

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

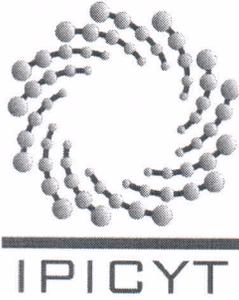
“Transcriptómica de la interacción simbiótica *Trichoderma virens*-*Arabidopsis thaliana* y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo”

Tesis que presenta
Magnolia Estrada Rivera

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2014



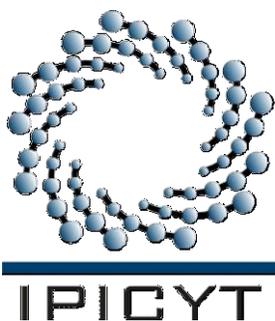
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Transcriptómica de la interacción simbiótica *Trichoderma virens-Arabidopsis thaliana* y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Magnolia Estrada Rivera** y aprobada el **siete de julio del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. J. Sergio Casas Flores
Director de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial

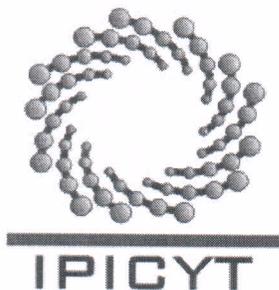


Créditos institucionales

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 Dr. J. Sergio Casas Flores

La investigación descrita en esta tesis fue financiada con recursos otorgados al Dr. J. Sergio Casas Flores por el proyecto SEP-CONACYT-2010-103733 y al Dr. Ramón Gerardo Guevara González de la Universidad Autónoma de Querétaro por el proyecto FORDECYT 2012-02-193512 en colaboración con el IPICYT, siendo el responsable técnico por parte del IPICYT el Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: **279183**



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 117 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 7 días del mes de julio del año 2014, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Magnolia Estrada Rivera

sobre la Tesis intitulada:

Transcriptómica de la interacción simbiótica Trichoderma virens-Arabidopsis thaliana y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. J. Sergio Casas Flores

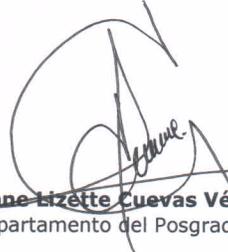
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 7 días del mes de julio de 2014.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

*A Dios y a mi familia, razón de mi existir y mi principal motivación.
Porque no hay manera de retribuir tanto esfuerzo y amor. Gracias.*

Agradecimientos

Al Dr. J Sergio Casas Flores, por ser un gran maestro, guía y apoyo. Porque su alegría siempre me contagia y me anima a seguir adelante.

A la Dra. Mayte Cervantes Badillo, por su ayuda incondicional, los consejos y la amistad. Gran parte de su apoyo se ve reflejado en este trabajo.

A José de Jesús Gallardo Negrete, por sus enseñanzas, por su paciencia y por su colaboración en este proyecto.

Al Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate, por la ayuda en los análisis bioinformáticos.

A mis asesores el Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y en especial a la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz por tomarse parte de su valioso tiempo en los comentarios y sugerencias de este trabajo.

Al Dr. Ángel Alpuche, por apoyarme en gran medida con el equipo necesario para la realización de este trabajo.

A la Q.F.B. Rosalba Castillo, a Claudia Ramos y en especial a la I. A. F. Isabel Isordia, por apoyarme con el material y equipo necesario.

A mis compañeros: Miguel Ángel Silva, Macario Osorio, Angélica Ramírez, José Luis Rodríguez, Ángel Jiménez, Francisco Pérez, Javier Montalvo, Cintía Gómez, Nicolás Gómez y en especial a: Angélica del Roció Cervantes y Oscar Guillermo Prudencio, por su ayuda, por su amistad y por sus valiosos consejos.

A mis amigas Byanca Espinoza, Omayra Bolaños, Cesia Hernández y María Teresa Reinoso. Gracias por su apoyo, por su amistad y por ser la alegría de mis días.

A Felipe Medina, por formar parte de este reto agradezco tu comprensión e incondicional apoyo.

A José Manuel Villalobos, por su ayuda en el análisis de enriquecimiento.

