)** Enriquecimiento del *Ta\_sRNA1* en fracciones inmunoprecipitadas de AGO1 y AGO2. Se usaron plantas Col-0 y líneas transgénicas con AGO2-HA crecidas *in vitro* sobre membrana de celofán e inoculadas con *T. atroviride* wt. La inmunoprecipitación (IP) se realizó con anticuerpos anti-AGO1 o anti-HA. El *Ta\_sRNA1* se cuantificó por stem-loop RT-qPCR antes y después de la IP. Las proteínas AGO1 y AGO2 se confirmaron por Western blot. Los cálculos de expresión relativa por RT-qPCR se realizaron siguiendo el método de Livak y Schmittgen (2001). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico para **b** y **d** se realizó con ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0,05$ ) y para ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0,05$ ). Letras diferentes o asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).

### **El silenciamiento de *PRIM2* por *Ta\_sRNA1* regula la colonización de la raíz por *Trichoderma***

Para determinar si el silenciamiento de *PRIM2* mediado por el *Ta\_sRNA1* influye en la colonización de la raíz por *Trichoderma*, se llevaron a cabo ensayos utilizando las líneas transgénicas OE-*At-sRNA1*-8 y -9. Plántulas de *A. thaliana* Col-0 y las líneas transgénicas fueron sumergidas en una suspensión de conidias de *Trichoderma* y

colocadas sobre papel filtro humedecido con agua estéril. A las 48 hpt, se cuantificaron las unidades formadoras de colonia (UFC) por cada 0.1 g de raíz. Las líneas OE-*At-sRNA1*-8 y -9 mostraron una colonización significativamente menor en comparación con Col-0 (Fig. 6a), lo que sugiere que el *Ta\_sRNA1* participa en la modulación de la colonización radicular por *T. atroviride*. En contraste, las líneas At-STTM-4 y -8, diseñadas para bloquear la actividad del *Ta\_sRNA1*, presentaron niveles de colonización superiores a los de las plantas Col-0 (Fig. 6b). Estos resultados refuerzan el papel del *Ta\_sRNA1* como regulador negativo de la colonización de raíces por *Trichoderma*, probablemente a través del silenciamiento dirigido de *PRIM2*.

Para evaluar el papel del gen *PRIM2* en la colonización de la raíz por *Trichoderma*, se realizaron ensayos similares utilizando plantas Col-0, *prim2* y líneas sobreexpresantes OE-*PRIM2*-2 y -4. Los resultados mostraron que las plantas mutantes *prim2* exhibieron una colonización significativamente menor en comparación con Col-0 (Fig. 6c), similar a la observada en las líneas OE-*At-sRNA1*-8 y -9 (Fig. 6a). En contraste, las líneas OE-*PRIM2* presentaron un aumento notable en el número de UFCs respecto a Col-0 (Fig. 6c). Estos resultados sugieren que *PRIM2* promueve positivamente la colonización de la raíz por *Trichoderma* y posiblemente de hongos patógenos. Con base en estos hallazgos, planteamos que el silenciamiento de *PRIM2* mediado por el *Ta\_sRNA1* constituye un mecanismo de control que restringe la sobrecolonización fúngica, evitando un daño excesivo al hospedero. Esta modulación fina probablemente favorece al hongo al estabilizar su nicho en la raíz, asegurando su persistencia en un entorno compatible.



**Fig. 6. El silenciamiento de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1* regula la colonización de la raíz por *T. atroviride*.** a-c) Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFCs) de *T. atroviride* en raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días de edad, bajo distintas condiciones genéticas: a) Col-0 y líneas OE-At-sRNA1-8 y -9; b) Col-0 y las líneas At-STTM-4 y -8. c) Col-0, mutante *prim2* y líneas OE-PRIM2-2 y -4. Las raíces fueron sumergidas en una suspensión de conidias de *T. atroviride* ( $1 \times 10^7$  conidias/mL), incubadas durante 48 h a 28°C sobre papel filtro humedecido y posteriormente esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio. Tras maceración y diluciones seriadas, las muestras se sembraron en medio PDA e incubaron durante 72 h a  $28 \pm 1$  °C. Las UFC se determinaron por cada 0,1 g de raíces y los datos se representaron en escala Log<sub>2</sub>. Plantas control fueron tratadas con agua estéril en las mismas condiciones. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Se aplicó ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0,05$ ) para el análisis estadístico. Asteriscos indican diferencias significativas (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P = 0,001$ ; \*\*\* $P = 0,0001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ ).

***PRIM2* actúa como gen de susceptibilidad en respuesta a *B. cinerea*, pero no interfiere con la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma***

Para investigar el papel del *Ta\_sRNA1* en la inmunidad vegetal, se realizaron ensayos en plantas de *Arabidopsis* Col-0 y en las líneas OE-At-sRNA1-8 y -9. Las plantas fueron tratadas o no en la raíz con conidias de *T. atroviride* wt. A los 18 dpt con *Trichoderma*, las plantas fueron desafiadas con el patógeno necrotrófico *B. cinerea*. Los resultados mostraron que las líneas OE-At-sRNA1-8 y 9 presentaron

un área de daño significativamente menor en las hojas comparadas con Col-0 sin tratamiento previo con *Trichoderma* (Fig. 7a, b), lo que sugiere que el silenciamiento de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1* aumente la resistencia a *B. cinerea*. Sin embargo, de manera inesperada, estas mismas líneas no mostraron resistencia sistémica inducida (ISR) tras el tratamiento con *Trichoderma*, a diferencia de las plantas Col-0 tratadas con el hongo (Fig. 7a, b). Estos resultados sugieren que el *Ta\_sRNA1* regula negativamente a *PRIM2* para promover resistencia contra patógenos, pero que la sobreexpresión del *Ta\_sRNA1* combinada con la inoculación con *Trichoderma* puede interferir con la inducción inicial de la ISR. Esto sugiere la participación de otros componentes adicionales de esta interacción simbiótica.

Para comprender la resistencia observada en las líneas OE-At-sRNA1-8 y 9 frente a *B. cinerea* sin tratamiento con *Trichoderma*, se analizaron los niveles de expresión de los genes marcadores de defensa *PR-1a* y *PDF1.2*. Ambos genes mostraron una inducción significativa en las líneas OE-At-sRNA1-8 y 9, siendo más pronunciada la expresión de *PDF1.2* (Fig. 7c). Este resultado sugiere que la resistencia observada podría estar mediada por la activación de la vía del JA/ET, la cual es efectiva contra patógenos necrotróficos como *B. cinerea*.

De manera interesante, las líneas OE-At-sRNA1-8 y -9 pretratadas con *Trichoderma*, mostraron una alta expresión de *PR-1a*, pero una marcada represión de *PDF1.2* (Fig. 7d). Este patrón indica una alteración en la activación de la vía de defensa mediada por JA/ET, lo cual podría explicar la disminución en la activación de la ISR mediada por *Trichoderma* (evidenciada por la baja expresión de *PDF1.2*, en comparación con *PR-1a*) (Fig. 7d). Esta desregulación podría contribuir al mayor daño foliar observado en estas líneas tras el reto con *B. cinerea*; además, de la posible alteración de otras rutas de defensa.

Para profundizar en el papel del *Ta\_sRNA1* en la simbiosis planta-hongo, se realizaron ensayos de reto con *B. cinerea* en plantas Col-0 pretratadas con la cepa silvestre de *T. atroviride* o con la cepa sobreexpresante OE-*Ta\_sRNA1* (Fig. suplementaria 1e-g). Las plantas Col-0 pretratadas con la cepa OE-*Ta\_sRNA1* presentaron mayor susceptibilidad al patógeno en comparación con aquellas pretratadas con la cepa silvestre (Fig. 7e, f), lo cual refleja un fenotipo similar al de las líneas OE-At-sRNA1-8 y -9 pretratadas con *Trichoderma* silvestre y luego

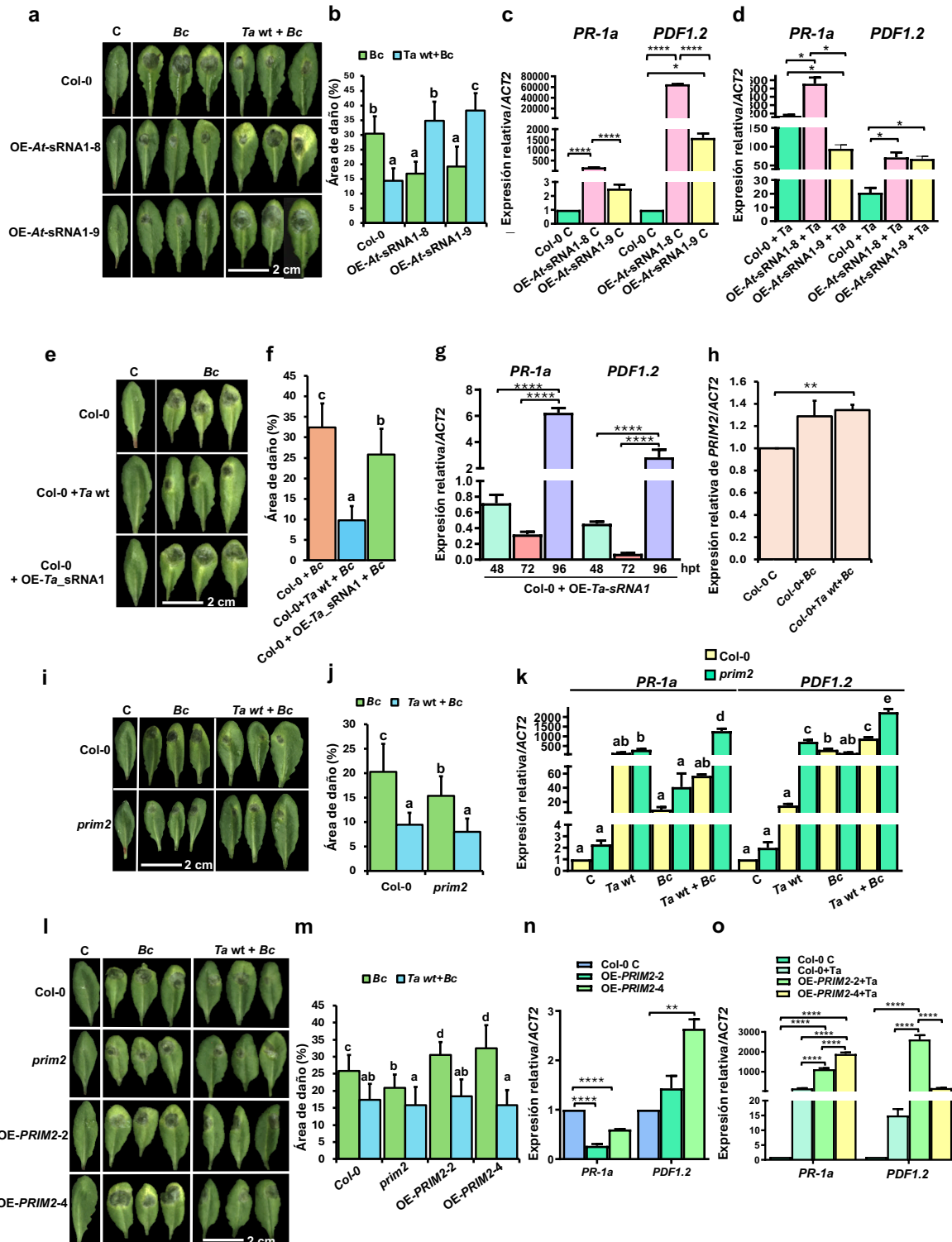
retadas con *B. cinerea* (Fig. 7a, b). Estos hallazgos sugieren que una acumulación excesiva o constitutiva del *Ta\_sRNA1* en la planta, junto con la colonización por *Trichoderma*, afecta negativamente la activación de una respuesta inmune efectiva. Adicionalmente, se evaluó la expresión de *PR-1a* y *PDF1.2* en plantas Col-0 pretratadas con la cepa OE-*Ta\_sRNA1*. Se observó una represión de ambos genes a las 48 y 72 hpt, seguida de una ligera inducción a las 96 hpt, siendo mayor para *PR-1a* que para *PDF1.2* (Fig. 7g). Este patrón sugiere que un retardo en la activación de la vía JA/ET, resultaría insuficiente para contrarrestar el ataque por *B. cinerea*. En conjunto, estos datos indican que una acumulación excesiva de *Ta\_sRNA1* interfiere con la activación adecuada de la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma*, especialmente en las etapas iniciales. Colectivamente, los datos apoyan la idea de que una liberación fina y regulada del *Ta\_sRNA1* en las células de la raíz de *Arabidopsis* es crucial para mantener el equilibrio funcional de la simbiosis, beneficiando tanto al hongo como a la planta.

Para investigar el papel *PRIM2* en la inmunidad vegetal, primero se evaluó su expresión en plantas Col-0 pretratadas o no, con *Trichoderma*, seguidas de un reto con *B. cinerea*. Los niveles de expresión fueron similares tanto en plantas únicamente infectadas con *B. cinerea* como en aquellas pretratadas con *Trichoderma* y posteriormente desafiadas con el patógeno (Fig. 7h), lo que sugiere una regulación convergente del gen en ambas condiciones. Para evaluar el papel funcional de *PRIM2*, se compararon las respuestas de plantas Col-0 y mutantes *prim2* tratadas o no con *T. atroviride* y retadas con *B. cinerea*. Las plantas *prim2* sin tratamiento previo mostraron una mayor resistencia al patógeno en comparación con Col-0. Sin embargo, la resistencia inducida por *Trichoderma* se mantuvo intacta en las plantas *prim2*, con un fenotipo comparable a Col-0 (Fig. 7i, j).

Para determinar si la resistencia observada en la mutante *prim2* frente a *B. cinerea* está relacionada con la activación de la vía del JA/ET, se analizaron los niveles de expresión de los genes marcadores de defensa *PR-1a* y *PDF1.2* en Col-0 y *prim2*. En ausencia de *Trichoderma*, la mutante *prim2* mostró una expresión significativamente mayor de ambos genes en comparación con Col-0 (Fig. 7k), un perfil similar al observado en las líneas OE-At-sRNA1 (Fig. 7c), lo cual podría explicar la menor severidad de las lesiones provocadas por *B. cinerea* en esta línea

(Fig. 7i). Además, tanto Col-0 como *prim2* tratadas con *Trichoderma* presentaron una inducción adicional de *PR-1a* y *PDF1.2* respecto a sus contrapartes sin tratamiento. Notablemente, *prim2* tratada con *Trichoderma* y retada con el patógeno mostró los niveles más altos de expresión de ambos genes (Fig. 7k), lo que sugiere que PRIM2 participa en la regulación negativa de la inmunidad de la planta y actúa como un gen de susceptibilidad (gen-S) frente a *B. cinerea*.

Para profundizar en la función de PRIM2 en la inmunidad vegetal, se llevaron a cabo ensayos de reto con *B. cinerea* utilizando líneas sobreexpresantes de *PRIM2*. Los resultados mostraron que las líneas OE-*PRIM2*-2 y -4 expuestas únicamente al patógeno, presentaron una mayor susceptibilidad al patógeno en comparación con las plantas Col-0. En contraste, las plantas mutantes *prim2* mostraron una reducción significativa en el daño causado por *B. cinerea*, en relación con Col-0 (Fig. 7l, m). Estos resultados refuerzan el papel de *PRIM2* como gen-S frente a *B. cinerea* y respaldan la hipótesis de que el *Ta\_sRNA1* contribuye a la resistencia al patógeno al silenciar a *PRIM2*, facilitando un estado de priming inmune efectivo contra la infección al comienzo de la ISR. Sorprendentemente, no se observaron diferencias en la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma* contra *B. cinerea* en las líneas evaluadas. Todas las plantas, incluidas las Col-0 y OE-*PRIM2*-2 y -4, mostraron una reducción similar en el daño foliar tras el tratamiento con *Trichoderma* (Fig. 7l, m). Estos resultados indican que PRIM2 no es el único que participa en la activación de la resistencia sistémica mediada por *Trichoderma*. Para complementar este resultado, se evaluó la expresión de los genes de defensa *PR-1a* y *PDF1.2* en las líneas sobreexpresantes OE-*PRIM2*-2 y -4, para determinar su relación con la susceptibilidad observada frente a *B. cinerea*. Los resultados mostraron que *PR-1a* se encuentra regulado a la baja en ambas líneas OE-*PRIM2*, mientras que *PDF1.2* presentó apenas una mínima inducción en comparación con las plantas Col-0 (Fig. 7n), lo cual podría explicar parcialmente el fenotipo de susceptibilidad observado. Sin embargo, al ser tratadas con *Trichoderma* las líneas OE-*PRIM2* mostraron una expresión incrementada de *PR-1a* y *PDF1.2*, en comparación con Col-0 (Fig. 7o). Este aumento en la activación de genes de defensa en presencia de *Trichoderma* explica la recuperación parcial de la resistencia frente a *B. cinerea*.



**Fig. 7. *PRIM2* actúa como gen de susceptibilidad frente a *B. cinerea*, pero no interfiere con la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma*.** a, e, i, l) Imágenes representativas del fenotipo de daño foliar bajo en diferentes condiciones: (a) Plantas Col-

0 y líneas OE-At-sRNA1-8 y -9, pretratadas con *Trichoderma* y desafiadas con *B. cinerea*; **(e)** Plantas Col-0 pretratadas con la cepa silvestre (wt) de *T. atroviride* o con la cepa sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* (OE-*Ta\_sRNA1*) y posteriormente retadas con *B. cinerea*; **(i)** Plantas Col-0 y mutante *prim2*, pretratadas con *T. atroviride* wt y desafiadas con *B. cinerea*; **(l)** Plantas Col-0, *prim2* y líneas sobreexpresantes OE-*PRIM2*-2 y -4 pretratadas con *T. atroviride* wt y retadas con *B. cinerea*. Controles (C) sin pretratamiento con *T. atroviride* ni infección con el patógeno en cada caso. **b, f, j, m)** Cuantificación del porcentaje de daño foliar cuantificado a partir de las imágenes de los paneles correspondientes **(a, e, i y l)**. **c, d, g, k, n, o)** Análisis de expresión relativa de los genes marcadores de defensa *PDF1.2* y *PR-1a* mediante RT-qPCR en plantas completas: **(c)** Plantas Col-0 y líneas OE-At-sRNA1-8 y -9 sin tratamiento con *Trichoderma*; **(d)** OE-At-sRNA1-8 y -9 pretratadas con *T. atroviride* wt; **(g)** Col-0 pretratadas con la cepa OE-*Ta\_sRNA1*; **(k)** Col-0 y *prim2* con o sin pretratamiento con *T. atroviride* wt e infección con *B. cinerea*; **(n)** Col-0 y OE-*PRIM2*-2 y -4 sin pretratamiento con *Trichoderma*; **(o)** Col-0 y OE-*PRIM2*-2 y -4 tratadas con *T. atroviride* wt. **h)** Expresión de *PRIM2* en plantas pretratadas o no con *T. atroviride* wt y posteriormente retadas con *B. cinerea*. La expresión relativa se normalizó contra el gen *ACT2* utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0,05$ ), para los paneles **c, d, g, h, n** y **o**, con asteriscos que indican diferencia significativa (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ) y mediante ANOVA de dos vías ( $\alpha \leq 0,05$ ), con prueba de comparación múltiple de Tukey para los paneles **b, f, j, k** y **m**, donde letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. Abreviaturas: Bc = *B. cinerea*; Ta wt = *T. atroviride* silvestre; Ta wt + Bc = *T. atroviride* silvestre seguido de infección con *B. cinerea*.

### **El *Ta\_sRNA1* silencia a *PRIM2* para equilibrar las respuestas PTI y ETI durante la infección por *B. cinerea***

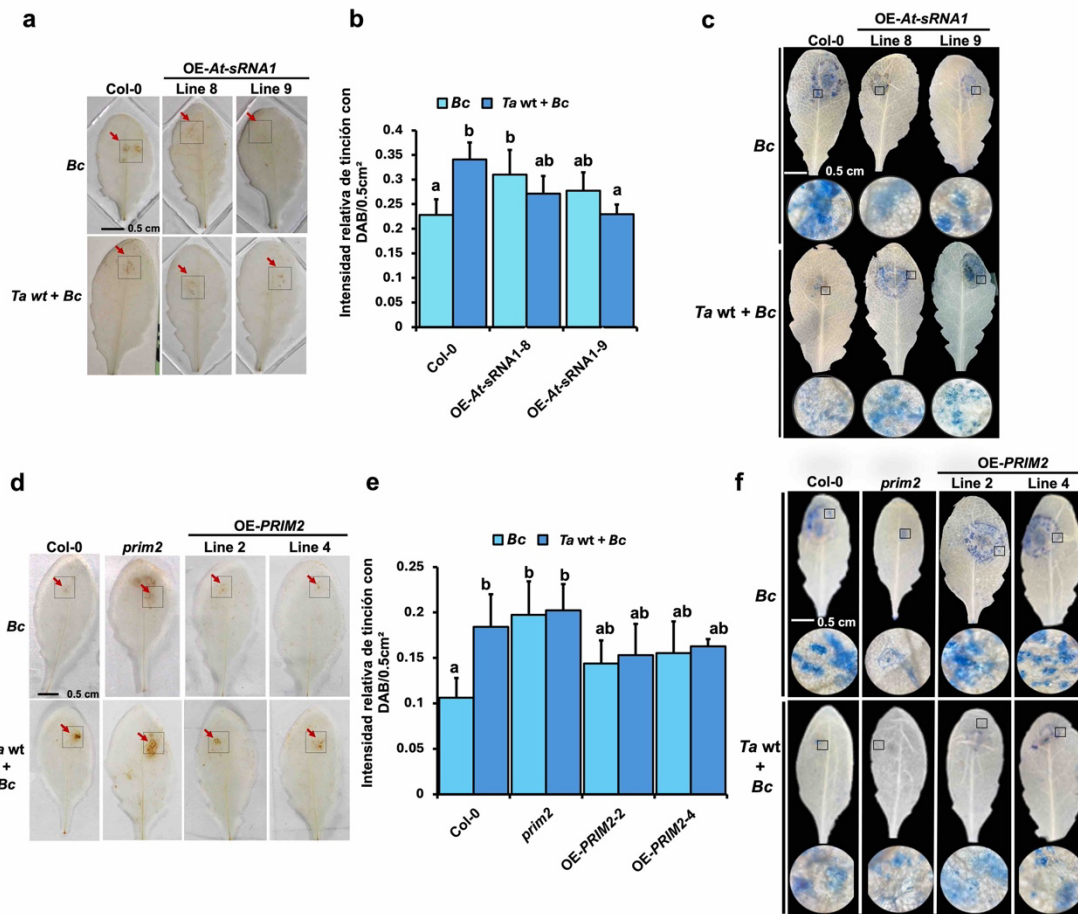
Dado que las líneas OE-At-sRNA1-8 y 9 no desarrollaron resistencia sistémica inducida por *Trichoderma* frente a *B. cinerea*, se exploró si el silenciamiento de *PRIM2* podría estar modulando el equilibrio entre las respuestas de inmunidad basal (PTI) y específica (ETI), ambas cruciales para contener a *B. cinerea*. Para ello, se utilizaron hojas de plantas Col-0 y de las líneas OE-At-sRNA1-8 y 9 pretratadas o no con *Trichoderma* y se les aplicó un desafío con *B. cinerea* a los 18 días post-tratamiento. La acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un marcador clave

de señalización por ROS común a PTI y ETI, se visualizó mediante tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB, de sus siglas en inglés) un día después de la infección (Daudi y O'Brien, 2012). Las hojas de las líneas OE-*At*-sRNA1-8 y -9 mostraron una acumulación significativamente mayor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con las hojas de Col-0 bajo las mismas condiciones (Fig. 8a, b), lo que sugiere una activación de las respuestas inmunes, posiblemente como resultado de una desregulación causada por el silenciamiento de *PRIM2*.

Este aumento en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de carácter sistémico y se correlacionó con un menor daño foliar en las líneas transgénicas OE-*At*-sRNA1-8 y -9, lo que sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempeña un papel positivo en la resistencia a patógenos necrotróficos como *B. cinerea*. Sin embargo, cuando estas mismas líneas OE-*At*-sRNA1-8 y 9 fueron pretratadas con *Trichoderma* antes del reto con *B. cinerea*, no se observó acumulación elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que si se detectó en plantas Col-0 pretratadas con *Trichoderma* (Fig. 8a, b). Este contraste es notable, ya que, en ausencia del hongo benéfico, las líneas OE-*At*-sRNA1-8 y 9 mostraron una mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como una mayor resistencia a *B. cinerea*. Estos hallazgos sugieren que el *Ta\_sRNA1*, al reducir los niveles de *PRIM2*, puede facilitar la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ausencia de *Trichoderma*, contribuyendo a una mayor resistencia contra *B. cinerea*. Sin embargo, cuando el *Ta\_sRNA1* se encuentra en exceso y coexiste con la presencia del hongo benéfico, este equilibrio se rompe: la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuye y la resistencia al patógeno se ve comprometida. Esto indica que una acumulación no regulada del *Ta\_sRNA1* interfiere con la correcta activación de respuestas inmunes ROS-dependientes durante la simbiosis. Un efecto inverso al observado en la producción de ROS fue detectado respecto a la muerte celular inducida por *B. cinerea*, a pesar de los altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las líneas OE-*At*-sRNA1-8 y -9 sin tratamiento con *Trichoderma*, mostraron una muerte celular reducida tras la infección con *B. cinerea*, evidenciada mediante la tinción con azul de tripano (Mulaosmanovic *et al.*, 2020), en comparación con las plantas Col-0. Esto sugiere una respuesta de tipo ETI más eficiente en las líneas transgénicas capaz de contener la progresión del patógeno. En contraste, estas mismas líneas pretratadas con *Trichoderma* y posteriormente desafiadas con *B. cinerea*, mostraron un incremento significativo en la muerte celular (Fig. 8e) a pesar de que los niveles

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eran bajos. Estos resultados sugieren que una PTI funcional y robusta puede limitar eficazmente la muerte celular provocada por el patógeno, mientras que su debilitamiento (como ocurre en presencia simultánea de *Trichoderma* y exceso de *Ta\_sRNA1*) favorece la necrosis. Por tanto, estos resultados apuntan a que un balance adecuado en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es crucial para evitar una muerte celular excesiva y lograr una defensa eficaz contra *B. cinerea*.

Para investigar el papel de *PRIM2*, en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en la muerte celular durante la infección con *B. cinerea*, se analizaron los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la tinción con azul de tripano en plantas Col-0, *prim2* y las líneas sobreexpresantes OE-*PRIM2*-2 y -4. La mutante *prim2*, inoculada únicamente con *B. cinerea* mostró una producción elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una reducción significativa en la muerte celular (Fig. 8d-f), un patrón similar al observado en las líneas OE-*At-sRNA1*-8 y -9 (Fig. 8a-c). Estos resultados respaldan la idea de que *PRIM2* participa como un regulador negativo de la producción de ROS asociada a la activación de la PTI. En contraste, las líneas OE-*PRIM2*-2 y -4 inoculadas con solo *B. cinerea* presentaron niveles reducidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> junto con una mayor muerte celular (Fig. 8d-f), lo cual concuerda con un estado de defensa comprometido. Además, cuando las líneas (Col-0, *prim2*, OE-*PRIM2*-2 y -4) fueron pretratadas con *Trichoderma* antes del reto con *B. cinerea*, se observó un aumento generalizado en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una disminución en la muerte celular (Fig. 8d-f). En conjunto, estos resultados indican que el silenciamiento de *PRIM2* tiene un papel en la inmunidad basal.



**Fig. 8. El *Ta\_sRNA1* regula la homeostasis entre las respuestas PTI y ETI mediante el silenciamiento de *PRIM2* durante la infección por *B. cinerea*.** **a, d)** Imágenes de hojas teñidas con DAB para detección de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ): **a)** Hojas de Col-0 y de líneas OE-At-sRNA1-8 y -9. **d)** Hojas de Col-0, la mutante *prim2* y las líneas OE-*PRIM2*-2 y -4, y. Las hojas se recolectaron a las 24 hpi con *B. cinerea*, se infiltraron con DAB y se destiñeron con una solución de etanol absoluto, ácido acético y glicerol antes de ser fotografiadas. Posteriormente, las hojas fueron fotografiadas. **b, e)** Cuantificación de la tinción con DAB en las áreas indicadas en las imágenes de los paneles **a** y **d**, respectivamente, mediante el software Fiji (ImageJ 1.54f). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías ( $\alpha \leq 0,05$ ) con prueba de comparación múltiple de Tukey; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. **c, f)** Análisis de muerte celular mediante tinción con azul de tripano. **c)** Hojas de Col-0 y líneas OE-At-sRNA1-8 y -9; **f)** Hojas de Col-0, *prim2* y OE-*PRIM2*-2 y -4. Las hojas se fotografiaron y también se observaron al microscopio óptico a 40× de aumento para evaluar el grado de muerte celular. Abreviaciones: Bc:

*Botrytis cinerea*; Ta wt + Bc: pretratamiento con *T. atroviride* silvestre seguido de infección con *B. cinerea*.

## Discusión

### ***Ta\_sRNA1* actúa como un efector de RNA que regula finamente la expresión génica en *Arabidopsis* durante la colonización por *Trichoderma***

El fenómeno conocido como silenciamiento génico transreino (*cross-kingdom RNA interference*), ha sido bien caracterizado en contextos de infección por hongos fitopatógenos (Weiberg et al., 2013; Cai et al., 2019), pero no tanto en interacciones de plantas con microbios benéficos (Ren et al., 2019; Wong-Bajracharya et al., 2022) y su función en relaciones mutualistas con hongos benéficos permanece poco explorada.

Estudios previos han demostrado que los componentes de la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNAi en *T. atroviride* son esenciales para su desarrollo y fisiología (Carreras-Villaseñor et al., 2013). En *Arabidopsis*, este mismo mecanismo es igualmente crucial tanto para establecer la interacción mutualista con *T. atroviride* como para activar respuestas de defensa específicas en la planta (Rebolledo-Prudencio et al., 2022). En este contexto, nuestros resultados muestran que el *Ta\_sRNA1* actúa como un efector inter-reino, capaz de transferirse a las células radiculares de *Arabidopsis* y silenciar postranscripcionalmente a *PRIM2*, un gen de susceptibilidad (gen-S) que modula la interacción planta-hongo. La acumulación del *Ta\_sRNA1* sigue un patrón bifásico, con una fase temprana (4-24hpt) y otra tardía (24-96 hpt), lo que sugiere funciones diferenciadas durante la iniciación y estabilización de la simbiosis. En etapas tempranas, la represión de *WRR4*, un receptor de tipo TIR-NB-LRR involucrado en la activación de la ETI mediada por SA (Borhan et al., 2008, 2010), podría servir para disminuir la respuesta de defensa dependiente de SA, lo cual podría restringir la entrada de *Trichoderma* a la raíz de la planta. (Alonso-Ramírez et al., 2014; Martínez-Medina et al., 2017). En etapas tardías, el silenciamiento de *PRIM2* contribuye a la modulación de la colonización de la raíz y al inicio del priming en *Arabidopsis*, en el comienzo de la ISR.

Por su parte, *JMJ19* codifica una posible desmetilasa específica de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) (Lu et al., 2008), una marca epigenética asociada con la activación de la activación transcripcional. Las variantes mono-, di- y tri-metiladas de H3K4 se encuentran comúnmente en regiones de genes activamente transcritos. Si bien la actividad enzimática de *JMJ19* aún no ha sido confirmada *in vivo*, estudios en su parólogo cercano *JMJ14*, perteneciente al mismo clado filogenético, han demostrado que actúa como una desmetilasa de H3K4me3 y H3K4me2 (Lu et al., 2010). Esto sugiere que *JMJ19* podría tener un papel similar en la remodelación de la cromatina durante respuestas a estímulos bióticos. No obstante, a diferencia de *PRIM2*, el silenciamiento de *JMJ19* por el *Ta\_sRNA1* no fue consistente en todos los contextos experimentales, lo que sugiere que su regulación podría estar restringida a etapas específicas de la interacción o requerir cofactores adicionales para ejercer su función. *JMJ14* ha sido caracterizado como un coactivador transcripcional de genes de defensa en plantas, actuando mediante la represión de reguladores negativos de la inmunidad (Li et al., 2020). En contraste, el caso de *JMJ19* resulta intrigante: por un lado, se predice como un factor de transcripción (FT); por otro, contiene un dominio JmjC asociado a actividad desmetilasa, lo cual no es típico en factores de transcripción clásicos. Esta dualidad funcional sugiere que *JMJ19* podría no ser un FT convencional, sino parte de un complejo regulador multifuncional, donde su papel como modulador de la expresión génica dependería más de su asociación con otras proteínas que de una unión directa al ADN. Un ejemplo análogo es la proteína Epe1 en *Schizosaccharomyces pombe*, que participa en la regulación epigenética sin actuar como FT *per se*, sino como cofactor con función enzimática en complejos reguladores (Bao y Jia, 2019).

### **El gen de susceptibilidad *PRIM2* es blanco funcional del *Ta\_sRNA1*, para modular la colonización de la raíz y el priming**

*PRIM2* emerge como un gen de susceptibilidad (gen-S) en *Arabidopsis*, cuya expresión es modulada por el *Ta\_sRNA1* para equilibrar la colonización de la raíz por *T. atroviride* y la activación de las defensas de la planta. *PRIM2* codifica para la subunidad grande de la DNA primasa, una RNA polimerasa dependiente de DNA que participa en la síntesis de los *primers* de RNA necesarios para iniciar la

replicación en ambas cadenas (continua y discontinua) como parte del complejo Pol  $\alpha$ -primasa (Pedroza-Garcia *et al.*, 2019; Jain *et al.*, 2018). Nuestros resultados identifican a *PRIM2* como un gen-S frente al patógeno *B. cinerea*, análogo funcional a su ortólogo *NbPRiL* en *Nicotiana benthamiana*, que ha sido recientemente descrito como un factor de susceptibilidad frente a geminivirus (Wei and Lozano-Durán, 2023; Siskos *et al.*, 2023). El doble papel de ciertos genes en procesos fisiológicos esenciales y en la inmunidad vegetal ha sido previamente documentado. Un ejemplo destacado es *ICU2*, que al igual que *PRIM2*, forma parte del complejo Pol  $\alpha$ -primasa involucrado en la replicación del DNA. Sin embargo, además de su función en la proliferación celular, *ICU2* ha sido asociado con funciones clave del desarrollo vegetal, la respuesta al estrés mediada por SA, la regulación hormonal vía ácido abscísico (ABA) y la herencia epigenética mitótica (Barrero *et al.*, 2007; Micol-Ponce *et al.*, 2015; Mateo-Bonmatí, *et al.*, 2018; Pieterse *et al.*, 2012). Esta versatilidad funcional sugiere que componentes del complejo de replicación del DNA pueden actuar como nodos reguladores donde convergen señales del desarrollo, respuesta inmune y regulación epigenética, similar a lo observado para *PRIM2* en este estudio. Los genes-S pueden desempeñar funciones clave en múltiples etapas de la interacción patogénica, entre ellas: i) facilitar el reconocimiento y la penetración del patógeno en la planta; ii) codificar reguladores negativos de la inmunidad; y iii) mantener un ambiente favorable para la infección, al proveer nutrientes que favorecen la proliferación del patógeno (van Schie y Takken, 2014). Por ejemplo, LecRK (un receptor tipo cinasa) y RIN4 son esenciales para la reapertura estomática tras un ataque, lo que facilita la entrada de *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) DC3000 (Desclos-Theveniau *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009). En el caso de *PRIM2*, aunque nuestros datos indican que su silenciamiento por *Ta\_sRNA1* contribuye a mejorar la resistencia contra *B. cinerea*, aún no está completamente clara la vía específica mediante la cual opera como gen-S. Todo apunta a que su papel está vinculado con la regulación negativa de la inmunidad basal, pero la naturaleza exacta de esta función aún requiere ser dilucidada.

Nuestros resultados demuestran que *PRIM2* es silenciado a nivel post-transcripcional por el *Ta\_sRNA1*, el cual es liberado por *T. atroviride* durante la colonización de la raíz de *Arabidopsis*. Este silenciamiento cumple dos roles

importantes, i) limita la colonización excesiva por parte del hongo; y ii) potencia la defensa de la planta contra el patógeno necrotrófico *B. cinerea*. La sobreexpresión de *PRIM2* condujo a una mayor colonización radicular por *T. atroviride* y una elevada susceptibilidad frente a *B. cinerea*. En contraste, la mutante *prim2* mostró una colonización reducida y una resistencia significativamente aumentada al patógeno, lo que confirma el papel central de *PRIM2* como gen-S en esta interacción tripartita. De manera consistente, las líneas transgénicas At-STTM, en las que se bloquea la actividad del *Ta\_sRNA1*, mostraron niveles elevados de colonización de la raíz por *T. atroviride*, lo que indica que este sRNA fúngico actúa como un regulador negativo de la entrada del hongo en la raíz. Por el contrario, las líneas que sobreexpresan el *Ta\_sRNA1* presentaron un patrón de colonización similar al observado en la mutante *prim2*, es decir, una colonización reducida. Estos resultados refuerzan el modelo propuesto en el que el *Ta\_sRNA1* reprime la expresión de *PRIM2* para modular la colonización radicular y mantener un equilibrio mutualista funcional entre hongo y planta.

### **El *Ta\_sRNA1* silencia a *PRIM2* a nivel post-transcripcional mediante su asociación con el complejo AGO1 de Arabidopsis**

El intercambio de sRNAs entre reinos es un mecanismo conservado utilizado tanto por microorganismos patógenos como mutualistas para modular la expresión génica en sus hospedadores. Estos sRNAs se liberan al interior de las células vegetales vía EV o como moléculas de RNA libres, y deben incorporarse a proteínas Argonauta (AGO) del complejo RISC, para activar el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) (Wang et al., 2016; Cai et al., 2019). Nuestros análisis revelan que el *Ta\_sRNA1*, un sRNA derivado de un RNA ribosomal (rRNA), es liberado por *T. atroviride* en las raíces de *Arabidopsis* y se asocia específicamente con AGO1 y AGO2, como se observa en los inmunoprecipitados correspondientes. Esta incorporación activa indica que *Ta\_sRNA1* participa directamente en el PTGS del gen *PRIM2*, en consonancia con reportes previos que muestran que RNAs pequeños derivados de rRNA se asocian a complejos AGO1 y AGO2 funcionales (You et al., 2019). Esta evidencia posiciona al *Ta\_sRNA1* como un efector clave en la regulación cruzada inter-reino, capaz de

secuestrar la maquinaria silenciadora del hospedero para modular la expresión de genes críticos como *PRIM2*.