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
MATERIAL SUPLEMENTARIO	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
Página de título	xiv
INTRODUCCIÓN	1
RESULTADOS	4
El transcriptoma de <i>T. virens</i> es reprogramado por <i>A. thaliana</i> principalmente a las 48 horas de interacción	4
Los análisis de RNA-Seq de <i>T. virens</i> durante su interacción con <i>A. thaliana</i> presentan una exactitud del 84% con respecto a su validación por qRT-PCR	5
Anotación funcional de genes expresados diferencialmente.....	6
Generación de cepas mutantes en algunos de los genes regulados diferencialmente en <i>T. virens</i>	6
DISCUSIÓN	8
CONCLUSIONES	11
MÉTODOS	12
Materiales biológicos y condiciones de cultivo	18
Construcción y validación de las genotecas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa (qRT-PCR de sus siglas en inglés).....	18
Análisis del transcriptoma	19
Validación del transcriptoma de <i>T. virens</i> por qRT-PCR	20

Generación de las construcciones genéticas para el remplazo génico de los genes <i>Tvset</i> , <i>Tvgtpase</i> , <i>Tvsnf2</i> y <i>Tvpkc</i>	21
Transformación de <i>T. virens</i> por el método de protoplastos y selección de transformantes estables	21
Contribución de los autores.....	24
BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Expresión relativa de 19 genes expresados diferencialmente a las 48, 72 y 96 hpi (horas post-inoculación), en los análisis de RNA-Seq.	24
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Niveles de expresión del gen <i>sm-1</i> de <i>T. virens</i> Tv28.9 en presencia y ausencia de <i>A. thaliana</i> mediante qRT-PCR.....	26
Figura 2. <i>T. virens</i> presenta una reprogramación de su transcriptoma en respuesta a la presencia de <i>A. thaliana</i>	28
Figura 3. Análisis por qRT-PCR de 19 genes expresados diferencialmente en <i>T. virens</i> durante su interacción con <i>A. thaliana</i>	31
Figura 4. Análisis de enriquecimiento de los principales grupos de GenOntology (GO) de la interacción <i>T. virens</i> - <i>A. thaliana</i>	32
Figura 5. Construcciones genéticas de TvSET, TvGTPasa, TvSNF2 y TvPKc, representación gráfica de los sitios de restricción de las construcciones y verificación por restricción de las mismas.	34
Figura 6. Análisis de PCR punto final para verificar el reemplazo génico en cepas transformantes de Tvset y Tvsnf2.	35

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Oligonucleótidos para verificar las genotecas de la interacción *T. virens*-*A. thaliana*¡Error! Marcador no definido.**35**

Tabla suplementaria 2. Oligonucleótidos para la validación del transcriptoma de *T. virens* durante su interacción con *A. thaliana* **365**

Tabla suplementaria 3. Oligonucleótidos utilizados para la PCR Double-Joint.....36.

Tabla suplementaria 4. Oligonucleótidos utilizados para verificar el reemplazo génico de las transformantes candidatas TvSET y TvSNF2.....37

RESUMEN

Transcriptómica de la interacción simbiótica *Trichoderma virens*-*Arabidopsis thaliana* y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo

Los hongos del genero *Trichoderma* son microorganismos cosmopolitas ubicuos, que colonizan las raíces de la plantas, con lo cual incrementan en estas el crecimiento, la resistencia a enfermedades y la tolerancia a estreses abióticos. Hoy en día son bien conocidos los efectos benéficos que *Trichoderma* brinda a las plantas; sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que median la percepción y reconocimiento del hospedero y que culminan con el establecimiento de una relación simbiótica, a la fecha se desconocen. En el presente trabajo reportamos los cambios en la expresión génica de *T. virens* en respuesta a la presencia de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, bajo un enfoque de RNASeq. Los análisis bioinformáticos mostraron una expresión diferencial de 518, 236 y 153 genes a las 48 72 y 96 hpi (horas post-inoculación), respectivamente. Las categorías de *Gene Ontology* que se sobreexpresaron en el hongo durante la interacción con la planta corresponden a genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de cobre y de metales (48 y 96 hpi), mientras que las categorías que agrupan genes cuyos productos participan en la organización de los lisosomas, organización de las vacuolas, transporte de los carbohidratos (48 hpi) y metabolismo de los carbohidratos (48 y 96 hpi) se reprimieron. El transcriptoma de *T. virens* responde y se reprograma durante las tres etapas que se midieron de la interacción. Los procesos biológicos regulados en *Trichoderma* durante la interacción con la planta nos dan una idea de su importancia en la simbiosis y apuntan hacia los posibles mecanismos moleculares empleados por *Trichoderma*.

Palabras clave: *Trichoderma*, *sm-1*, biocontrol, *Arabidopsis*, simbiosis, transcriptómica

ABSTRACT

Transcriptomic analysis of the symbiotic interaction *Trichoderma virens*-*Arabidopsis thaliana*, and generation of mutants in differentially regulated genes in the fungus

Fungi belonging to the *Trichoderma* genus are ubiquitous cosmopolitan microorganisms that colonize plant roots, which positively impacts in plant growth, resistance to diseases, and tolerance to abiotic stresses. Today, the beneficial effects that *T. virens* confers to plants are well known; however, the molecular mechanisms that mediate the host perception and recognition, which culminates in the establishment of a symbiotic relationship, are not well known. In this study, we report changes in gene expression of *T. virens* in response to the presence of *Arabidopsis thaliana* seedlings, by an RNASeq based approach. The bioinformatic analysis showed differential expression of 518, 236 and 153 genes at 48, 72 and 96 h of coculture with the plant, respectively. *Gene Ontology* categories that were up regulated in the fungus during its interaction with the plant belong to genes coding for proteins involved in the copper and metal transport (48 and 96 hpi) whereas the categories grouping genes whose products are involved in the vacuoles and lysosomes organization and carbohydrate transport (48 hpi), as well as carbohydrate metabolism (48 and 72 hpi) were repressed. The *T. virens* transcriptome is reprogrammed during all stages of the interaction. The biological processes regulated in *Trichoderma* during its interaction with the plant give us an idea of its importance during the symbiosis and point towards the possible molecular mechanisms employed by *Trichoderma*.

Key words: *Trichoderma*, *sm-1*, biocontrol, *Arabidopsis*, symbiosis, transcriptomic

“Transcriptómica de la interacción simbiótica *Trichoderma virens*-*Arabidopsis thaliana* y generación de mutantes en genes regulados diferencialmente en el hongo”

Título de encabezado: Transcriptómica de la interacción *Trichoderma-Arabidopsis*

Número de tablas: 1 (más 4 tablas suplementarias)

Número de Figuras: 6

Magnolia Estrada Rivera, Miguel Ángel Hernández Oñate y Sergio Casas-Flores*

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

Autor para la correspondencia: Sergio Casas-Flores

Direcciones de e-mail:

magnolia.estrada@ipicyt.edu.mx

scasas@ipicyt.edu.mx*

Palabras clave: *Trichoderma*, *sm-1*, biocontrol, *Arabidopsis*, simbiosis, transcriptómica

INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos del genero *Trichoderma* spp. son microorganismos cosmopolitas, aislados en casi todas las latitudes y ecosistemas, que incluyen bosques, pastizales, desiertos y suelos agrícolas [1]. *Trichoderma* muestra una amplia gama de estilos de vida e interacciones con otros hongos, animales y plantas [2]. La asociación de *Trichoderma* con la planta es un área de estudio que tiene gran interés biológico debido a la relación simbiótica que se establece entre esos organismos. Algunos estudios recientes describen, paso a paso, las etapas críticas que rigen la asociación y reconocimiento del hongo con sus hospederos, las cuales incluyen procesos como: la atracción, unión, y penetración a la planta, así como la resistencia a metabolitos tóxicos secretados por la planta. [3]. Durante la colonización de las raíces de las plantas, *Trichoderma* habilita distintas estrategias moleculares que aseguran su éxito, esto a través de la expresión de diversos genes cuyos productos intervienen en diferentes etapas de la colonización. Las proteínas TasHyd1 y Qid74 median la colonización y adherencia del hongo a la raíz [4-5], mientras que la swolenina TasSwo y la endopoligalacturonasa ThPG1 facilitan la penetración de la raíz [7-8]. También se ha determinado que las proteínas transportadores tipo ABC funcionan como un sistema de desintoxicación celular, que permiten a *Trichoderma* resistir el flujo de compuestos tóxicos emitidos por la planta [8]. La promoción del crecimiento de las plantas es uno de los principales resultados directos de la colonización de las mismas por *Trichoderma*. Este proceso ha sido documentado en distintos grupos de plantas herbáceas, ornamentales, forestales y en modelos de estudio como *A. thaliana* [9–11]. Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la promoción del crecimiento en las plantas inducido por *Trichoderma*, incluyendo la síntesis de fitohormonas, la solubilización de los nutrientes del suelo, el aumento en la toma y la translocación de los nutrientes y el incremento en el desarrollo de las raíces [12-13]. Por consiguiente, las plantas tratadas con *Trichoderma* presentan mayor tolerancia a múltiples tipos de estrés, bióticos y abióticos, tales