Sin embargo, nuestros análisis funcionales revelaron que AGO1 es la principal proteína responsable del silenciamiento de *PRIM2*. En la mutante *ago1-27* se detectaron niveles elevados de *PRIM2*, mientras que en *ago2-1* se observó una reducción en su expresión. Se sabe que AGO1 media silenciamiento transcripcional o postranscripcional por corte, por medio de microRNA-like de 21 nt con Uracilo (U) en el extremo 5' (Vaucheret, 2008). En contraste, AGO2 se une preferencialmente a sRNAs de 21-22 nt con Adenina (A) en el extremo 5', y participan en la activación de respuesta a patógenos y estrés (Brosseau et al., 2020). Además, se ha demostrado que AGO2 está involucrada en la estabilidad y acumulación de ciertos transcritos (Harvey et al., 2011). En conjunto, estos hallazgos sugieren que AGO2 podría actuar como modulador de *PRIM2* bajo condiciones normales. Por otro lado, el leve aumento de *PRIM2* en la mutante *ago1-27*, aunque estadísticamente significativo frente a Col-0, apunta a que el silenciamiento de *PRIM2* mediado por el *Ta\_sRNA1* podría ser predominantemente dependiente de AGO1. Esto sugiere que AGO2 podría actuar estabilizando la expresión basal de *PRIM2*, mientras que AGO1 sería el principal efector del silenciamiento post-transcripcional de *PRIM2*. Este resultado concuerda con el papel canónico de AGO1 como ejecutor del corte de RNAs mensajeros dirigidos por sRNAs tipo miRNA, como ha sido ampliamente documentado (Mallory, A., y Vaucheret, 2010). La asociación del *Ta\_sRNA1* con AGO1 y AGO2 sugiere la activación de rutas reguladoras diferenciadas en el huésped. Estos hallazgos indican que el *Ta\_sRNA1* es incorporado de manera consistente en AGO1, lo que respalda su papel como principal efector del silenciamiento de *PRIM2*. La asociación con AGO2 podría reflejar un contexto funcional específico, como su participación en respuestas inmunes o de estrés. Esta dualidad podría reflejar funciones divergentes pero complementarias de ambas proteínas Argonauta en la interacción planta-microorganismo. En apoyo a esta hipótesis, Rebolledo-Prudencio et al. (2022) demostraron que AGO1 y AGO2 pueden actuar de forma cooperativa o antagónica durante la respuesta de *Arabidopsis* a *T. atroviride*. Esto sugiere que la carga del *Ta\_sRNA1* en distintos

complejos AGO podría modular de manera fina el equilibrio entre tolerancia a la colonización benéfica y activación defensiva frente a patógenos.

Aunque no se detectaron productos de escisión de *PRIM2* por RLM-RACE, la evidencia acumulada respalda firmemente que *PRIM2* es un blanco *bona fide* del *Ta\_sRNA1*. Esta conclusión se sustenta en múltiples líneas de evidencia: perfiles de expresión correlacionados inversamente, ensayos de coinfiltración, inmunoprecipitación de complejos AGO, análisis de líneas transgénicas y datos de secuenciación. La falta de detección por RLM-RACE podría atribuirse a diversas limitaciones técnicas, entre ellas: la baja expresión basal de *PRIM2* en raíces colonizadas por *Trichoderma*, la heterogeneidad celular del tejido radicular, y la posibilidad de que el *Ta\_sRNA1* ejerza su efecto regulador principalmente a través de mecanismos de represión traduccional o vías canónicas independientes del corte de mRNA. En apoyo de esta hipótesis, la sobreexpresión del *Ta\_sRNA1* mediante un amiR resultó en solo una leve disminución del RNAm de *PRIM2*, a pesar de la elevada acumulación de sRNA. Esta aparente discrepancia refleja la dinámica compleja y no lineal que caracteriza la regulación génica guiada por RNAs pequeños. Factores como la disponibilidad y competencia de proteínas AGO, la accesibilidad estructural del sitio blanco en el mRNA, la conformación secundaria del RNA objetivo, así como sus posibles efectos de saturación por sobreacumulación del sRNA, pueden influir significativamente en la eficiencia del silenciamiento (Ameres et al., 2007).

Nuestros resultados son congruentes con evidencia emergente en otros sistemas mutualistas, donde los sRNAs microbianos modulan la expresión génica del hospedero a través de AGO1. Un ejemplo destacado es *Rhizophagus irregularis*, hongo micorrízico arbuscular que transfiere el Rir2216 a *Medicago truncatula*. Una vez en el citoplasma de la célula vegetal, Rir2216 se carga en el complejo AGO1 y dirige el silenciamiento del gen *MtWRKY69*, que codifica un factor de transcripción cuya sobreexpresión restringe la colonización fúngica (Silvestri et al., 2025). Esta evidencia refuerza la noción de que la asociación de sRNAs exógenos con AGO1 es un mecanismo conservado en la regulación fina del equilibrio entre colonización y defensa en simbiosis benéficas.

Además, distintos estudios han demostrado que otros microorganismos benéficos también emplean sRNAs para favorecer la colonización de sus hospederos. Por ejemplo, *Pisolithus microcarpus*, un hongo ectomicorrízico produce el sRNA Pmic\_miR-8, mientras que la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* genera un sRNA derivado de un tRNA; ambos han sido implicados en promoción colonización en raíces de *Eucalyptus grandis* y *Glycine max*, respectivamente (Ren et al., 2019; Wong-Bajracharya et al., 2022). Aunque aún se requiere validación experimental directa, análisis bioinformáticos predicen que Pmic\_miR-8 tiene como blanco varios genes R, típicamente involucrados en la ETI. El silenciamiento de estos genes R facilitaría la formación de ectomicorrizas, lo que sugiere un mecanismo convergente con el observado en *Trichoderma-Arabidopsis*.

### **Una acumulación excesiva del *Ta\_sRNA1* compromete la activación de la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma*, a través de la represión de *PDF1.2***

Nuestros resultados indican que la sobreacumulación del *Ta\_sRNA1* interfiere negativamente con la activación de la ISR por *Trichoderma*, debido principalmente a la represión de *PDF1.2*, un gen clave en la defensa contra patógenos necrotróficos como *B. cinerea* (Van der Ent et al., 2009; Mauch-Mani et al., 2017). En las líneas transgénicas que sobreexpresan el *Ta\_sRNA1*, el pretratamiento con *Trichoderma* no logró inducir una respuesta ISR efectiva, lo cual se reflejó en un aumento de la severidad de los síntomas tras la infección con *B. cinerea*. Este mismo efecto se observó en plantas Col-0 pretratadas con la cepa OE-Ta\_sRNA1, que presentaron mayor susceptibilidad frente a *B. cinerea* en comparación con aquellas inoculadas con la cepa silvestre de *T. atroviride*, que sí desarrollaron una respuesta protectora robusta. Estos datos indican que una regulación fina del *Ta\_sRNA1* es esencial: si bien su presencia es necesaria para modular la colonización y ajustar la inmunidad, su sobreacumulación puede interferir con la activación adecuada de la ISR, revelando así un equilibrio crítico entre silenciamiento de genes y defensa inducida. Estos fenotipos se correlacionaron con la represión simultánea de *PR-1a* como de *PDF1.2*, lo que refleja un desequilibrio en la homeostasis entre las vías de señalización JA/ET-SA. Sin embargo, la afectación fue más pronunciada en la vía JA/ET, reflejando una supresión más severa de la inmunidad asociada a patógenos

necrotróficos. En conjunto, estos hallazgos demuestran que la sobreacumulación del *Ta\_sRNA1*, en presencia de *Trichoderma*, interfiere con la correcta activación de la respuesta inmune inducida por el mutualista, comprometiendo así la eficacia de la ISR. Esto refuerza la idea de que una regulación espacio-temporal precisa y dosis-dependiente de los sRNAs, es esencial para sostener un equilibrio adecuado entre crecimiento, colonización simbiótica y defensa, asegurando una relación mutuamente beneficiosa entre planta y microbio.

### **PRIM2 coordina el balance entre las respuestas PTI y ETI durante la infección por *B. cinerea***

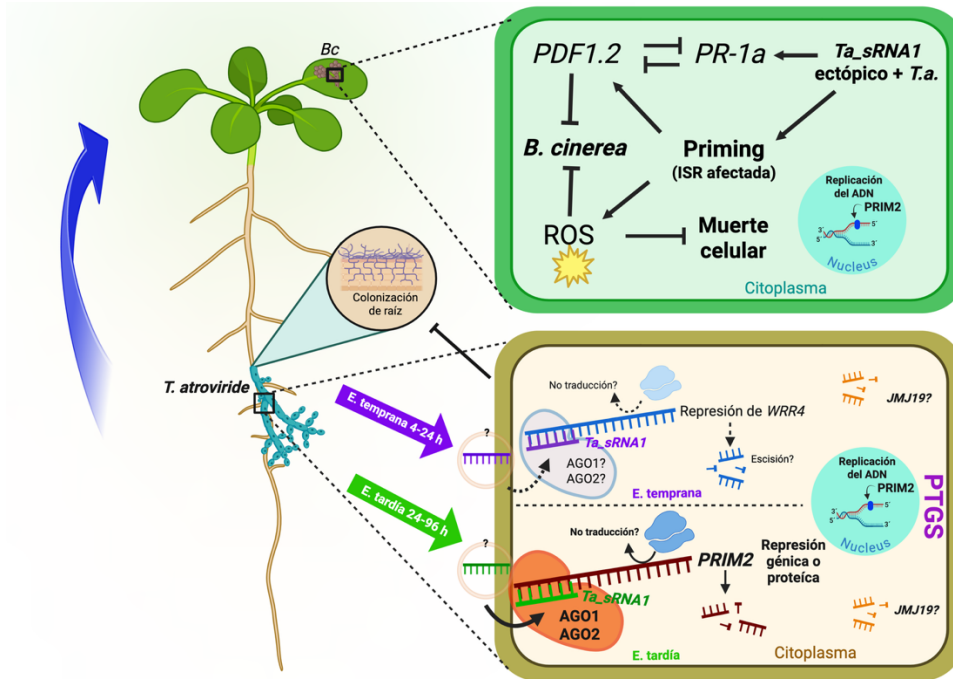
La muerte celular provocada por *B. cinerea* se desencadena a través de una combinación de toxinas, nucleótidos y efectores proteicos, que generan un entorno favorable para la progresión de la enfermedad (van Kan, 2006; Weiberg *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2023). En este estudio, demostramos que el *Ta\_sRNA1* modula el equilibrio entre las respuestas inmunes del tipo PTI y ETI, a través de la regulación de *PRIM2*. Las líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el *Ta\_sRNA1* mostraron una mayor acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, detectada mediante tinción con DAB, lo que indica una activación robusta de las vías de señalización oxidativa. Aunque las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) incluido el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, son moléculas clave en la activación tanto de la PTI como de la ETI (Daudi and O'Brien, 2012; Durrant and Dong, 2004; Kim *et al.*, 2022), nuestros resultados muestran que los altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas plantas se correlacionan con una restricción de la muerte celular. Este hallazgo sugiere que el silenciamiento de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1* potencia una respuesta tipo-PTI temprana, caracterizada por la producción controlada de ROS, que es suficiente para frenar el avance de *B. cinerea*. De forma consistente, la mutante *prim2* también mostró alta acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una limitada muerte celular, similar al fenotipo de las líneas sobreexpresantes del *Ta\_sRNA1*, lo que refuerza la idea de que *PRIM2* actúa como un regulador negativo de las respuestas oxidativas de defensa. En contraste, las líneas que sobreexpresan *PRIM2* exhibieron bajos niveles de ROS y síntomas exacerbados de la enfermedad. Estos resultados confirman el papel de *PRIM2* en la defensa basal de la planta cuando es regulado a la baja.

En conjunto, nuestros resultados respaldan un modelo en el que PRIM2 actúa como un regulador central de la homeostasis inmune, suprimiendo la señalización oxidativa, atenuando la respuesta de tipo PTI y modulando la muerte celular, con el fin de prevenir una activación descontrolada de la ETI. Así, el silenciamiento de *PRIM2* mediado por el *Ta\_sRNA1*, favorece la acumulación de ROS en niveles que limitan la necrosis inducida por patógenos y restringen la propagación de agentes necrotróficos como *B. cinerea*, sin comprometer la compatibilidad con hongos mutualistas como *T. atroviride*.

## Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que *Trichoderma* produce el *Ta\_sRNA1*, una molécula efectora (effector-like) inter-reino de naturaleza nucleotídica. El *Ta\_sRNA1* es liberado hacia las raíces de *Arabidopsis*, donde es cargado de forma selectiva por el complejo AGO1 y/o AGO2, lo que desencadena el silenciamiento postranscripcional de *PRIM2*. Esta regulación genera una activación de la respuesta inmune de la planta contra *B. cinerea*, fortaleciendo tanto la inmunidad basal (PTI) como la específica (ETI), a través de la inducción de genes clave de defensa. Nuestros hallazgos posicionan a *PRIM2* como gen-S, y revelan que *Trichoderma* lo regula selectivamente mediante un mecanismo de silenciamiento dependiente de sRNA, AGO1 y AGO2 (Fig. 9). Este trabajo refuerza el modelo en el que los sRNA inter-reino actúan como efectores clave en la regulación fina de la inmunidad vegetal y en el establecimiento de relaciones mutualistas estables.

Desde una perspectiva aplicada, nuestros hallazgos amplían el conocimiento actual sobre los sRNAs inter-reinos más allá de interacciones patogénicas, demostrando que los hongos benéficos emplean efectores de RNA pequeños para modular finamente la fisiología del hospedero. El módulo regulador *Ta\_sRNA1-PRIM2* representa un sistema conservado y potencialmente manipulable para optimizar tanto la respuesta inmune como la compatibilidad microbiana en plantas. Estudios futuros que exploren la actividad de sRNAs de manera célula-específica, así como la identificación de otros genes blanco relevantes en el hospedero, permitirán profundizar en los mecanismos mediante los cuales los microorganismos benéficos reprograman la inmunidad vegetal sin romper el equilibrio mutualista.



**Fig. 9. Modelo hipotético de la regulación de *PRIM2* mediada por el *Ta\_sRNA1* y su impacto en la respuesta inmune de *Arabidopsis* durante la interacción con *Trichoderma atroviride*.** *Trichoderma* libera el *Ta\_sRNA1* en las células radiculares de *Arabidopsis*, donde se asocia con las proteínas AGO1 y AGO2. Este complejo dirige el silenciamiento postranscripcional de *PRIM2*, un gen-S que codifica para la subunidad grande de la primasa de DNA. El *Ta\_sRNA1* se acumula tanto en etapas tempranas como tardías de la colonización, regulando diferencialmente a sus genes blanco. En etapas tempranas el *Ta\_sRNA1* puede reprimir genes R, como *WRR4*, para facilitar la entrada de *Trichoderma* a la raíz. En etapas tardías el silenciamiento de *PRIM2* conduce a la activación del priming sistémico que induce a *PDF1.2* (marcador de la vía del JA/ET), promueve la acumulación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y restringe el daño por *B. cinerea*. Esta regulación de *PRIM2* limita la sobrecolonización de las raíces, promoviendo una simbiosis equilibrada. Además, el *Ta\_sRNA1* podría regular negativamente *JMJ19* y *WRR4* mediante escisión de RNA o inhibición traduccional. No obstante, una acumulación excesiva o constitutiva del *Ta\_sRNA1* más la presencia del hongo benéfico, interfiere con la activación de la ISR por *Trichoderma*, provocando un desbalance en las vías del JA/ET-SA que conlleva a una fuerte activación de *PR-1a*, baja expresión de *PDF1.2* y mayor susceptibilidad a *B. cinerea*. En conjunto, estos resultados revelan un mecanismo dependiente de la dosis del *Ta\_sRNA1* para el silenciamiento fino de un gen-S, esencial tanto para la colonización de raíces como para la activación de la ISR.

Abreviaciones: *Ta\_sRNA1*, RNA pequeño 1 de *T. atroviride*; PRIM2, subunidad grande de la DNA primasa; *JMJ19*, Jumonji 19; *WRR4*, White Rust Resistance 4 (resistencia a la roya blanca); PTGS. Silenciamiento génico postranscripcional, de sus siglas en inglés; ROS, especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés; *PDF1.2*, Plant Defensin (defensina de plantas) 1.2 ; ISR, induced systemic resistance (Resistencia Sistémica inducida); JA/ET, jasmonato/etileno; SA, ácido salicílico; E. tardía, etapa tardía; E. temprana, etapa temprana; Bc, *Botrytis cinerea*; ADN, ácido desoxirribonucleico; *T.a.*, *T. atroviride*.

## Materiales y Métodos

### Condiciones de crecimiento de plantas y microorganismos

En todos los experimentos se utilizó el ecotipo silvestre *Arabidopsis thaliana* Col-0. Las líneas insercionales de T-DNA correspondientes a los genes *PRIM2* (SALK\_045856), *JMJ19* (SALK\_041728) y *WRR4* (SALK148037) fueron obtenidas de la colección SALK T-DNA del ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center). Las líneas homocigotas *prim2*, *jmj19*, y *wrr4* fueron confirmadas por PCR utilizando oligonucleótidos específicos que fueron diseñados en el sitio web T-DNA Primer Design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) (Fig. suplementaria 2).

Las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) durante 7 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Después de la esterilización, las semillas se sembraron en medio Murashige and Skoog (MS) 1× (PhytoTech Labs, 651 Lenexa, KS, US; Murashige and Skoog, 1962) o en maceta con una mezcla de turba (*peat moss*, LAMBERT™), perlita (Hortipel) y vermiculita (Verlite) en proporción 3:1:1. Para promover y uniformizar la germinación, las semillas sembradas se incubaron durante 48 h a 4°C en oscuridad. Las plántulas se crecieron en una cámara de crecimiento con un régimen de 12h luz/12h oscuridad (150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  de intensidad luminosa) a  $21 \pm 2$  °C.

*Ensayos Trichoderma-Arabidopsis-Botrytis*: Las semillas se esterilizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Para los experimentos *in vitro*, las plántulas de cuatro días de edad se trasplantaron a placas con medio MS sólido 0.5×, a los 14 días de edad se recolectaron, para medir la expresión de genes en plántula completa. Para el caso de la mutante *prim2* tratada con *Trichoderma* e inoculada con *B. cinerea*, la expresión de genes se realizó en hojas. En los experimentos realizados en macetas, las plantas de cuatro días de edad, se trasplantaron a insertos individuales y se crecieron bajo condiciones controladas ( $21 \pm 1$ °C, 12 h luz/12 oscuridad). A los 10 días post trasplante fueron inoculadas con *Trichoderma* y los 18 dpt fueron retadas con *Botrytis cinerea*.