como la resistencia local y sistémica a patógenos de la raíz y foliares, así como la resistencia a la salinidad, al estrés hídrico y a las temperaturas extremas [14]. Además de la promoción del crecimiento, la protección local y sistémica surge como consecuencia de la secreción de “mensajeros químicos” (efectores/inductores) que activan el sistema de defensa de la planta. Estas moléculas pueden ser proteínas, péptidos de origen no ribosomal (peptaiboles), metabolitos y compuestos volátiles que presenten rasgos estructurales denominados MAMP's o PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Microbios y a Patógenos, respectivamente) [3, 14]. Las dos vías de señalización de resistencia inducidas por *Trichoderma* son: i) la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), dependiente de la fitohormona Ácido Salicílico (SA, de sus siglas en inglés), la cual es acompañada por la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) [15], y ii) la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), dependiente de las fitohormonas Ácido Jasmónico (JA, de sus siglas en inglés) y Etileno (ET, de sus siglas en inglés), en la cual se expresan genes que codifican para proteínas con actividad antimicrobiana como PDF1.1 o peroxidasas, entre otros [16-17]. *Trichoderma* no solo ejerce su acción protectora mediante la activación del sistema inmune, sino que además suprime o inhibe a los fitopatógenos del suelo mediante interacciones directas. El micoparasitismo, la producción de antibióticos y la competencia por nutrientes de la rizósfera son algunos de los mecanismos empleados por *Trichoderma* en el control biológico [14]. *Trichoderma* posee un sinnúmero de atributos, que impactan de forma positiva en el sector agrícola; sin embargo, son pocos los trabajos en que se han analizado los cambios globales en la expresión génica de *Trichoderma* durante la colonización de la planta. Recientemente, se analizó la expresión génica de tres cepas de *Trichoderma* con plantas de tomate, utilizando microarreglos de alta densidad de oligonucleótidos. En este estudio se reporta la inducción de genes que codifican para enzimas importantes en el metabolismo y el transporte de los carbohidratos [18]. Por otra parte, un grupo de investigación diferente obtuvo el

transcriptoma de *T. harzianum* durante su interacción con plantas de tomate; los autores de ese estudio observaron una sobreexpresión de los genes que codifican para enzimas relacionadas al metabolismo de los lípidos, que intervienen en las reacciones de óxido-reducción, en la desintoxicación celular, y en el transporte de aminoácidos y azúcares [19]. En el presente trabajo nos propusimos analizar la transcriptómica del hongo en respuesta a plantas de *A. thaliana*. Para esto, se realizaron co-cultivos de *T. virens* con plántulas de *A. thaliana*, se extrajo el RNA total del hongo a las 48, 72 y 96 horas post inoculación (hpi) de la planta, se generaron las genotecas para RNA-seq y se secuenciaron en la plataforma de secuenciación masiva SOLiD. Los resultados de secuenciación fueron analizados y se determinó que *Trichoderma* presenta una reprogramación muy marcada de su transcriptoma a las 48 de interacción. La validación de 19 genes regulados diferencialmente por qRT-PCR mostró una exactitud del 86% con un 14% de falsos positivos. Con la finalidad de determinar el posible papel de los productos de algunos de los genes regulados, se seleccionaron 4 genes para generar mutantes por reemplazo génico. Estos genes codifican para una metil transferasa de histonas, un remodelador de la cromatina dependiente de ATP, una Guanosina trifosfatasa y una Cinasa. A la fecha tenemos transformantes que podrían tener el remplazo de un gen que codifica para una metil transferasa de histonas y de un gen que codifica para un remodelador de la cromatina dependiente de ATP.

RESULTADOS

El transcriptoma de *T. virens* es reprogramado por *A. thaliana* principalmente a las 48 horas de interacción

Para analizar la expresión génica global de *T. virens* durante su interacción con *A. thaliana*, se generaron 3 genotecas de RNA del hongo a las 48, 72 y 96 horas de cocultivo con plantas de 15 días de edad. Como control se incluyó al hongo creciendo en ausencia de la planta a los mismos tiempos. Previo a la secuenciación, se midió el nivel de expresión del gen *sm-1* el cual se induce en presencia de la planta, y cuyo producto dispara la resistencia sistémica de la misma. [20]. En la **Figura 1** se observa que el gen *sm-1* es inducido por la presencia de *Arabidopsis* en los tres tiempos de interacción con la planta. Esta respuesta del gen *sm-1* se observó en las tres replicas biológicas. Una vez, verificada la inducción del gen marcador *sm-1*, se secuenciaron las genotecas de RNA derivadas de la interacción utilizando la plataforma SOLiD. Los resultados de la secuenciación se recuperaron en formato *.fastaq, se determinó la calidad de las secuencias, se mapearon contra el genoma de *T. virens* y se realizó el análisis transcripcional. Como resultado del análisis estadístico con el programa Edge R, con una tasa de descubrimiento de falsos (FDR por sus siglas en inglés) de ≤ 0.05 y un valor de expresión diferencial (fold change) de ± 2 , se identificaron 518, 236 y 153 genes regulados diferencialmente a las 48, 72 y 96 horas, respectivamente (**Figura 2a**). Los genes fueron agrupados jerárquicamente, de acuerdo al perfil y al tiempo en el que se regularon diferencialmente. A las 48 h se indujeron 84 genes y se reprimieron 434, a las 72 h se indujeron 138 genes y se reprimieron 98, mientras que a las 96 h se indujeron 128 genes y se reprimieron 25 (**Figura 2b**). La reprogramación transcriptómica más marcada ocurrió a las 48 hpi con un gran número de genes modulados diferencialmente, mientras que a las 72 y 96 hpi el

número de genes diferenciales disminuyó a más de la mitad. Asimismo, algunos genes cambiaron de perfil de expresión en fases más tardías de la interacción con la planta (**Figura 2c**).

Los análisis de RNA-Seq de *T. virens* durante su interacción con *A. thaliana* presentan una exactitud del 84% con respecto a su validación por qRT-PCR

Para validar los resultados de RNA-Seq, elegimos un total de 19 genes expresados diferencialmente. Los criterios para la elección fueron los siguientes: diferencial en los 3 tiempos de interacción, diferencial en dos tiempos pero no en uno y diferencial solo en una de las condiciones (**Tabla 1**). Estos genes fueron analizados mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR). De los tres genes que se regularon diferencialmente en las tres condiciones dos de ellos mostraron el perfil de expresión detectado por SOLiD, mientras que el otro gen (de Glutamina amidotransferasa 1) presentó el perfil de expresión esperado en solo uno de los tres tiempos de interacción. De los 6 genes seleccionados que se regularon diferencialmente solo en dos tiempos pero no en uno, 5 de ellos mostraron el perfil de expresión detectado por SOLiD, mientras que el gen restante (3-hidroxiacil-CoA- deshidrogenasa) se consideró un falso positivo. Finalmente, de 10 genes que se regularon solo en una condición, 7 genes mostraron el perfil de expresión detectado por SOLiD, 1 gen se modulo diferencialmente aunque no en el tiempo detectado por SOLiD (Reductasa de quelatos de hierro), 1 gen cumplió con el perfil de expresión en solo uno de los tres tiempos de interacción (Acuaporina) y el gen restante se consideró como un falso positivo (Remodelador de la cromatina). El porcentaje de exactitud del análisis de RNA Seq se determinó sobre la base, de que los genes hubiesen cumplido con el perfil de expresión en al menos uno de los tres tiempos de interacción, considerándose como falsos positivos a los genes

que codifican a la 3- hidroxiacil-CoA- deshidrogenasa, la Reductasa de quelatos de hierro, y al Remodelador de la cromatina (**Figura 3**).