La cepa silvestre de *T. atroviride* IMI 206040 y la cepa sobreexpresante Ta OE-sRNA1 se crecieron a 28 °C en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) durante 8 días. Las conidias se recolectaron en una solución estéril de medio MS líquido al 0.03%

y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ . La cepa fúngica de *Botrytis cinerea* B05 (Amselem *et al.*, 2011) fue cultivada en PDA a 28 °C en oscuridad por dos semanas. Las conidias se recolectaron en una solución estéril de PDB con dextrosa al 1% y Tween al 0.025%, ajustándose a una concentración final de  $1 \times 10^6$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ .

### **Construcción de vectores sobreexpresantes de *PRIM2* y transformación de *A. thaliana***

Para generar las líneas sobreexpresantes del gen 35S::*PRIM2* (OE-*PRIM2*-2 y -4), se amplificó el marco de lectura abierto (ORF) de *PRIM2*, (1470 nt) a partir del cDNA de *Arabidopsis* utilizando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) y oligonucleótidos específicos del gen (PRIM2-ORF-Fw/ PRIM2-ORF-673 Rv, Tabla suplementaria 4). El producto de PCR, que contiene una secuencia CACC en el extremo 5' del gen, fue clonado en el plásmido de entrada pENTR-SD-D-TOPO (Invitrogen, EUA). Posteriormente, las clonas de entrada fueron recombinadas en el plásmido Gateway de destino pBA-DC-myc, bajo el control del promotor CaMV 35S, utilizando la enzima Gateway<sup>(R)</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Mix (Invitrogen), generando el constructo pBA-DC-*PRIM2*-WT-MYC.

Para generar las líneas sobreexpresantes OE-At-sRNA1, se insertó la secuencia del *Ta\_sRNA1* dentro del precursor del miR319a (diseñado con la herramienta Web MicroRNA Designer) mediante PCRs de empalme utilizando el plásmido pRS300 como molde (Schwab *et al.*, 2006). El constructo resultante se clonó en el vector de entrada pENTR-SD-D-TOPO (Invitrogen), y posteriormente fue transferido al vector binario pBA-DC-myc bajo el control del promotor CaMV 35S, utilizando el sistema Gateway (Earley *et al.*, 2006), generando el pBA-DC-sRNA1-MYC.

Para generar las líneas transgénicas 35S::At-STTM-4 y -8, se usó una secuencia de 88 pb que tiene complementariedad y que forma el espaciador que separa los dos sitios de unión al *Ta\_sRNA1*. Se agregaron dos sitios de unión complementarios al *Ta\_sRNA1*, que se encuentran en cada lado del espaciador. A cada sitio de unión al *Ta\_sRNA1* se agregaron 3 nucleótidos (nt) no apareados, entre el nt 10 y 11 del *Ta\_sRNA1* (Tang *et al.*, 2012). Para formar la estructura STTM se sintetizó la cadena completa (por IDT) en su forma delantera y reversa (STTM\_sRNA1\_Fw y

STTM\_sRNA1\_Rv, Tabla suplementaria 4). Las secuencias se hibridaron y, posteriormente, se clonaron en el vector de entrada pENTR-SD-D-TOPO (Invitrogen). Posteriormente, el constructo STTM fue transferido al vector de destino pBA-DC-myc bajo el control del promotor CaMV 35S, utilizando nuevamente el sistema Gateway (Earley *et al.*, 2006), resultó el constructo el pBA-DC-STTM-MYC. Los plásmidos pBA-DC-*PRIM2*-WT-MYC, pBA-DC-sRNA1-MYC, pBA-DC-STTM-MYC y pBA-DC-EV-MYC se clonaron en *A. tumefaciens* cepa GV3101 mediante electroporación. Las células transformadas se seleccionaron en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 mg/L de kanamicina, 25 mg/L de rifampicina, y 100 mg/L de espectinomicina, y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las cepas de *A. tumefaciens* positivas al respectivo constructo, se utilizaron para la generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* Col-0 por medio del método de transformación floral dip (Zhang *et al.*, 2006).

Para la selección de plantas transformadas, las semillas se esterilizaron como se describió previamente y se sembraron en medio MS suplementado con el herbicida de selección, BASTA™ (4.5 µg/mL). Las plantas transformadas se identificaron como aquellas que germinaron produciendo hojas verdes y raíces bien establecidas en el medio selectivo. A los 8 días de la siembra, las plántulas germinadas *in vitro*, fueron trasplantadas a charolas con *Peat moss* como sustrato y cultivadas en condiciones controladas de 12 h luz/12 h oscuridad (150 µmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> de intensidad luminosa) a 21 ± 1°C, hasta la generación T2.

### **Generación de la cepa sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride***

Para generar la cepa sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* en *T. atroviride*, la secuencia del *Ta\_sRNA1* se amplificó por PCR a partir del vector utilizado para la generación de las líneas OE-At-sRNA1. El producto resultante fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Nsi*I y posteriormente ligado en los sitios correspondientes del vector pHyg-SM1 (Casas-Flores *et al.*, 2006), bajo el control del promotor pKI (pyruvate kinase; Zeilinger *et al.*, 1999) *Trichoderma reesei* y del terminador de la Celobiohidrolasa II (*Tcbh2*) de *T. reesei*. La transformación de protoplastos de *T. atroviride* se realizó siguiendo el protocolo modificado de Baek y Kenerley (1998). Las colonias transformantes fueron seleccionadas utilizando higromicina B (Hyg<sup>R</sup>)

(200 µg/mL) como agente de selección (Fig. suplementaria 1f, g, h). De las aproximadamente 40 colonias obtenidas en el medio selectivo, se realizaron tres pases de punta de hifa para garantizar la estabilidad de las transformaciones. Posteriormente, se generaron cultivos monospóricos a partir de las colonias que crecieron hasta el tercer pase; sin embargo, la mayoría de las transformantes no sobrevivieron a los pases de punta de hifa. Al final, solo se obtuvo una transformante estable, de la cual se extrajo DNA genómico para confirmar la presencia del constructo completo mediante PCR. La acumulación del *Ta\_sRNA1* en las cepas transformantes fue verificada mediante por stem loop RT-qPCR (Chen et al., 2005).

### **Ensayos de promoción de crecimiento y de reto con patógenos**

*Ensayos de promoción de crecimiento por T. atroviride.* Plántulas de *Arabidopsis* (ecotipo Col-0 WT, mutante *prim2*, líneas OE-*At-PRIM2-2* y -4 y líneas OE-*At-sRNA1-8* y -9), de 14 días de edad, fueron inoculadas en la raíz con 500 µL de la suspensión de esporas de *T. atroviride* ( $1 \times 10^6$  conidias/mL) o con 500 µL de MS 0.3× como control. Durante el experimento las plantas fueron regadas alternadamente con agua y con una solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950). A los 18 días después del tratamiento con *Trichoderma*, se tomaron fotografías del crecimiento de la roseta y lavaron las plantas completas para eliminar residuos. Las plantas fueron secadas a 65°C durante 72h, para obtener el peso seco. Se realizaron 3 replicas biológicas de cada ensayo de promoción de crecimiento. Cada tratamiento consistió en 28 plantas.

*Reto con el patógeno B. cinerea.* A los 18 días postratamiento con *T. atroviride*, se seleccionaron nueve plantas (3 hojas por planta) por tratamiento, para ser inoculadas con *B. cinerea*. Cada hoja fue inoculada con 5 µl de una suspensión de esporas de *B. cinerea* ( $5 \times 10^5$  esporas/mL) preparada en medio PDB (Potato Dextrose Broth) suplementado con 1% de sacarosa y 0.025% de Tween 20. El área lesionada en las hojas se evaluó a los 3 días post-inoculación con el patógeno. El porcentaje de área dañada se calculó midiendo el área total de la hoja y el área afectada, utilizando el programa ImageJ v.1.52a del NIH (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Se realizaron 3 réplicas biológicas de cada ensayo de reto con *B. cinerea*, con 27 hojas por tratamiento.

## Extracción de RNA total y análisis de expresión de genes

Las hojas o raíces de *Arabidopsis* y las hojas de *N. benthamiana* se recolectaron y congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El RNA total se extrajo utilizando el buffer de extracción y solución CTAB 2× (Ferdous *et al.*, 2012). Como genes normalizadores se emplearon *ACT2* (que codifica para actina) en los ensayos con *A. thaliana* y *NbPP2A* (que codifica para la proteína fosfatasa 2A), en los ensayos de coexpresión transitoria con *N. benthamiana*. El RNA total extraído fue tratado con rDNAsa I libre de RNAsa (Thermo) para eliminar contaminantes de DNA genómico, y se retrotranscribieron 2 µg de RNA total utilizando la transcriptasa reversa, SuperScript II (Invitrogen SSII). La amplificación por RT-qPCR se realizó empleando el kit Syber Green Mix (Máxima Radiant) con 300 ng de cDNA como molde. El protocolo de amplificación incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s y alineamiento/extensión a 60°C por 30 s. La expresión de genes fue realizada para los genes *PRIM2*, *JMJ19*, *WRR4*, *PR-1a*, *PDF1.2*, *ACT2* y *PP2A*. Los oligonucleótidos utilizados para los ensayos fueron diseñados con la herramienta en línea de IDT <https://www.idtdna.com/> y sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT) (ver Tabla suplementaria 4). La cuantificación del *Ta\_sRNA1* se realizó mediante la técnica stem-loop RT-qPCR de acuerdo con el protocolo descrito por Chen *et al.* (2005). Para ello, se usa un oligo stem-loop que se une al extremo 3' del *Ta\_sRNA1*, para iniciar la transcripción reversa. Después, se realiza la amplificación con un oligo delantero que se une al *Ta\_sRNA1* y un oligo universal reverso que se une a la secuencia stem-loop. Los oligos para el *Ta\_sRNA1* se diseñaron en el servidor web Primer Design Tool & Primer Bank for Small non-coding RNAs (<http://www.srnprimerdb.com/>) y se encuentran en la Tabla suplementaria 4. En *A. thaliana* la expresión del *Ta\_sRNA1* fue normalizada con el gen *At-U6-1* y en *T. atroviride* se normalizó con el gen *U6*. La amplificación por RT-qPCR se realizó empleando el kit Syber Green Mix (Máxima Radiant) con 300 ng de cDNA como molde. El protocolo de amplificación incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s y alineamiento/extensión a 60°C por 30 s. La reacción química del colorante Syber Green se usó para detectar la fluorescencia y el análisis de la

curva Melt se incluyó en el análisis, para verificar la amplificación específica. La expresión relativa de cada gen se normalizó respecto al gen control utilizando la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Cada ensayo de RT-qPCR se realizó al menos dos veces.

### **Ensayos de coexpresión transitoria en *Nicotiana benthamiana***

Para obtener una versión resistente del gen *PRIM2* al *Ta\_sRNA1*, se introdujeron cinco mutaciones puntuales sinónimas en el sitio de unión predicho del *Ta\_sRNA1* (Fig. suplementaria 5c), utilizando un kit de mutagénesis dirigida por sitio (Agilent). El gen mutado (*PRIM2-m*) se generó a partir de la amplificación de *PRIM2* en el constructo pBA-DC-*PRIM2*-MYC con oligonucleótidos mutagénicos específicos (Tabla suplementaria 4) y se clonó en el plásmido pEG100 (Earley *et al.*, 2006).

Transformación mediada por *Agrobacterium*: los plásmidos pBA-DC-*PRIM2*-WT-MYC, pBA-DC-sRNA1-MYC, pBA-DC-STTM-MYC, pBA-DC-EV-MYC, pEG100*PRIM2*-m-YFP-HA, and pEG100-EV-YFP-HA, todos bajo el control del promotor CaMV35S, fueron introducidos en *A. tumefaciens* cepa GV3101 mediante electroporación. Las células transformadas se seleccionaron en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 mg/L de kanamicina, 25 mg/L de rifampicina, y 100 mg/L de espectinomicina, y se incubaron a 28 °C durante 48 h.

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad, a  $21 \pm 2$  °C, con una intensidad de  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  y 65% de humedad relativa. El ensayo de coexpresión transitoria se llevó a cabo en plantas de 4 semanas de edad, mediante *A. tumefaciens* GV3101 ajustada a una densidad óptica de 1.0 [OD<sub>595</sub>]. La agroinfiltración se realizó en el envés de las hojas siguiendo las siguientes combinaciones de cada constructo en vectores binarios: 1) *PRIM2-wt* + *Ta\_sRNA1*; 2) *PRIM2-wt* + vector sin el *Ta\_sRNA1* (relación 1:2); 3) STTM + *PRIM2-wt* + *Ta\_sRNA1* (relación 1:1:1); y 4) *PRIM2-m* + *Ta\_sRNA1* o vector sin el *Ta\_sRNA1* (relación 1:1). El protocolo de infiltración se llevó a cabo según Li, (2011). A las 48 horas postinfiltración, las hojas se recolectaron y se congelaron en nitrógeno para el análisis posterior. Los ensayos de coexpresión transitoria se realizaron al menos tres veces de manera independiente.

## **Preparación de genotecas de RNAs pequeños, secuenciación y análisis bioinformáticos**

El RNA total se extrajo de raíces de *Arabidopsis* colonizadas por *T. atroviride* en distintos tiempos de interacción (0, 24, 48, 72 y 96 h post-tratamiento) siguiendo el protocolo descrito previamente. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 0.8%. Además, la calidad del RNA fue verificada con el sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., USA). Se prepararon un total de 10 genotecas de RNAs pequeños (dos por cada tiempo de interacción) utilizando el protocolo de clonación de RNAs pequeños proporcionado por Solexa. La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., USA) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) y posteriormente fueron analizados (Fig. suplementaria 8a). Se removieron los adaptadores y lecturas de baja calidad con Cutadapt v1.9.1 (Martin, 2011) and Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014). Se obtuvo un total de 190,954,985 lecturas limpias que representaron el 98.60% de los datos crudos. Los datos crudos de secuenciación se depositaron en la base de datos de expresión de genes *Gene Expression Omnibus* del NCBI, con el número de acceso GSE254275. Para determinar el origen de las secuencias, las lecturas de RNAs pequeños se mapearon en el genoma de *A. thaliana* TAIR10 y de *T. atroviride* v2 (Joint Genome Institute) usando BLAST+ v2.11.0 (word size = 7, e-value  $\leq$  0.1), seleccionando aquellos alineamientos con un solo resultado y que tuvieron como máximo un nt no apareado. Las lecturas de RNAs pequeños que mapearon en ambos genomas fueron eliminadas, así como sRNAs que tuvieron apareamiento perfecto con transcritos de *A. thaliana* y aquellos que tuvieron perfiles de degradación. Los análisis de la distribución de tamaños de los sRNAs mostraron picos de 18 y 30 nt (Fig. suplementaria 8b). Se observó una ligera tendencia al nt Guanina (G) en el extremo 5' de los sRNAs (Fig. suplementaria 8c).

Para eliminar sRNAs derivados de RNAs estructurales como rRNA, tRNA, snRNA, y snoRNA se usó el programa Infernal v1.1.2 (Nawrocki et al., 2009) y la base de datos Rfam (Nawrocki et al., 2009). Se identificaron 6,650 sRNAs que mapearon en el genoma de *A. thaliana* y 19,766 que mapearon en el genoma de *T. atroviride*. De los sRNAs mapeados en el hongo, 766 pasaron posteriores filtros y solo 31 fueron

de alta confianza debido a 1) se detectó en al menos 2 réplicas biológicas; 2) tiene posibles blancos en *A. thaliana*; y 3) no mostró señal de ser producto de degradación.

Para predecir los blancos (dianas) de los sRNAs se usaron los criterios propuestos por Schwab *et al.* (2005). Cada sRNA se dividió en dos partes, una región semilla (del nt 2-12) y una cola (del nt 13 al final) (Fig. suplementaria 8d). La región semilla se mapeó en las regiones UTR 5' y 3' de *A. thaliana* usando Bowtie con parámetros -e 1 -l 11, y se permitió como máximo 1 nt no apareado en esta región. Para el genoma de *T. atroviride*, que no tiene regiones UTRs anotadas, los sRNAs se mapearon en 1 kb río arriba y en 1 kb río abajo de las secuencias codificantes. Las interacciones candidatas se analizaron además con un script R personalizado. Las secuencias completas de RNAs pequeños también se usaron para predecir los blancos en la herramienta bioinformática psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>). Las interacciones válidas fueron aquellas que tuvieron apareamiento en los nts 10 y 11, máximo 1 nt no apareado en la región semilla, máximo 4 nts no apareados en la región cola (no más de dos seguidos) y un alineamiento perfecto de más del 70% entre el sRNA y su blanco.

### **Ensayos de colonización de raíz por *T. atroviride***

Plántulas de *Arabidopsis* de 14 días de edad fueron tratadas sumergiendo sus raíces durante 5 minutos en una suspensión de conidias de *T. atroviride* ( $1 \times 10^7$  conidias/mL) o en buffer PBS (control). Tras el tratamiento, las raíces se colocaron en cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28 °C por 48h. Una vez finalizado el periodo de incubación, las raíces se pesaron y se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, seguidos de tres lavados con agua destilada estéril para eliminar el hongo presente en la superficie de la raíz. Posteriormente, las raíces se trituraron en 1 mL de buffer PBS y se realizaron diluciones seriadas. Las diluciones se sembraron en placas con medio PDA suplementado con 0.5% de Tritón X-100 para suprimir el crecimiento del micelio y mejorar la resolución de la colonia. Las placas se incubaron a 28° C durante 72 h, tras lo cual se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC). Cada ensayo de colonización consistió de

3 réplicas biológicas independientes, con 40 plántulas por tratamiento y dos placas por cada dilución.

### **Inmunoprecipitación de AGO1 y AGO2**

Plantas de *Arabidopsis* Col-0 y líneas transgénicas AGO2::3HA-AGO2 (Montgomery *et al.*, 2008) de 14 días de edad fueron tratadas *in vitro* con *T. atroviride* silvestre (wt) o sobreexpresante del *Ta\_sRNA1*. Para evitar el contacto directo entre el hongo y las raíces, se colocó una membrana de celofán permeable que permite el paso de pequeñas moléculas incluidos los RNAs pequeños, entre ambos organismos (Wong *et al.*, 2019; Wong-Bajracharya *et al.*, 2022). Tras 72 h de interacción, se retiró cuidadosamente la membrana y se extrajo la proteína total de las raíces. La inmunoprecipitación (IP) de AGO1 y AGO2 se realizó utilizando anticuerpos anti-AGO1 (Agrisera, AS09 527) y anti-HA (Santa Cruz, sc-57594) para Col-0 y AGO2::3HA-AGO2, respectivamente, siguiendo el protocolo de Dunker *et al.* (2021).

El *Ta\_sRNA1* se detectó por medio de stem-loop RT-PCR a partir de RNA total extraído de las fracciones inmunoprecipitadas y del input. El RNA pequeño nuclear de *A. thaliana* U6-1 (*At-U6-1*) se usó como un control de carga del input y para las fracciones no asociadas a AGO1 y AGO2.