Anotación funcional de genes expresados diferencialmente

El análisis de enriquecimiento para la clasificación funcional en procesos biológicos de los genes que se regularon diferencialmente se realizó con Blast2GO (Gene Ontology). Los procesos biológicos que fueron enriquecidos con la regulación diferencial de los distintos genes, fueron los siguientes: a las 48 h se indujeron los genes que codifican para enzimas involucradas en el transporte de metales y de cobre, mientras que los genes que codifican proteínas que participan en la organización de las vacuolas, el transporte de carbohidratos, la organización de lisosomas y el proceso metabólico de carbohidratos, se reprimieron. A las 72 h los genes que codifican para enzimas involucradas en el proceso metabólico de carbohidratos se reprimieron y a las 96 h se indujeron los genes que codifican para proteínas que participan el transporte de cobre (**Figura 4**).

Generación de cepas mutantes en algunos de los genes regulados diferencialmente en *T. virens*

La regulación diferencial de un gen bajo una condición determinada, sugiere una posible función en el organismo en dicha condición. Basados en este supuesto, se decidió generar mutantes por remplazo génico de 4 genes, los cuales presumiblemente, para una metil transferasa de histonas, un remodelador de la cromatina dependiente de ATP, una guanosina trifosfatasa y una cinasa de serina/treonina. Los primeros tres genes fueron inducidos 1043, 1.2 y 8.5 veces, respectivamente, mientras que el gen PKc-Id.58043 se reprimió 62.5 veces comparado con el control (**Figura 3**). Para generar las mutantes por doble recombinación homóloga se diseñaron oligonucleótidos para 4 construcciones por la técnica de PCR de doble unión (Double Joint PCR) [21]. Las construcciones

genéticas portan un casete que confiere resistencia a higromicina, flanqueado por aproximadamente 1500 nucleótidos de las secuencias 5' y 3' adyacentes del marco de lectura abierto del gen a reemplazar (**Figura 5b**). Las construcciones genéticas para el replazo, designadas TvSET, TvGTPase y TvPKc, fueron verificadas por digestión con la enzima de restricción *Sph* I, mientras que la construcción TvSNF2 fue verificada con *Pst* I. Los tamaños esperados de las digestiones de las construcciones fueron de: 2432 pb, 1274 pb, 642 pb para TvSET; de 1420 pb, 1112 pb, 1054 pb, 579 pb para TvGTPase; 2393 pb, 1056 pb y 761 pb para TvSNF2 y de 1884pb, 1246 pb, 1104 pb y 199 pb para TvPKc, los cuales corresponden a los patrones de restricción observados experimentalmente (**Figura 5a y c**). Las construcciones TvSET y TvSNF2 fueron utilizadas para transformar genéticamente protoplastos de *T. virens*. Las transformantes de Tvset y Tvsnf2 se sometieron a tres rondas consecutivas de pases monoespóricos bajo presión selectiva. Para verificar el replazo génico se extrajo el ADN total de las transformantes y se realizó una PCR punto final con un oligonucleótido sentido 300 pb río arriba de la región seleccionada para la recombinación homóloga y un oligonucleótido reverso sobre el casete de *hph*. Para el caso de *Tvset* se obtuvieron 4 transformantes positivas, mientras que para *Tvsfn2* se obtuvo solo una con el patrón esperado (**Figura 6**). Al realizar un análisis por PCR punto final para determinar la ausencia del gen endógeno, observamos la presencia del gen para ambos grupos de transformantes (datos no mostrados), motivo por el cual continuaremos con un par de rondas más de pases monoespóricos, hasta lograr cepas libres de núcleos silvestres.

DISCUSIÓN

La secuenciación de RNA ha surgido como una poderosa y novedosa herramienta para analizar la expresión génica de un organismo determinado bajo un estímulo en particular. La principal ventaja de esta tecnología comparada con los microarreglos reside en la sensibilidad, la cantidad y la calidad de los datos que se pueden obtener [22]. En los trabajos pioneros sobre la regulación transcripcional de *Trichoderma*, se utilizó la tecnología de macroarreglos para estudiar la interacción del hongo con raíces de plantas de cacao [23] y tomate [19]. Más tarde, se utilizaron tecnologías más robustas como los microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad, para analizar la expresión génica de *T. harzianum* [24], *T. virens*, *T. hamatum* y *T. harzianum* [25] en presencia de plantas de tomate. En este trabajo, reportamos los cambios en el perfil transcriptómico de *T. virens* a las 48, 72 y 96 h de cocultivo con *A. thaliana*, bajo un enfoque de Secuenciación de Nueva Generación. De un total de 12, 427 genes predichos para el genoma de *T. virens* [26], se regularon diferencialmente 691, es decir, solo el 5.5% respondió transcripcionalmente a la presencia de la planta (**Figura 2a**). Aunque la modulación revelada por qRT-PCR y por RNA-Seq difiere en cuanto al nivel de expresión de los 19 genes elegidos, el perfil de expresión de al menos un 84% de los genes medidos por qRT-PCR, está en acuerdo con los datos de RNA-Seq. Por otra parte, un 16% de los genes muestra un perfil de expresión diferencial que no concuerda con lo reportados por RNA-Seq, esto se deba probablemente a las diferencias en la sensibilidad que existe entre RNA-Seq y qRT-PCR (**Figura 3**). Las categorías metabólicas enriquecidas en el transcriptoma de *T. virens* indican los procesos que la célula está priorizando bajo determinada condición y de que tan significativa es la frecuencia con la que aparecen cierto conjunto de genes que codifican para proteínas involucradas en ciertos procesos biológicos. Durante la interacción de *T. virens* con la planta, los genes que codifican para proteínas involucradas en procesos como: el transporte y metabolismo de los carbohidratos se encuentran reprimidos; esta represión

sugiere un limitado o nulo intercambio de nutrientes entre *T. virens* y la planta, al menos durante las primeras horas de interacción (48 y 72 h). Estos datos son consistentes con lo reportado para la interacción de *T. hamatum*-tomate [25]. La sacarosa liberada por la planta regula procesos claves en *Trichoderma* como la percepción y colonización de las raíces y la producción de clamidosporas [27]. En trabajos anteriores se ha reportado que durante la interacción de tres diferentes cepas de *Trichoderma* con plantas de tomate, se da el enriquecimiento e inducción de genes cuyos productos participan en el metabolismo de los carbohidratos y procesos de transporte [20, 26]. No obstante, debe tenerse en cuenta que las condiciones empleadas en esos estudios (tiempos de cocultivo, planta hospedera y especie de *Trichoderma*), han sido diferentes. Sin embargo, el comportamiento de *T. virens* no se aleja mucho de lo observado en otras especies, ya que a las 96 hpi la represión en los genes que codifican para proteínas que participan en el metabolismo y transporte de los carbohidratos deja de ocurrir, enfatizando la importancia de estos procesos en el apoyo nutricional del hongo **(Figura 2b y 3)**. Durante la colonización de la raíz de la planta, *Trichoderma* secreta proteínas que degradan homo y heteropolisacáridos de los tejidos vegetales. Las GH_s son enzimas que se secretan y que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos para liberar azúcares menos estructurados que pueden ser utilizados con mayor facilidad por los organismos [28]. Sin embargo, a las 48 hpi las GH_s (Glucósido Hidrolasas) de las familias 2, 3, 5, 8, 11, 12, 13, 18, 30, 31, 47, 54, 55, 61, 64, 71, 72, 74, 75, 76 y 79, al igual que los procesos biológicos de organización de vacuolas y lisosomas, están reprimidos. La represión en componentes del sistema de secreción (vacuolas y lisosomas) y en enzimas que requieren ser secretadas (GH_s) sugiere que la modulación de estos genes es importante al menos en las primeras 48 h de interacción con la planta. Algunos trabajos indican que el hongo micorrízico *Glomus intraradices* emplea un mínimo conjunto de genes involucrados en la degradación de la pared celular, con la finalidad de evitar la liberación de fragmentos de polisacáridos y evadir la detección del sistema inmune

de la planta [29]. Por otro lado, la inducción de genes englobados en la categoría de transporte de metales a las 48 y 96 hpi, sugiere que los metales juegan un papel trascendental en *T. virens* durante la interacción con la planta. Los metales de transición están involucrados en diversos procesos biológicos cruciales y son necesarios para la supervivencia de todos los organismos vivos. La importancia de los metales de transición radica principalmente en que son incorporados a metaloproteínas, a proteínas de almacenamiento y a factores de transcripción [30]. Los metales no solo se requieren para un óptimo crecimiento y desarrollo del organismo, sino que además se requieren para la virulencia del patógeno. El gen *clap1* de *Colletrichum lindemuthianum* codifica para una ATPasa que transporta Cu y es esencial para la infección en la planta [31]. El basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* emplea al Cu y al Mn en el proceso de degradación de lignina. El Manganeseo participa en la reacción de la peroxidasa dependiente-Mn y el cobre sirve como cofactor en el centro catalítico de la lacasa [32]. Durante la interacción con la planta, *T. virens* indujo genes que codifican para putativos transportadores de metales como el CTR (Copper Uptake Transporters, por sus siglas en inglés) que transporta Cu y a MIRB un gen que codifica para un transportador de sideróforos. Al igual que *P. chrysosporium*, *T. virens* indujo genes que codifican para putativas oxidasas multicobre y peroxidadas dependiente de Mn que participan en la degradación de la lignina. Las similitudes entre *P. chrysosporium* y *T. virens* durante el proceso de degradación del tejido vegetal, apuntan a que un mecanismo similar pudiera estar operando en ambos hongos.