La inmunoprecipitación de AGO1 y AGO2 se realizó a partir de raíces de plantas Col-0 wt y de AGO2::3HA-AGO2 en interacción tanto con *T. atroviride* wt como con la cepa OE-*Ta\_sRNA1*. Para validar la interacción del *Ta\_sRNA1* con los complejos AGOs, un total de 18 clonas de cDNA del *Ta\_sRNA1* (9 de la fracción unida a AGO1 y 9 de la fracción unida a AGO2) de plantas en interacción con *T. atroviride* wt, fueron clonadas en el vector pJET y secuenciadas en el LANBAMA (Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental) del IPICYT. Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron 3 veces de manera independiente.

### **Western blot**

El análisis por western blot se llevó a cabo según el protocolo descrito por Hnasko y Hnasko (2015). La detección de PRIM2-wt (~57 kDa) se realizó utilizando el anticuerpo anti-Myc (9E11, Santa Cruz Biotechnology), mientras que PRIM2-mr

(~87 kDa) se detectó con el anticuerpo anti-GFP (Invitrogen A-11122), que también reconoce la YFP. Para ambos anticuerpos primarios se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signaling Technology 7076S). Como control de carga, se empleó la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (~53 kDa), detectada con el anticuerpo anti-Rubisco (Thermo Fisher Scientific BS-6988R). La detección del anticuerpo anti-Rubisco se realizó utilizando un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Millipore 12-348). Todos los ensayos de western blot se realizaron al menos de dos experimentos separados.

### **Detección de muerte celular y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de plantas retadas con *Botrytis cinerea***

Plantas de *Arabidopsis* de 14 días de edad, cultivadas en maceta, fueron tratadas con *T. atroviride*. A los 18 días post-tratamiento, se inocularon cuatro hojas por planta con *Botrytis*. La detección de muerte celular se realizó a las 72 h post-inoculación (hpi) utilizando azul de tripano, siguiendo el protocolo descrito por Mulaosmanovic *et al.* (2020). La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se evaluó a las 24 hpi mediante tinción con 3,3'-diaminobenzidine (DAB) de acuerdo con el método de Daudi y O'Brien (2012). Se realizaron al menos dos replicas biológicas de cada ensayo y consistió en 40 hojas cada réplica.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos que se realizaron fueron: ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0.05$ ), con análisis post-hoc, en donde los asteriscos indican diferencia estadística significativa (\*P<0.05; \*\*P=0.001; \*\*\*P=0.0001; \*\*\*\*P<0.0001). ANOVA ( $\alpha \leq 0,05$ ) de dos vías, con prueba de comparación múltiple de Tukey, en donde las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Y pruebas *t* de Student donde los asteriscos indican diferencia estadística significativa (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01). Para evaluar diferencias significativas en los ensayos de promoción de crecimiento, daño por *B. cinerea* y niveles de expresión génica.

## Literatura citada

1. Alonso-Ramírez A, Poveda J, Martín I, Hermosa R, Monte E And Nicolás C. (2014). Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Molecular Plant Pathology* 15(8), 823–831 DOI: 10.1111/mpp.12141.
2. Ameres, S.L., Martinez, J., Schroeder, R. (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. 13;130(1):101-12. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.037.
3. Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Dyer, P. S., Fillinger, S., Fournier, E., Gout, L., Hahn, M., Kohn, L., Lapalu, N., Plummer, K. M., Pradier, J. M., Quévillon, E., Sharon, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *sclerotinia sclerotiorum* and *botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
4. Baek, J.-M., & Kenerley, C. M. (1998). *The arg2 Gene of Trichoderma virens: Cloning and Development of a Homologous Transformation System*. *Fungal Genetics and Biology* 23, 34–44 (1998).
5. Bao K. and S. Jia (2019). Noncatalytic Function of a JmjC Domain Protein Disrupts Heterochromatin. *Epigenetics Insights*. Volume 12: 1–3 DOI: 10.1177/2516865719862249
6. Baranovskiy, A. G., Zhang, Y., Suwa, Y., Gu, J., Babayeva, N. D., Pavlov, Y. I., & Tahirov, T. H. (2016). Insight into the human DNA primase interaction with template-primer. *Journal of Biological Chemistry*, 291(9), 4793–4802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.704064>
7. Barrero, J. M., González-Bayón, R., del Pozo, J. C., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2007). INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA polymerase  $\alpha$  and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 19(9), 2822–2838. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054130>
8. Bolger AM, Lohse M, (2014). Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.
9. Borhan, M. H., Gunn, N., Cooper, A., Gulden, S., Tör, M., Rimmer, S. R., & Holub, E. B. (2008). WRR4 Encodes a TIR-NB-LRR Protein That Confers Broad-Spectrum White Rust Resistance in *Arabidopsis thaliana* to Four Physiological Races of *Albugo candida*. / 757 *MPMI*, 21(6), 757–768. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
10. Borhan, M. H., Holub, E. B., Kindrachuk, C., Omid, M., Bozorgmanesh-Frad, G., & Rimmer, S. R. (2010). WRR4, a broad-spectrum TIR-NB-LRR gene from *Arabidopsis thaliana* that confers white rust resistance in transgenic oilseed

- brassica crops: Short communication. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 283–291. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00599.x>
11. Brodersen P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth, and O. Voinnet. (2008). Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185–1190. DOI:10.1126/science.1159151
  12. Brosseau, C., Bolaji, A., Roussin-Léveillé, C., Zhao, Z., Biga, S., & Moffett, P. (2020). Natural variation in the Arabidopsis AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X. *New Phytologist*, 226(3), 866–878. [doi.org/10.1111/nph.16397](https://doi.org/10.1111/nph.16397)
  13. Cai, Q., He, B., Weiberg, A., Buck, A. H., & Jin, H. (2019). Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLoS Pathogens*, 15(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008090>
  14. Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C., & Herrera-Estrella, A. (2013). The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 96–112. <https://doi.org/10.1111/mmi.12261>
  15. Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2006). Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 499–506. <https://doi.org/10.1128/EC.5.3.499-506.2006>.
  16. Castel, B., Fairhead, S., Furzer, O. J., Redkar, A., Wang, S., Cevik, V., Holub, E. B., & Jones, J. D. G. (2021). Evolutionary trade-offs at the Arabidopsis WRR4A resistance locus underpin alternate Albugo candida race recognition specificities. *Plant Journal*, 107(5), 1490–1502. <https://doi.org/10.1111/tpj.15396>.
  17. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
  18. Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. In *Cell* (Vol. 124, Issue 4, pp. 803–814). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>.
  19. Dangl J. L. y Jones J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. (2001). [www.nature.com](http://www.nature.com).
  20. Daudi, A., O'brien, J. A., & Author, B. P. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves HHS Public Access Author manuscript. In *Bio Protoc* (Vol. 2, Issue 18).

21. Dautt-Castro, M., Estrada-Rivera, M., Olguin-Martínez, I., Rocha-Medina, M. del C., Islas-Osuna, M. A., & Casas-Flores, S. (2020). TBRG-1 a Ras-like protein in *Trichoderma virens* involved in conidiation, development, secondary metabolism, mycoparasitism, and biocontrol unveils a new family of Ras-GTPases. *Fungal Genetics and Biology*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103292>
22. Deleris, A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K. D. Kasschau, J. C. Carrington, and O. Voinnet (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
23. Desclos-Theveniau, M., Arnaud, D., Huang, T. Y., Lin, G. J. C., Chen, W. Y., Lin, Y. C., & Zimmerli, L. (2012). The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *PLoS Pathogens*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002513>
24. Dunker, F., Lederer, B., & Weiberg, A. (2021). Plant ARGONAUTE protein immunopurification for pathogen cross kingdom small RNA analysis. *Bio-Protocol*, 11(3). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3911>
25. Durrant, W.E. and Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 185–209.
26. Dutta, A., Choudhary, P., Caruana, J., & Raina, R. (2017). JMJ27, an Arabidopsis H3K9 histone demethylase, modulates defense against *Pseudomonas syringae* and flowering time. *Plant Journal*, 91(6), 1015–1028. <https://doi.org/10.1111/tpj.13623>.
27. Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. In *Plant Journal* (Vol. 45, Issue 4, pp. 616–629). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x>
28. Estrada-Rivera, M., Rebolledo-Prudencio, O. G., Pérez-Robles, D. A., Rocha-Medina, M. D. C., González-López, M. D. C., & Casas-Flores, S. (2019). *Trichoderma* histone deacetylase HDA-2 modulates multiple responses in arabidopsis. *Plant Physiology*, 179(4), 1343–1361. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01092>
29. Ferdous J., Hanafi M. M, Rafii M. Y. and Muhammad K. (2012). A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology*, 11(27). <https://doi.org/10.5897/ajb11.3283>
30. Giraldo, M., Dagdas, Y., Gupta, Y. et al. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat Commun* 4, 1996 (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms2996>.
31. Harvey, J. J., Lewsey, M. G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J. P., & Baulcombe, D. C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS one*, 6(1), e14639. [10.1371/journal.pone.0014639](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014639)
32. H. H. Flor. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 9:275-296.

33. Henderson, I. R. X. Zhang, C. Lu, L. Johnson, B. C Meyers, P. J Green, S. E Jacobsen. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genet.* 38, 721–725.
34. Heydari, L., Bayat, H., & Gregory, A. S. (2021). Investigating the effect of inoculation of chickpea with rhizobium and mycorrhizal fungi (*Funneliformis mosseae*) on soil mechanical and physical behavior. *Geoderma*, 385. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114860>.
35. Hnasko, T.S., Hnasko, R.M. (2015). The Western Blot. In: Hnasko, R. (eds) ELISA. *Methods in Molecular Biology*, vol 1318. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9).
36. Hoagland, D., Arnon, D., Hoagland, D. R., Arnon, D. I., & Hutchison, C. B. (1950). The water-culture method for growing plants without soil / THE WATER-CULTURE METHOD FOR GROWING PLANTS WITHOUT SOIL. *Plant Physiologist in the Experiment*. <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j>
37. Huang, X., Zheng, C., Liu, F., Yang, C., Zheng, P., Lu, X., Tian, J., Chung, T., Otegui, M. S., Xiao, S., Gao, C., Vierstr, R. D., & Li, F. (2019). Genetic analyses of the arabidopsis ATG1 kinase complex reveal both kinase-dependent and independent autophagic routes during fixed-carbon starvation. *Plant Cell*, 31(12), 2973–2995. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00066>
38. Huang, Y., Chen, D., Liu, C., Shen, W., & Ruan, Y. (2016). Evolution and conservation of JmjC domain proteins in the green lineage. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(1), 33–49. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1089-4>
39. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 21(6):635-7. doi: 10.1038/nbt831.
40. Jang-Kyun Seo, Jianguo Wu, Yifan Lii, Yi Li, and Hailing Jin. 2013. Contribution of Small RNA Pathway Components in Plant Immunity. *Mol Plant Microbe Interact.* 26(6): 617–625. doi:10.1094/MPMI-10-12-0255-IA.
41. Jain, R., Aggarwal, A. K., & Rechkoblit, O. (2018). Eukaryotic DNA polymerases. In *Current Opinion in Structural Biology* (Vol. 53, pp. 77–87). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.06.003>
42. Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323329.
43. Jung, I. J., Ahn, J. W., Jung, S., Hwang, J. E., Hong, M. J., Choi, H. il, & Kim, J. B. (2019). Overexpression of rice jacalin-related mannose-binding lectin (OsJAC1) enhances resistance to ionizing radiation in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2056-8>
44. Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., Yang He, S., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial

- virulence factor coronatine. 7100–7105 PNAS May 13, 2008 vol. 105 no. 19. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802332105](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802332105)
45. Kim, C. Y., Song, H., & Lee, Y. H. (2022). Ambivalent response in pathogen defense: A double-edged sword? In *Plant Communications* (Vol. 3, Issue 6). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100415>.
46. Klose, R. J., Kallin, E. M., & Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature Reviews Genetics*, 7(9), 715–727. <https://doi.org/10.1038/nrg1945>
47. Li, D., Liu, R., Singh, D., Yuan, X., Kachroo, P., & Raina, R. (2020). JMJ14 encoded H3K4 demethylase modulates immune responses by regulating defence gene expression and pipecolic acid levels. *New Phytologist*, 225(5), 2108–2121. <https://doi.org/10.1111/nph.16270>
48. Li, X. (2011). Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*. *Bio-protocol*. In *Iss* (Vol. 1). <http://www.bio-protocol.org/e95>.
49. Liu, B., Seong, K., Pang, S., Song, J., Gao, H., Wang, C., Zhai, J., Zhang, Y., Gao, S., Li, X., Qi, T., & Song, S. (2021). Functional specificity, diversity, and redundancy of Arabidopsis JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense. *New Phytologist*, 231(4), 1525–1545. <https://doi.org/10.1111/nph.17477>
50. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
51. Liu, Q., Feng, Y. & Zhu, Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct. Integr. Genom.* 9, 277–286 (2009).
52. Liu, J., Elmore, J. M., & Coaker, G. (2009). mini-review mini-review RIN4 is an Important Negative Regulator in Plant Innate Immunity. In *Plant Signaling & Behavior* (Vol. 4).
53. Liu, D., Zhang, X. X., Xi, B. X., Wan, D. Y., Li, L., Zhou, J., Wang, W., Ma, D., Wang, H., & Gao, Q. L. (2014). Sine oculis homeobox homolog 1 promotes DNA replication and cell proliferation in cervical cancer. *International Journal of Oncology*, 45(3), 1232–1240. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2510>
54. Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang XJ, Cao X. 2008. Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. *J. Integr. Plant Biol.* 50(7), 886–896.
55. Lu, F., Cui, X., Zhang, S., Liu, C., & Cao, X. (2010). JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in Arabidopsis. In *Cell Research* (Vol. 20, Issue 3, pp. 387–390). <https://doi.org/10.1038/cr.2010.27>
56. Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879–3889. [doi.org/10.1105/tpc.110.080671](https://doi.org/10.1105/tpc.110.080671).

57. Martin, M. (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet Journal*, 17, 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
58. Martínez-Medina, A., Freck V. W. Appels & Saskia C. M. van Wees (2017) Impact of salicylic acid- and jasmonic acid-regulated defences on root colonization by *Trichoderma harzianum* T-78, *Plant Signaling & Behavior*, 12:8, e1345404, DOI:10.1080/15592324.2017.1345404
59. Mateo-Bonmatí, E., Esteve-Bruna, D., Juan-Vicente, L., Nadi, R., Candela, H., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Pérez-Pérez, J. M., & Micol, J. L. (2018). INCURVATA11 and CUPULIFORMIS2 are redundant genes that encode epigenetic machinery components in arabidopsis. *Plant Cell*, 30(7), 1596–1616. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00300>
60. Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). *Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance*. *Annual Review of Plant Biology*. Volume 68, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916>.
61. Meddya, S., Meshram, S., Sarkar, D., Rakesh, S., Datta, R., Singh, S., Avinash, G., Kumar Kondeti, A., Savani, A. K., & Thulasinathan, T. (2023). Plant Stomata: An Unrealized Possibility in Plant Defense against Invading Pathogens and Stress Tolerance. In *Plants* (Vol. 12, Issue 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants12193380>
62. Micol-Ponce, R., Sánchez-García, A. B., Xu, Q., Barrero, J. M., Micol, J. L., & Ponce, M. R. (2015). Arabidopsis INCURVATA2 Regulates Salicylic Acid and Abscisic Acid Signaling, and Oxidative Stress Responses. *Plant and Cell Physiology*, 56(11), 2207–2219. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv132>
63. Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., & Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, 133(1), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.033>
64. Mulaosmanovic, E., Lindblom, T. U. T., Bengtsson, M., Windstam, S. T., Mogren, L., Marttila, S., Stützel, H., & Alsanus, B. W. (2020). High-throughput method for detection and quantification of lesions on leaf scale based on trypan blue staining and digital image analysis. *Plant Methods*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00605-5>.
65. Murasnie, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, VOL. 15.
66. Nawrocki EP, Kolbe DL, Eddy SR. (2009). Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics*. 25(10):1335-7. doi: 10.1093/bioinformatics/btp157. Erratum in: *Bioinformatics*. 2009 Jul 1;25(13):1713. PMID: 19307242; PMCID: PMC2732312.
67. Niu, D., Lii, Y. E., Chellappan, P., Lei, L., Peralta, K., Jiang, C., Guo, J., Coaker, G., & Jin, H. (2016). MiRNA863-3p sequentially targets negative immune

- regulator ARLPKs and positive regulator SERRATE upon bacterial infection. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11324>
68. Pathak, A. K., Singh, S. P., Gupta, Y., Gurjar, A. K. S., Mantri, S. S., & Tuli, R. (2016). Transcriptional changes during ovule development in two genotypes of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) with contrast in seed size. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36304>
69. Pedroza-Garcia, J. A., de Veylder, L., & Raynaud, C. (2019). Plant DNA polymerases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20194814>
70. Peng, T., Qiao, M., Liu, H., Teotia, S., Zhang, Z., Zhao, Y., Wang, B., Zhao, D., Shi, L., Zhang, C., Le, B., Rogers, K., Gunasekara, C., Duan, H., Gu, Y., Tian, L., Nie, J., Qi, J., Meng, F., ... Tang, G. (2018). A Resource for Inactivation of MicroRNAs Using Short Tandem Target Mimic Technology in Model and Crop Plants. *Molecular Plant*, 11(11), 1400–1417. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.003>
71. Pieterse, C. M. J., van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
72. Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
73. Qian, S., Wang, Y., Ma, H., & Zhang, L. (2015). Expansion and functional divergence of Jumonji C-containing histone demethylases: Significance of duplications in ancestral angiosperms and vertebrates. *Plant Physiology*, 168(4), 1321–1337. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00520>
74. Ramírez-Valdespino, C. A., Casas-Flores, S., & Olmedo-Monfil, V. (2019). Trichoderma as a model to study effector-like molecules. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01030>
75. Rebolledo-Prudencio, O. G., Dautt-Castro, M., Estrada-Rivera, M., González-López, M. del C., Jijón-Moreno, S., & Casas-Flores, S. (2020). Trichoderma in the rhizosphere: An approach toward a long and successful symbiosis with plants. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Recent Developments in Trichoderma Research* (pp. 3–38). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819453-9.00001-5>
76. Rebolledo-Prudencio, O. G., Estrada-Rivera, M., Dautt-Castro, M., Arteaga-Vazquez, M. A., Arenas-Huertero, C., Rosendo-Vargas, M. M., Jin, H., & Casas-Flores, S. (2022). The small RNA-mediated gene silencing machinery is required in Arabidopsis for stimulation of growth, systemic disease resistance, and

- suppression of the nitrile-specifier gene NSP4 by *Trichoderma atroviride*. *Plant Journal*, 109(4), 873–890. <https://doi.org/10.1111/tpj.15599>.
77. Redkar, A., Cevik, V., Bailey, K., Zhao, H., Kim, D. S., Zou, Z., Furzer, O. J., Fairhead, S., Borhan, M. H., Holub, E. B., & Jones, J. D. G. (2023). The Arabidopsis WRR4A and WRR4B paralogous NLR proteins both confer recognition of multiple *Albugo candida* effectors. *New Phytologist*, 237(2), 532–547. <https://doi.org/10.1111/nph.18378>.
78. Ren, B., Wang, X., Duan, J., & Ma, J. (2019). *Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation*. <http://science.sciencemag.org/>
79. Ren, F., Zhao, C. Z., Liu, C. sen, Huang, K. L., Guo, Q. Q., Chang, L. L., Xiong, H., & Li, X. B. (2014). A Brassica napus PHT1 phosphate transporter, BnPht1;4, promotes phosphate uptake and affects roots architecture of transgenic Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 86(6), 595–607. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0249-y>
80. Sakata N., Ishiga T., Masuo S., Hashimoto Y., and Ishiga Y. Coronatine Contributes to Pseudomonas cannabina pv. alisalensis Virulence by Overcoming Both Stomatal and Apoplastic Defenses in Dicot and Monocot Plants MPMI Vol. 34, No. 7, 2021, pp. 746–757
81. 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9782-6>
82. Salas-Marina, M. A., Isordia-Jasso, M. I., Islas-Osuna, M. A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A., & 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(FEB). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00077>
83. Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(5), 1121–1133. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039834>
84. Silvestri, A., Ledford, W. C., Fiorilli, V., Votta, C., Scerna, A., Tucconi, J., ... & Lanfranco, L. (2025). A fungal sRNA silences a host plant transcription factor to promote arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 246(3), 924-935. [doi.org/10.1111/nph.20273](https://doi.org/10.1111/nph.20273)
85. Siskos, L., Antoniou, M., Riado, J., Enciso, M., Garcia, C., Liberti, D., Esselink, D., Baranovskiy, A. G., Tahirov, T. H., Visser, R. G. F., Kormelink, R., Bai, Y., & Schouten, H. J. (2023). DNA primase large subunit is an essential plant gene for

- geminiviruses, putatively priming viral ss-DNA replication. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1130723>
86. Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). *Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
87. Tang G, Yan J, Gu Y, Qiao M, Fan R, Mao Y, Tang X. 2012). Construction of short tandem target mimic (STTM) to block the functions of plant and animal microRNAs. *Methods*. 58(2):118-25. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.10.006. PMID: 23098881.
88. Tsukada, Y. I., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078), 811–816. <https://doi.org/10.1038/nature04433>
89. Vaucheret, H. Plant ARGONAUTES. (2008). *Trends Plant Sci*. 13(7):350-8. doi: 10.1016/j.tplants.2008.04.007.
90. van der Ent, S., van Hulten, M., Pozo, M. J., Czechowski, T., Udvardi, M. K., Pieterse, M. J., & Ton, J. (2009). Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid: differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183, 419–431. <https://doi.org/10.1111/j>
91. van Schie, C. C. N., & Takken, F. L. W. (2014). Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>
92. van Kan, J. A. L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. In *Trends in Plant Science* (Vol. 11, Issue 5, pp. 247–253). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>
93. Varkonyi-Gasic, E., & Hellens, R. P. (2010). qRT-PCR of Small RNAs. *Methods in Molecular Biology*, Igor Kovalchuk and Franz Zemp (eds.), *Plant Epigenetics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 631, DOI 10.1007/978-1-60761-646-7\_10.
94. Villalobos-Escobedo, J. M., Martínez-Hernández, J. P., Pelagio-Flores, R., González-De la Rosa, P. M., Carreras-Villaseñor, N., Abreu-Goodger, C., & Herrera-Estrella, A. H. (2022). *Trichoderma atroviride* hyphal regeneration and conidiation depend on cell-signaling processes regulated by a microRNA-like RNA. *Microbial Genomics*, 8(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000869>
95. Wang, M., Weiberg, A., Lin, F. M., Thomma, B. P. H. J., Huang, H. da, & Jin, H. (2016). Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2(10). <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.151>
96. Wang, B., Sun, Y., Song, N., Zhao, M., Liu, R., Feng, H., Wang, X., & Kang, Z. (2017). *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by

- suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytologist*, 215(1), 338–350. <https://doi.org/10.1111/nph.14577>
97. Wei, H., & Lozano-Durán, R. (2023). The primase subunits of DNA polymerase  $\alpha$ , PRIM1 and PRIM2, are required for the replication of the geminivirus tomato yellow leaf curl virus in the host plant. <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>
98. Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., Jin H. (2013). Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *SCIENCE*. VOL 342. <http://science.sciencemag.org/>
99. Wong, J. W. H., Lutz, A., Natera, S., Wang, M., Ng, V., Grigoriev, I., Martin, F., Roessner, U., Anderson, I. C., & Plett, J. M. (2019). The influence of contrasting microbial lifestyles on the pre-symbiotic metabolite responses of *Eucalyptus grandis* roots. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00010>
100. Wong-Bajracharya, J., Singan, V. R., Monti, R., Plett, K. L., Ng, V., Grigoriev, I. v, Martin, F. M., Anderson, I. C., & Plett, J. M. (2022). *The ectomycorrhizal fungus Pisolithus microcarpus encodes a microRNA involved in cross-kingdom gene silencing during symbiosis.* <https://doi.org/10.1073/pnas.2103527119/-/DCSupplemental>
101. Xiang, D., Venglat, P., Tibiche, C., Yang, H., Risseeuw, E., Cao, Y., Babic, V., Cloutier, M., Keller, W., Wang, E., Selvaraj, G., & Datla, R. (2011). Genome-wide analysis reveals gene expression and metabolic network dynamics during embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156(1), 346–356. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171702>
102. You, C., He, W., Hang, R., Zhang, C., Cao, X., Guo, H., Chen, X., Cui, J., & Mo, B. (2019). FIERY1 promotes microRNA accumulation by suppressing rRNA-derived small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12379-z>
103. Yuan, B., Liao, F., Shi, Z. Z., Ren, Y., Deng, X. L., Yang, T. T., Li, D. Y., Li, R. F., Pu, D. D., Wang, Y. J., Tan, Y., Yang, Z., & Zhang, Y. H. (2020). Dihydroartemisinin inhibits the proliferation, colony formation and induces ferroptosis of lung cancer cells by inhibiting PRIM2/SLC7a11 axis. *OncoTargets and Therapy*, 13, 10829–10840. <https://doi.org/10.2147/OTT.S248492>
104. Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
105. Zhang, T., Zhao, Y. L., Zhao, J. H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z. Q., Fang, Y. Y., Hua, C. L., Ding, S. W., & Guo, H. S. (2016). Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.153>

106. Zhang X, Zhao H, Gao S, Wang WC, Katiyar-Agarwal S, Huang HD, Raikhel N, Jin H. 2011. Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(\*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol Cell*. 2011 May 6;42(3):356-66. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.010.
107. Zhu, C., Liu, J.-H., Zhao, J.-H., Liu, T., Chen, Y.-Y., Wang, C.-H., Zhang, Z.-H., Guo, H.-S., Duan, C.-G., & Pamela Ronald, M. C. (2023). *A fungal effector suppresses the nuclear export of AGO1-miRNA complex to promote infection in plants*. <https://doi.org/10.1073/pnas>

## Material suplementario

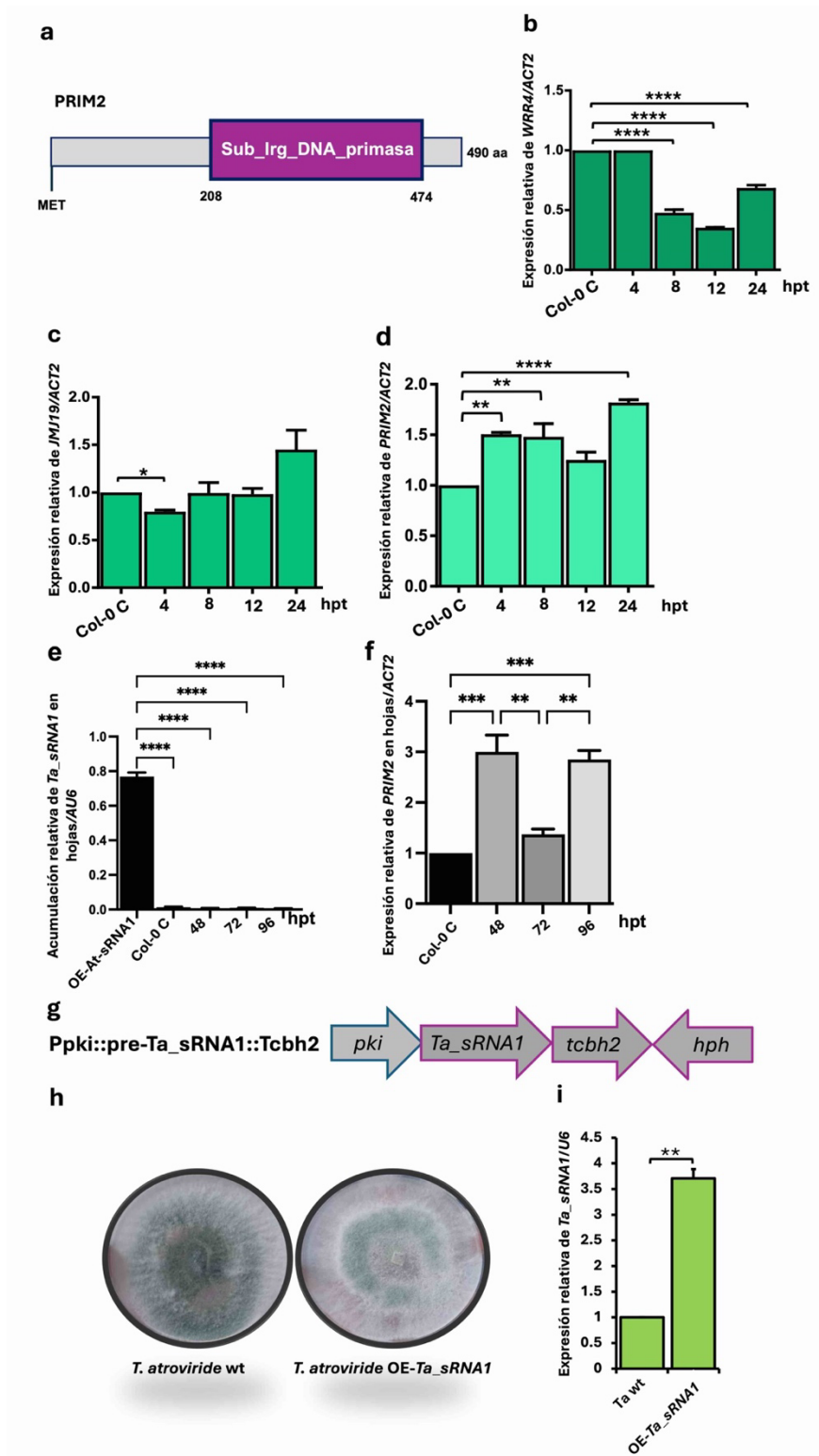
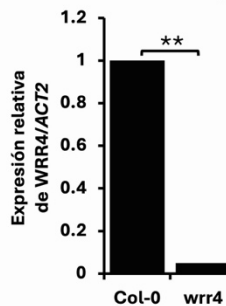
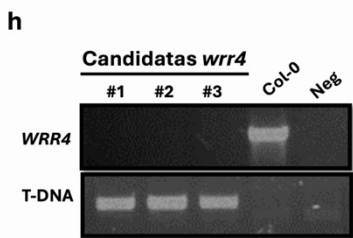
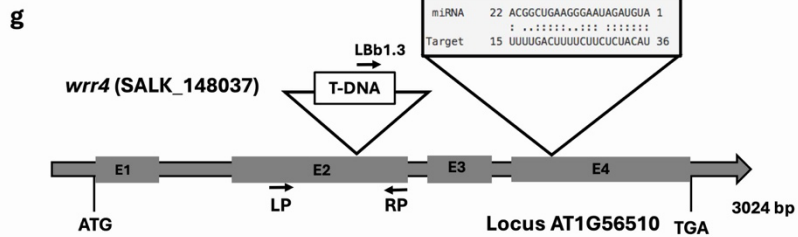
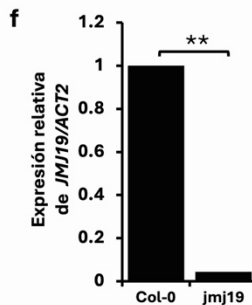
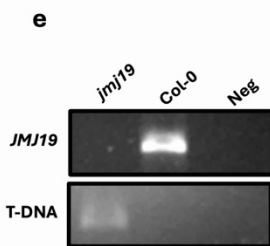
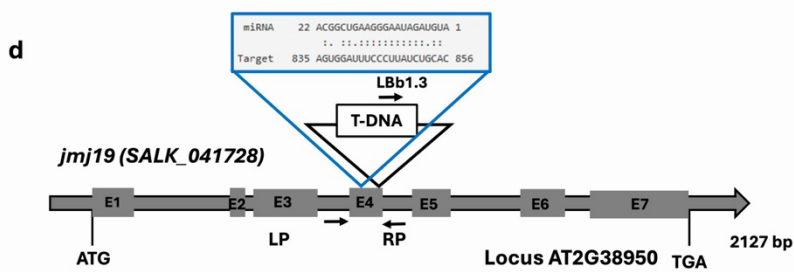
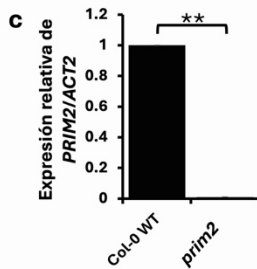
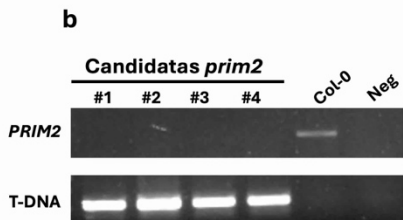
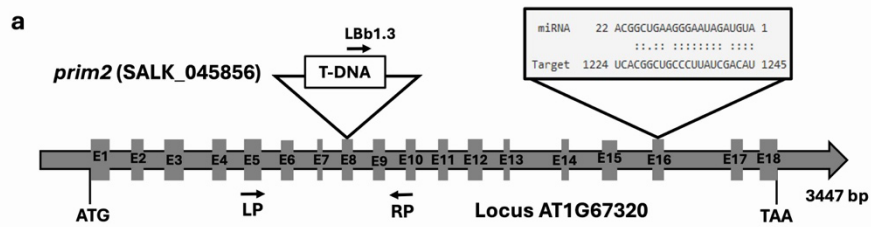
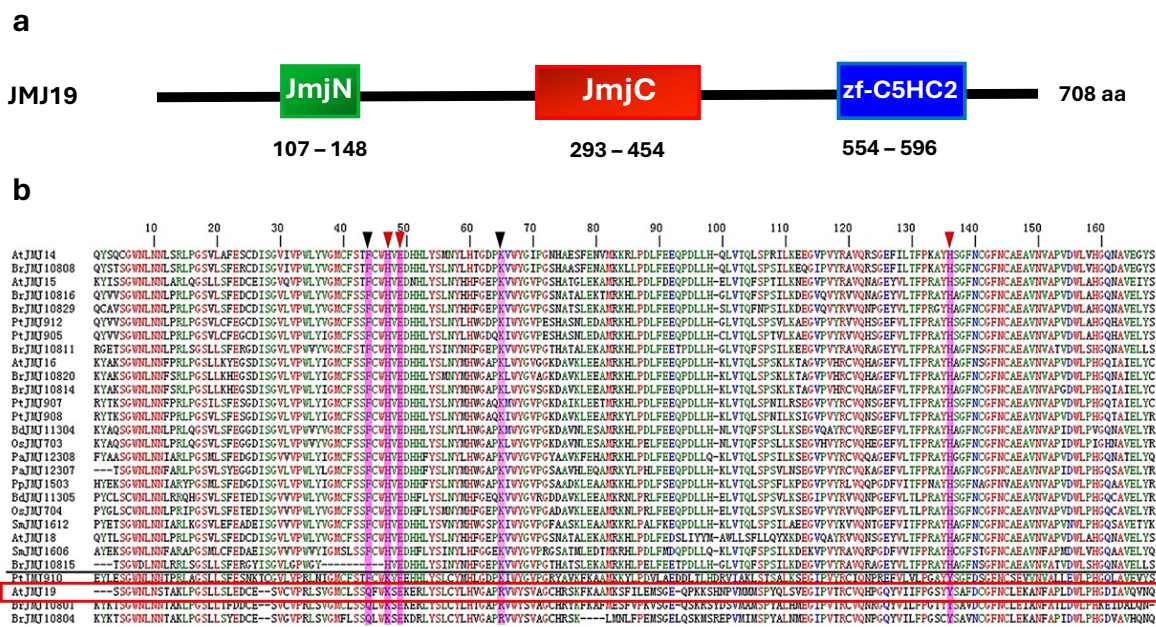


Fig. suplementaria 1. Caracterización funcional del *Ta\_sRNA1* y sus blancos predichos en *Arabidopsis* y cepa OE-*Ta\_sRNA1* de *Trichoderma*. a) Estructura de la proteína PRIM2 que consiste en 490 aminoácidos (aa). El dominio de la subunidad grande

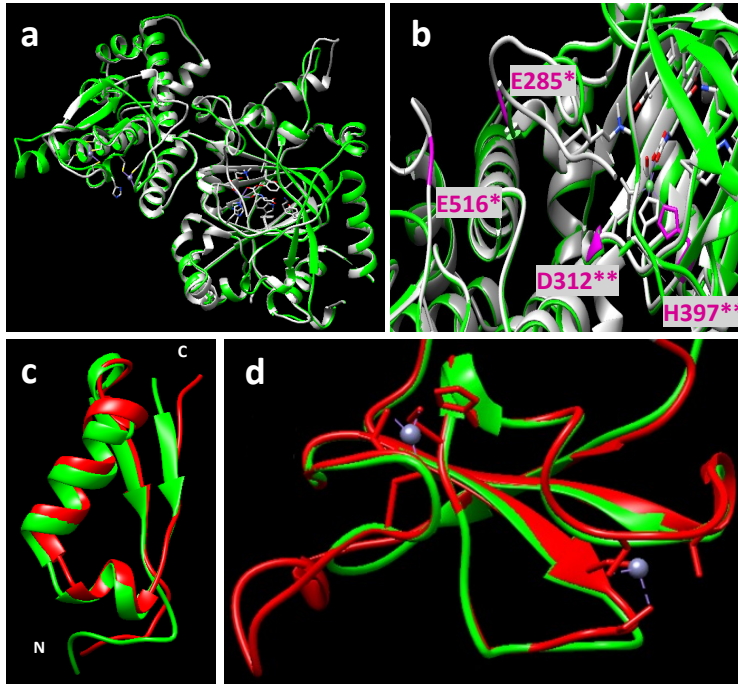
de la DNA primasa se encuentra resaltado en morado y comprende del aa 208 a 474. La estructura de dominios fue determinada usando la base de datos Pfam. **b, c, d)** Plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 de 14 días de edad fueron tratadas o no con *T. atroviride* wt. Los niveles de expresión de **b)** *WRR4*, **c)** *JMJ19* y **d)** *PRIM2* se evaluaron en raíz, mediante RT-qPCR a las 4, 8, 12 y 24 hpt con el hongo. El gen *ACT2* se utilizó como gen normalizador. Los cálculos de expresión relativa se realizaron utilizando el método de Livak y Schmittgen, 2001. **e)** Acumulación de *Ta\_sRNA1* en hojas de Col-0 a las 48, 72 y 96 hpt con *T. atroviride* wt. La acumulación se midió por stem-loop RT-qPCR tomando a *U6-1* de *Arabidopsis* como RNA pequeño normalizador. **f)** Nivel de expresión de *PRIM2* en hojas de Col-0 a las 48, 72 y 96 hpt con *T. atroviride* wt. *ACT2* se usó como gen de referencia. **g)** Esquema del vector Ppki::pre-Ta\_sRNA1::Tcbh2 utilizado para generar la cepa sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* en *T. atroviride* silvestre IMI207040. El vector incluye el promotor de la piruvato kinasa (*pk1*) de *Trichoderma reesei* (Zeilinger *et al.*, 1999), la secuencia del *Ta\_sRNA1* insertada en el esqueleto de miR319a para formar la estructura secundaria *stem-loop* (Schwab *et al.*, 2006), el terminador de la celobiohidrolasa de *T. reesei* y el gen de resistencia a Higromicina (*hph*). **h)** Comparación del fenotipo entre la cepa transformante sobreexpresante del *Ta\_sRNA1* y la cepa silvestre de *T. atroviride* tras 3 días de crecimiento en PDA sin antibiótico. **i)** Evaluación de la acumulación del *Ta\_sRNA1* en el micelio de la cepa transformante y de la cepa silvestre tras siete días de crecimiento en medio PDA sin antibiótico. El nivel de acumulación del *Ta\_sRNA1* se determinó mediante stem-loop RT-qPCR, utilizando el gen *U6* de *T. atroviride* como normalizador y el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Las barras de error representan el error estándar de la media. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0.05$ ), los asteriscos indican diferencia significativa (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ) en b, c, d y e. Las diferencias significativas se determinaron mediante una prueba *t* de Student (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ) en h.



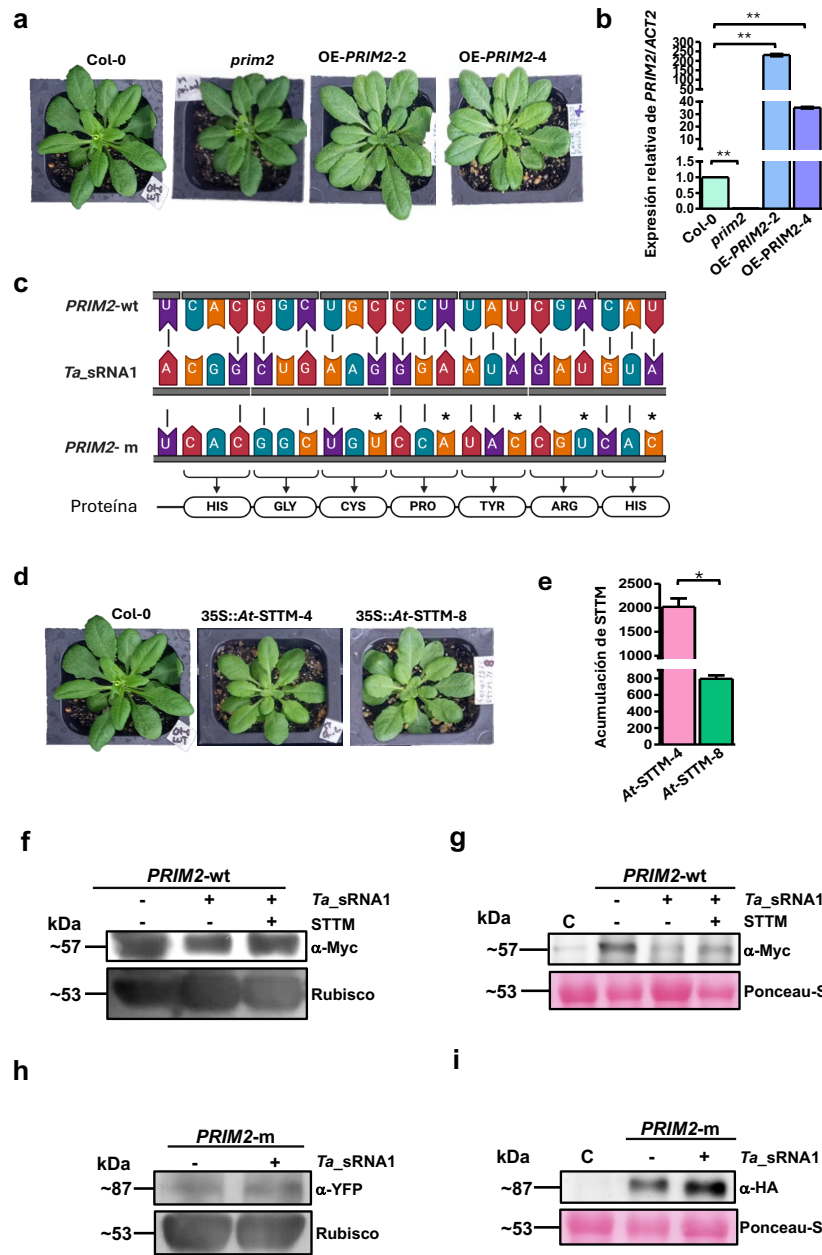
**Fig. suplementaria 2: Caracterización molecular de las mutantes insercionales *prim2*, *jmj19* y *wrr4*.** **a, d, g)** Representación esquemática de los loci *AT1G67320*, *AT2G38950* y *AT1G56510*, correspondientes a los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* respectivamente. Se destacan el sitio de unión predicho del *Ta\_sRNA1*, la posición de inserción del T-DNA y los oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de las líneas homocigotas SALK\_045856 (*prim2*), SALK\_041728 (*jmj19*) y SALK\_148037 (*wrr4*). Las flechas negras indican la localización de los oligonucleótidos, diseñados mediante la herramienta del sitio web del SIGnAL <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>. “E” indica exón. **b, e, h)** Análisis por PCR punto final del DNA genómico de las mutantes insercionales *prim2*, *jmj19*, *wrr4* y de la línea silvestre Col-0. En el panel superior se muestra la amplificación mediante PCR con los oligonucleótidos LP y RP, donde la banda correspondiente al alelo silvestre es visible. El panel inferior muestra la amplificación con los oligonucleótidos LBb1.3 y RP, confirmando la presencia del T-DNA en las líneas mutantes. **c, f, i)** Análisis del nivel de expresión relativa de los genes *PRIM2*, *JMJ19* y *WRR4* en las mutantes *prim2*, *jmj19* y *wrr4*, respectivamente, comparadas con la línea silvestre Col-0 mediante RT-qPCR. El gen *ACT2* se utilizó como control interno para la normalización, siguiendo el método de Livak y Schmittgen (2001). Las barras de error representan el error estándar de la media. Se realizaron pruebas t de Student (\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01).



**Fig. suplementaria 3. Estructura de dominios de JMj19 y alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con dominio JmjC de distintas especies vegetales.** Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas que contienen el dominio JmjC en diversas especies de plantas. Se destacaron los residuos conservados esenciales para la unión a los cofactores Fe (II) y  $\alpha$ KG, necesarios para la actividad catalítica de desmetilación de histonas. Los de unión de Fe (II) se indican mediante flechas rojas, mientras que los sitios de unión a  $\alpha$ KG se señalan con flechas negras. Esta figura fue adaptada de la figura suplementaria publicada por Qian et al. (2015).

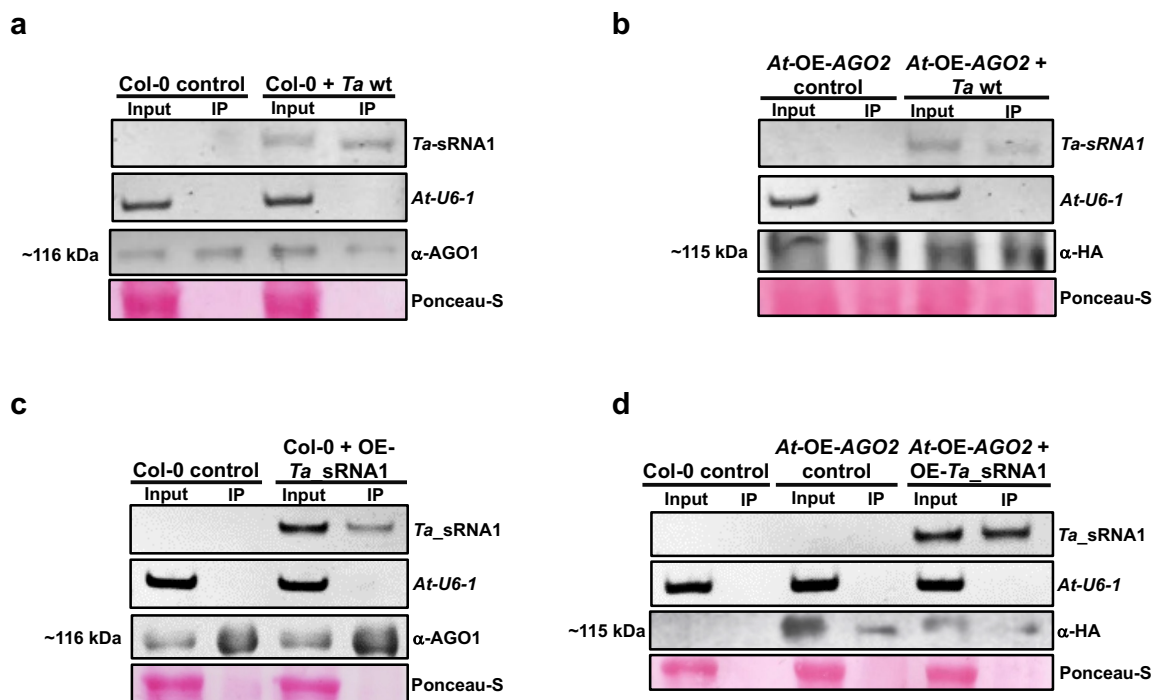


**Fig. suplementaria 4. Superposición estructural de la proteína JMJ19 con JMJ14 de *A. thaliana* y con JMJD2A de humano.** **a)** Superposición de la estructura predicha de la proteína JMJ19, que incluye los dominios JmjN, JmjC y C5HC2, con la estructura tridimensional resuelta del dominio catalítico JMJ14 (JMJ14CD) de *A. thaliana* en complejo con el péptido H3 (1-10) K4me3. Los residuos comprendidos entre los aminoácidos 94 y 614 de JMJ19 mostraron un alineamiento del 100% con el JMJ14CD. La proteína JMJ14 se representa en color gris, mostrando los dominios jumonji, helicoidales y C5HC2, mientras que JMJ19 se representa en verde, destacando los dominios JmjN, JmjC y C5HC2. **b)** Residuos críticos para la actividad catalítica de JMJ14 (violeta) superpuestos con los de JMJ19 (verde). Los residuos marcados con doble asterisco indican aquellos esenciales para la actividad catalítica, mientras que los marcados con un solo asterisco no son esenciales, pero sí son importantes. El modelado y visualización de la estructura terciaria se realizaron con el software Chimera (versión 1.14). **c)** Superposición del dominio JmjN de la estructura predicha de JMJ19 (verde) con el dominio JmjN de la proteína JMJD2A de humano (rojo). La actividad de desmetilación de las histonas H3K9 y H3K36 di- y tri-metiladas por JMJD2A requiere la presencia del dominio JmjN. El modelado de la superposición se llevó a cabo utilizando Chimera (versión 1.14). **d)** Superposición del dominio tipo dedo de zinc de la estructura predicha de JMJ19 (verde) con el dominio correspondiente de la estructura tridimensional resuelta de JMJ14 (rojo) de *A. thaliana*, mostrando la secuencia conservada C5HC2. Los iones  $Zn^{2+}$  se representan en azul. El modelado estructural fue realizado con Chimera (versión 1.14).



**Fig. suplementaria 5. Análisis funcional del silenciamiento de *PRIM2* por el *Ta\_sRNA1*, en líneas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de *PRIM2*, *STTM* y expresión transitoria en *N. benthamiana*. a, h) Fenotipo de las líneas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresantes OE-PRIM2-2 y -4, Col-0 y *prim2* (a) y de las líneas 35S::At-STTM-4 y -8 (h) bajo el promotor 35S, cultivadas en sustrato compuesto por peat moss, perlita, y vermiculita (3:1:1). Las plantas fueron fotografiadas a los 35 días de edad. b, i) Análisis del nivel de expresión del gen *PRIM2* (b) y de la acumulación del STTM (i) en las plantas transgénicas cosechadas a los 14 días de edad, evaluadas mediante RT-qPCR. El gen *ACT2* de *A. thaliana* se utilizó como control interno normalizador, empleando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Las barras de error representan el error estándar de la media. Las diferencias significativas en b, se determinaron mediante ANOVA de una vía ( $\alpha \leq 0.05$ ), los asteriscos indican diferencia significativa (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P = 0.001$ ; \*\*\* $P = 0.0001$ ;**

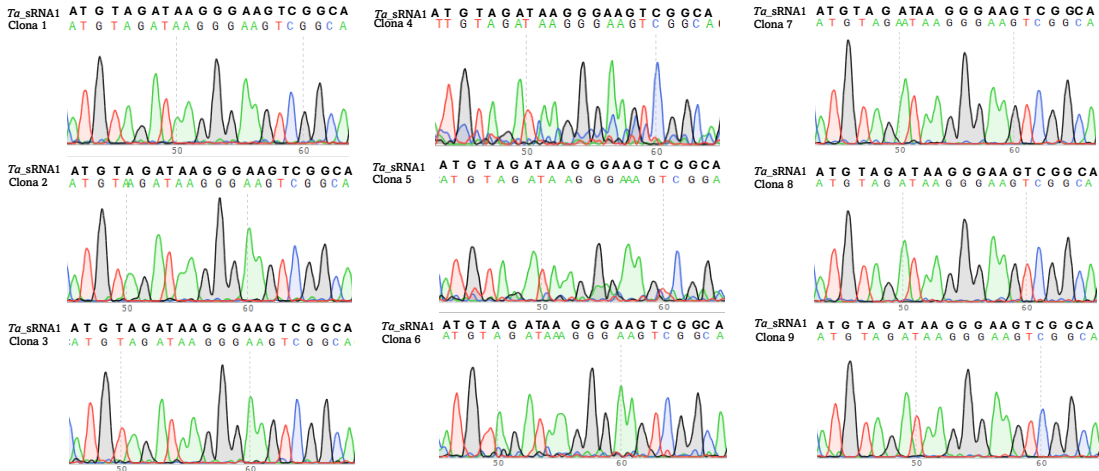
\*\*\*\* $P < 0.0001$ ) y en **i**, se determinaron mediante una prueba *t* de Student (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). **c**) Esquema de las cinco mutaciones sinónimas introducidas en cinco codones del extremo 3' del gen *PRIM2*, diseñadas para evitar el reconocimiento del *Ta\_sRNA1*. Las mutaciones se realizaron mediante oligos mutagénicos y consistieron en los siguientes cambios nucleotídicos sin alterar la secuencia de aminoácidos: en Cys (C → T), Pro (T → A), Try (T → C), Arg (A → T) y His (T → C). **d, f**) Análisis de Western blot de *PRIM2*. Los niveles proteicos de *PRIM2*-wt y *PRIM2*-m fueron analizados en hojas de *N. benthamiana*. En el panel **d**, se muestran las condiciones: *PRIM2*-wt sin el *Ta\_sRNA1*, *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1*, y *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1* + STTM (carriles 1, 2 y 3). El panel **f** muestra: *PRIM2*-m sin el *Ta\_sRNA1* y *PRIM2*-m + *Ta\_sRNA1* (carriles 1 y 2). Las proteínas *PRIM2*-wt (57 kDa, detectada con anticuerpo anti-myc) y *PRIM2*-m (87 kDa, detectada con anticuerpo anti-HA). La proteína Rubisco se utilizó como control de carga. **e, g**) Análisis de Western blot de *PRIM2*. Los niveles proteicos de *PRIM2*-wt y *PRIM2*-m fueron analizados en hojas de *N. benthamiana*. El panel **e** muestra las condiciones: *Nicotiana* control (C), *PRIM2*-wt sin el *Ta\_sRNA1*, *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1*, y *PRIM2*-wt + *Ta\_sRNA1* + STTM (carriles 1, 2, 3 y 4). El panel **g** muestra: *Nicotiana* C, *PRIM2*-m sin el *Ta\_sRNA1* y *PRIM2*-m + *Ta\_sRNA1* (carriles 1, 2 y 3). Las proteínas *PRIM2*-wt (57 kDa, detectada con anticuerpo anti-myc) y *PRIM2*-m (87 kDa, detectada con anticuerpo anti-HA). La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga de la proteína. Todos los ensayos de western blot fueron realizados al menos dos veces, con los mismos resultados.



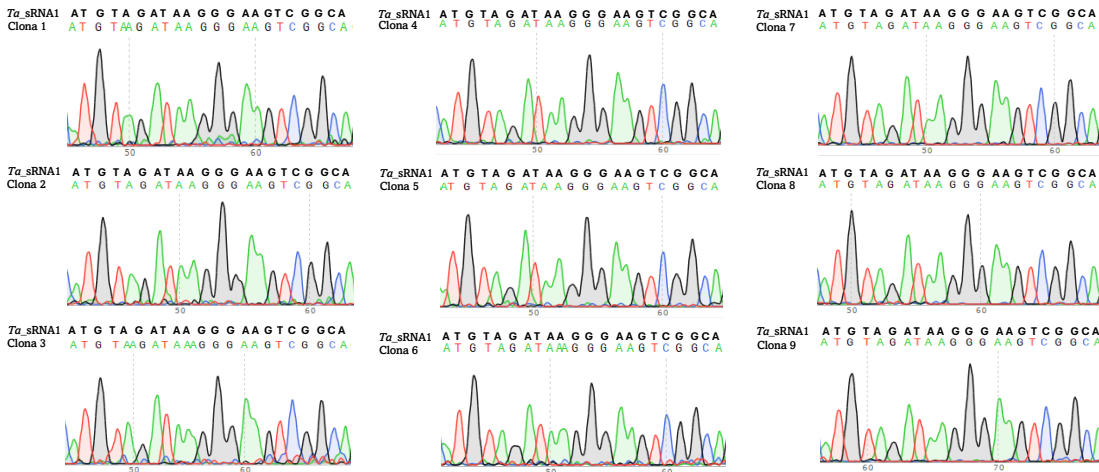
**Fig. suplementaria 6. El *Ta\_sRNA1* de *T. atroviride* es transferido a células de la raíz de *A. thaliana* en donde se asocia a las proteínas AGO1 y AGO2.** Plantas Col-0 y líneas sobreexpresantes de AGO2-HA se cultivaron *in vitro*. A los 14 días de edad, se colocó una membrana de celofán sobre las raíces. **a, b**) Sobre el celofán se inoculó a la cepa silvestre de *T. atroviride* o, **c, d**) Sobre el celofán se inoculó a la cepa sobreexpresante OE-

*Ta\_sRNA1* de *T. atroviride*, con el objeto de evitar el contacto directo entre el hongo y la planta, permitiendo únicamente el paso de pequeñas moléculas, como RNAs pequeños (Wong *et al.*, 2019; Wong-Bajracharya *et al.*, 2022). La inmunoprecipitación de AGO1 se realizó usando anticuerpo anti-AGO1 y la inmunoprecipitación de AGO2 se realizó usando anticuerpo anti-HA. La presencia del *Ta\_sRNA1* se detectó por medio de la técnica de stem-loop RT-qPCR del extracto crudo, antes de la inmunoprecipitación, y de la fracción inmunoprecipitada (IP) de AGO1 y de AGO2. Las proteínas AGO1 y AGO2 se identificaron mediante anticuerpos anti-AGO1 y anti-HA, respectivamente. La tinción Ponceau S se muestra para confirmar la correcta transferencia de proteínas y evaluar la carga de proteínas en las fracciones input. Los experimentos se realizaron 3 veces con resultados similares.

**a** **AGO1**



**b** **AGO2**



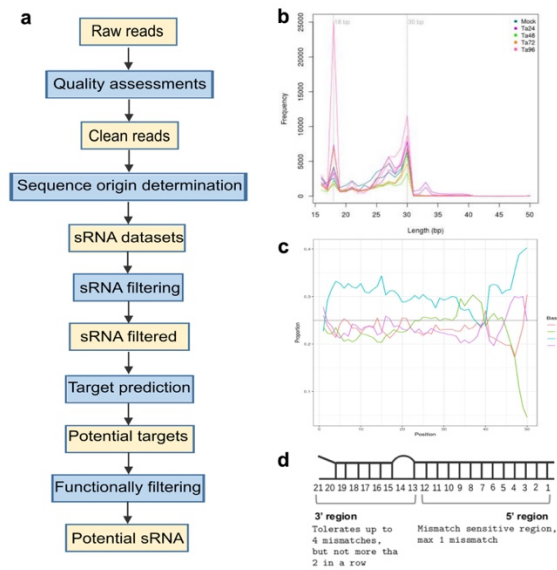
**c**

Ta_sRNA1	ATCTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C1-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C2-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C3-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C4-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C5-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C6-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C7-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C8-AGO1	ATCTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C9-AGO1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
	*****	

**d**

Ta_sRNA1	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C1-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C2-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C3-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C4-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C5-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C6-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C7-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C8-AGO2	ATCTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
C9-AGO2	ATGTAGATAAGGGAAGTCGGCA	22
	*****	

**Fig. suplementaria 7. El *Ta\_sRNA1* se detectó en las fracciones inmunoprecipitadas (IP) de AGO1 y AGO2.** Electroferograma y análisis de secuencia de 9 clonas positivas al *Ta\_sRNA1*. Se realizó el cDNA del *Ta\_sRNA1* con oligo stem-loop, se amplificó por PCR y se clonó en el vector pJET. **a)** Electroferograma de 9 clonas positivas al *Ta\_sRNA1* derivadas del RNA aislado de la fracción IP de AGO1. **b)** Electroferograma de 9 clonas positivas al *Ta\_sRNA1* derivadas del RNA aislado de la fracción IP de AGO2. **c)** alineamiento de la secuencia del *Ta\_sRNA1* con las 9 clonas derivadas de IP-AGO1. **d)** alineamiento de la secuencia del *Ta\_sRNA1* con las 9 clonas derivadas de IP-AGO2.



**Fig. suplementaria 8. Análisis bioinformáticos para la identificación de RNAs pequeños derivados de la interacción *Arabidopsis thaliana*-*Trichoderma atroviride*.**

a) Flujo de trabajo del análisis de las lecturas de RNAs pequeños. Los RNAs pequeños se mapearon en el genoma de *A. thaliana* TAIR10 y de *T. atroviride* v2 (Joint Genome Institute) usando BLAST+ v2.11.0 (word size = 7, e-value  $\leq$  0.1). Se seleccionaron aquellos alineamientos con un solo resultado y que tuvieron como máximo un nt sin aparear. Las lecturas de RNAs pequeños que mapearon en ambos genomas o en RNAs estructurales fueron eliminadas; así como las secuencias con un apareamiento perfecto. Se seleccionaron 31 candidatos de sRNAs que tuvieron posibles genes blanco en *Arabidopsis*.

b) Distribución de lecturas de las secuencias de sRNAs, con mayor acumulación entre los 18 y 30 nt. c) Composición de los nucleótidos en el extremo 5' de todas las lecturas de sRNAs, donde se observa una ligera tendencia al nt Guanina (G). d) Esquema general de la localización de la región semilla (nt 2–12) y de la cola (nt 13–end) de un sRNA y su interacción con su blanco.

**Tabla suplementaria 1. RNAs pequeños (sRNAs) de *T. atroviride* identificados mediante secuenciación de alta profundidad y sus principales genes diana predichos en *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó la herramienta *psRNATarget* (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/>).**

sRNA	Secuencia	Longitud	Promedio del número de lecturas	Ubicación de los RNAs			Mejor blanco	Descripción del blanco
				Contig	Inicio del blanco	Fin del blanco		
11850-1495 ( <i>Ta_sRNA1</i> )	AUGUAGAU AAGG GAAGUCGGCA	22	1495	18	559717	559738	AT4G12120	SEC1B MEMBER OF KEULE GENE FAMILY
123197-69	UUGUUGGUUUC UAGGACCGCC	21	69	18	556366	556386	AT5G64970	MITOCHONDRIAL SUBSTRATE CARRIER FAMILY PROTEIN
124237-68	AUUUGAUAGUAA GGAACAAAU	21	68	24	249272 7	2492707	AT1G22720	PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN
127537-66	UGUUGGUUUCUA GGACCGCCG	21	66	18	556367	556387	AT5G64970	MITOCHONDRIAL SUBSTRATE CARRIER FAMILY PROTEIN
155507-52	GAAAGCUCUCCA AACUCGGUC	21	52	18	557252	557272	AT2G42720	FBD, F-BOX, SKP2-LIKE AND LEUCINE RICH REPEAT DOMAINS CONTAINING PROTEIN
178037-45	UGAAAAGGGGAA GGUUUUUGUA	22	45	26	196730 4	1967283	AT3G05520	ATCPA; CAPPING PROTEIN A; CPA
178577-45	UUGUUUUUUUAC UUUUUCAAU	21	45	18	560315	560335	AT2G38320	TBL34; TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 34
184853-43	UUUGUCUGCUUA AUUGCGAUA	21	43	18	556835	556855	AT2G38630	D FBS INTERACTING PROTEIN 2; FBIP2
211459-37	UCGCAUUUCGCU GCGUUCUUCG	22	37	18	557576	557556	AT4G11720	GCS1; GENERATIVE CELL-SPECIFIC 1; HAP2; HAPLESS 2
257440-31	UUCAAGUCCGGC CGGAAGAAG	21	31	26	249797 2	2497952	AT2G19730	EL28Z;RIBOSOMAL PROTEIN EL28Z
270766-29	CGAAUGAUAGGG ACUCGGGGGC	22	29	18	558834	558856	AT4G16990	RESISTANCE TO LEPTOSPHERIA MACULANS 3
271516-29	AGAAGAGACCUG GUGGAACUG	21	29	23	108216 0	1082140	AT3G29380	PBRP2; PLANT-SPECIFIC TFIIB-RELATED PROTEIN 2
274889-29	AUAAGGGAAGUC GGCAAAUAG	22	29	18	559723	559744	AT4G28630	ABC TRANSPORTER OF THE MITOCHONDRION 1; ABCB23; ATATM1; ATM1; ATP-BINDING CASSETTE B23

274922-29	GAGUUGUAAUUU GUAGACGAU	21	29	18	557991	558011	AT5G41330	AT3G50240
278842-29	CUACUAUCCAGC GAAACCACA	21	29	18	560157	560177	AT3G50240	KICP-02 ENCODES A KINESIN- RELATED PROTEIN
284880-28	AGUAAAAAACA AUAGGAGUAA	22	28	18	560327	560307	AT5G40870	ATUK/UPRT1
289165-28	UUGGGGUUGGG AAUUGGGAUG	21	28	26	194077 1	1940751	AT3G19100	TAGK2
321865-25	GAAAUUGACGGA AGGGCACCAC	22	25	18	556674	556695	AT4G05420	DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1A; DDB1A
340509-24	AAGAAUUGGCUC UAAGGGUUG	21	24	18	559762	559782	AT5G43460	HR-LIKE LESION- INDUCING PROTEIN- LIKE PROTEIN
361057-23	UUAGCAUGGCC CTGCACUAAAG	22	23	27	379537 9	3795358	AT3G13857	HYPOTHETICAL PROTEIN
364505-23	AAAGAUGGUGAA CUAUGCCUG	21	23	18	558641	558661	AT3G19895	RING/U-BOX SUPERFAMILY PROTEIN
367903-22	CGUGGGGAAGU CGUGGGCACU	21	22	25	298307 3	2983091	AT2G16586	TRANSMEMBRANE PROTEIN
387813-21	GUUGGCUGUUG AGACUGGGAAC	22	21	21	134315 8	1343179	AT3G56370	IRK LRR-RLK
398937-21	UGAGUCUGACG GGGAAAACGC	21	21	13	98860	98840	AT5G61150	VIP4
405268-20	UCUCUGUCCGT UUGGAUUGG	21	20	26	196730 5	1967325	AT2G46180	GC4
412325-20	UGGAGCUGGAU UAUCGAGAUG	21	20	27	438553 7	4385517	AT3G18800	TRANSMEMBRANE PROTEIN
50542-237	UAUUUUGUUGGU UUCUAGGAC	21	237	18	556362	556382	AT5G41880	POLA3;POLA4
85387-115	CAACUUCUGGUU UUAAGGUCCU	22	115	18	560358	560379	AT5G16850	TERT
88076-110	AUGUAGUAAGG GAAGUCGGC	21	110	18	559717	559737	AT4G12120	SEC1B MEMBER OF KEULE GENE FAMILY
92221-103	AACUUCUGGUUU UAAGGUCCU	21	103	18	560359	560379	AT5G16850	TERT
95079-98	UGGUUCUAAUUU GUUGGUUUCU	22	98	18	556356	556377	AT5G16660	LOW-DENSITY RECEPTOR-LIKE PROTEIN



<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT3G54980.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 :::: : .....	Target 2431 CUCCGAAUGUCCUUAUCUACAA 2452	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G08550.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : . : : .....	Target 418 UCCUCACGUCCUUUAUCUGCAU 439	NPQ1, AVDE1 non-photochemical quenching 1	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G61860.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : .. : : .....	Target 1367 UCUUGAUCUCUUUUUUUACAU 1388	Protein kinase superfamily protein	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G31520.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 189 CUUCGAGUCCUUUAUCUUCAG 210	Unknown protein	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT5G07790.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 148 GUCCACUUUCCUUGUUUACAU 169	Unknown protein	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT5G13240.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 918 CUUCGCUUCCUUUAUCUGUGU 939	Transcription regulators	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT3G43315.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 406 AACCGA-UUUUUUUAUCUACAU 426	Transposable element gene	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G78670.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 419 GUGUGAUUCCUUAUCUACAA 440	ATGGH3, GGH3 gamma-glutamyl hydrolase 3	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G58250.2	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 1399 AUGUGGUCUCUUUUUAUCUACAU 1420	SAB Golgi-body localisation protein domain;RNA pol II promoter Fmp27 protein domain	Escisión
<i>Ta_sRNA1</i>	3.5	AT1G78000.1	miRNA 22 ACGGCUGAAGGGAAUAGAUGJA 1 : : : : .....	Target 926 UUCCACCUUCUUUGUCUACAU 947	SULTR1;2, SEL1 sulfate transporter 1	Escisión

**Tabla suplementaria 3.** Porcentaje de identidad de la proteína JMJ19 con las 20 proteínas que contienen el dominio jumonji C en *A. thaliana*

Proteína	Identidad (%)	Similitud (%)	Query Cover	E value	Accession
JMJ19	100	100	100%	0.0	NP_181429.2
JMJ31	60	70	12%	2.8	Query_23411
JMJ30	50	57	11%	2.3	Query_55295
JMJ29	41	47	6%	0.91	Query_55657
JMJ15	42	56	79%	4e-127	Query_44049
JMJ14	41	57	80%	3e-138	Query_38577
JMJ18	39	54	84%	2e-128	Query_10037
JMJ16	39	52	99%	5e-149	Query_34709
JMJ22	38	57	12%	0.19	Query_31959
JMJ24	36	50	19%	2.0	Query_34011
JMJ26	35	52	15%	1.4	Query_13177
JMJ17	33	48	66%	3e-59	Query_64033
JMJ11	32	48	56%	1e-28	Query_13667
JMJ25	32	37	7%	1.5	Query_30415
JMJ28	31	47	38%	0.34	Query_2639
JMJ27	31	41	6%	0.62	Query_43059
JMJ13	29	42	80%	2e-47	Query_25427
JMJ21	28	46	17%	1.4	Query_4961
JMJ12	26	39	53%	4e-31	Query_45189
JMJ20	24	61	14%	0.091	Query_61589

**Tabla suplementaria 4.** Lista de oligonucleótidos usados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
I miR-s_sRNA1	GAATGTAGATAAGGGGAAGTCGGCAAATCTCTCTT TTGTATTCC	Para la construcción del amiRNA de <i>T. atroviride</i> , el <i>Ta_sRNA1</i> , en el fondo pRS300.
II miR-a_sRNA1	GATTTGCCGACTTCCCTTATCTACATTCAAAGAGA ATCAATGA	
III miR*s_sRNA1	GATTCGCCGACTTCCGTTATCTTCATTACAGGTC GTGATATG	
IV miR*a_sRNA1	GAATGAAGATAACGGAAGTCGGCGAATCTACATA TATATTCCT	
<i>Ta_sRNA1</i> -Fw	GTATACATGTAGATAAGGGAA	Para la detección del <i>Ta_sRNA1</i> por stem loop RT-qPCR
<i>Ta_sRNA1</i> -Rv	GTGCAGGGTCCGAGGT	
<i>Ta_U6</i> -Fw	GTATACAAGGATGACACGCTC	Para la detección del U6 por stem loop RT-qPCR de <i>Trichoderma</i>
<i>Ta_U6</i> -Rv	GTGCAGGGTCCGAGGT	
<i>PRIM2</i> -ORF-Fw	CACCATGGAAGTGATACGCTCT	Para la amplificación del ORF de <i>PRIM2</i> de cDNA de Col-0 y su clonación en el vector pENTR-SD-D-TOPO
<i>PRIM2</i> -ORF-Rv	AACCGGAGCAGCTGGAGTCTT	
<i>At-PRIM2</i> -TR-Fw	AAGATCATCACATCTGCTCCTG	Para la detección del mRNA de <i>PRIM2</i> por RT-qPCR
<i>At-PRIM2</i> -TR-Rv	CTTCTGACTTTCTCAAAGTATTGG	
<i>At-JMJ19</i> -TR-Fw	TTGCAGATACATACAAGAAGAGTCA	Para la detección del mRNA de <i>JMJ19</i> por RT-qPCR
<i>At-JMJ19</i> -TR-Rv	TTAGCCGTAAGTTCAGATTCC	
<i>At-WRR4</i> -TR-Fw	CATCTTCGATTGGGAATCTTCAT	Para la detección del mRNA de <i>WRR4</i> por RT-qPCR
<i>At-WRR4</i> -TR-Rv	CTACACGACCTTTGTCTATCAGG	
<i>Ta_U6_RT</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACAAAAAT	Para el cDNA por stem-loop del RNA pequeño U6 de <i>Trichoderma</i>
<i>Ta_sRNA1_RT</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCAC TGGATACGACTGCCGA	Para el cDNA por stem-loop del RNA pequeño 1 de <i>Trichoderma</i>
<i>At_PDF1.2</i> Fw	GGAAGACATAGTTGCATGATCC	Para la detección del mRNA de <i>PDF1.2</i> por RT-qPCR
<i>At_PDF1.2</i> Rv	CACCTTATCTTCGCTGCTC	
<i>At_PR1a</i> Fw	CGTCTCCGCCGTGAACAT	Para la detección del mRNA de <i>PR-1a</i> por RT-qPCR
<i>At_PR1a</i> Rv	CGTGTTCCGACCGTAGTTGT	
STTM_sRNA1_Fw	GCTCTAGATGCCGACTTCCCCTATTATCTACATGT TGTTGTTGTTATGGTCTAGTTGTTGTTGTTATGGT CTAATTTAAATATGGTCTAAAGAAGAAGAATATGG TCTAAAGAAGAAGAATTGCCGACTTCCCCTATTAT CTACATATGCATTGG	Para la construcción del STTM contra el <i>Ta_sRNA1</i> en el plásmido pHYG-SM1.
STTM_sRNA1_Rv	CCAATGCATATGTAGATAATAGGGGAAGTCGGCA ATTCTTCTTCTTAGACCATATCTTCTTCTTTAGA CCATATTTAAATTAGACCATAACAACAACAACACTAG ACCATAACAACAACAACATGTAGATAATAGGGGA AGTCGGCATCTAGAGC	
<i>Ta_OE_sRNA1</i> Fw	TGCTCTAGACAAACACACGCTCGGACGCAT	Para la amplificación del <i>Ta_sRNA1</i> a partir del plásmido pRS300 y clonación en el plásmido pHYG-SM1
<i>Ta_OE_sRNA1</i> Rv	CCAATGCATACTAGTGGATCCCCCATG	
<i>At_STTM</i> Fw	CACCGCCGGAAGAACCCTCTTAAC	Para la amplificación del STTM a partir del plásmido pHYG-SM1 y clonación en el vector pENTR-SD-D-TOPO
<i>At_STTM</i> Rv	CCATCGCACATCATTGTTTGAA	
<i>prim2</i> Fw	GCAATCCATGAAGCAGCTTAC	Para la genotipificación de <i>prim2</i>

<i>prim2</i> Rv	GAGTTTGAAGGAGAGGTTGGG	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTGGAAC	PCR del T-DNA
<i>PRIM2</i> -m-Fw	TTCAGGTTATCCTCACTGAAGTGACGGTATGGAC AGCCGTGATGATCCCCAGC	Para la mutagenesis dirigida de sitio del gen <i>PRIM2</i> gene en el plásmido pEG100
<i>PRIM2</i> -m-Rv	GCTGGGGATCATCACGGCTGTCCATACCGTCACT <u>TCAGTGAGGATAACCTGAA</u>	

## Anexo

### *Publicaciones*

**Hernández-Hernández Eyra Judith, Dautt-Castro Mitzuko, Jijón-Moreno Saúl, Padrón-Rodríguez Fernanda, García- Ortega Luis Fernando, González-López María del Carmen, Estrada-Rivera Magnolia, and Casas-Flores Sergio.** 2026. Cross-kingdom sRNA Ta\_sRNA1 silences PRIM2 to fine-tune Arabidopsis immunity during symbiosis with *Trichoderma atroviride*. *New Phytologist*. DOI: 10.1111/nph.71187.

**Dautt-Castro Mitzuko, Jijón-Moreno Saúl, Gómez-Hernández Nicolás, González-López María del Carmen, Hernández-Hernández Eyra Judith, Rosendo-Vargas Maria Montserrat, Rebolledo-Prudencio Oscar G., and Casas-Flores Sergio.** 2022. New Insights on the Duality of *Trichoderma* as a Phytopathogen Killer and a Plant Protector Based on an Integrated Multiomics Perspective. Springer Nature Switzerland AG 2022 N. Amaran et al. (eds.), *Advances in Trichoderma Biology for Agricultural Applications*, *Fungal Biology*, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-91650-3_1).