CONCLUSIONES

El transcriptoma de *T. virens* es reprogramado a las 48, 72 y 96 hpi en respuesta a plantas de *A. thaliana*.

La modulación de los procesos biológicos en *T. virens* como el transporte de metales a las 48 y 96 hpi, el metabolismo y transporte de carbohidratos a las 48 y 72 hpi, y la organización de lisosomas y vacuolas a las 48 hpi, es relevante durante la interacción con la planta.

Basados en los resultados del transcriptoma y su validación por qRT-PCR (86% de exactitud), podemos concluir que SOLiD es una plataforma adecuada para el estudio transcriptómico de las interacciones microorganismo-planta, sin embargo existen otras plataformas como Illumina Mi-Seq o Hi-Seq que proporcionan una mejor calidad en las secuencias y por lo tanto una mejor reproducibilidad al momento de validar los datos de la secuenciación masiva por qRT-PCR.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, and I. S. Druzhinina, "Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity.," *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, vol. 9, no. 10, pp. 753–63, Oct. 2008.
- [2] I. S. Druzhinina, V. Seidl-Seiboth, A. Herrera-Estrella, B. a Horwitz, C. M. Kenerley, E. Monte, P. K. Mukherjee, S. Zeilinger, I. V Grigoriev, and C. P. Kubicek, "Trichoderma: the genomics of opportunistic success.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 10, pp. 749–59, Oct. 2011.
- [3] R. Hermosa, A. Viterbo, I. Chet, and E. Monte, "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes.," *Microbiology*, vol. 158, pp. 17–25, Jan. 2012.
- [4] A. D. A. Viterbo and I. Chet, "TasHyd1 , a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* , is involved in plant root colonization," vol. 7, pp. 249–258, 2006.
- [5] I. Samolski, A. M. Rincón, L. M. Pinzón, A. Viterbo, and E. Monte, "The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization.," *Microbiology*, vol. 158, no. Pt 1, pp. 129–38, Jan. 2012.
- [6] Y. Brotman, E. Briff, A. Viterbo, and I. Chet, "Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization.," *Plant Physiol.*, vol. 147, pp. 22–32, Jun. 2008.
- [7] E. Morán-Diez, R. Hermosa, P. Ambrosino, R. E. Cardoza, S. Gutiérrez, M. Lorito, and E. Monte, "The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the trichoderma *harzianum*-plant beneficial interaction.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 22, no. 8, pp. 1021–31, Aug. 2009.
- [8] M. Ruocco, S. Lanzuise, F. Vinale, R. Marra, D. Turrà, S. L. Woo, and M. Lorito, "Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi.," *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 22, no. 3, pp. 291–301, Mar. 2009.

- [9] V. Gravel, H. Antoun, and R. J. Tweddell, "Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA)," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 39, no. 8, pp. 1968–1977, Aug. 2007.
- [10] A. J. Mackenzie and T. W. Starman, "Enhanced Root and Shoot Growth of Chrysanthemum Cuttings Propagated with the Fungus *Trichoderma harzianum*," vol. 30, no. 3, pp. 496–498, 1995.
- [11] P. Hohmann, E. E. Jones, R. a Hill, and A. Stewart, "Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings.," *Fungal Biol.*, vol. 115, no. 8, pp. 759–67, Aug. 2011.
- [12] G. E. Harman, "Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp .," *Phytopatology*, no. February 2006, 2006.
- [13] A. Sofo, A. Scopa, M. Manfra, M. Nisco, G. Tenore, J. Troisi, R. Di Fiori, and E. Novellino, "*Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* x *P. canescens*)," *Plant Growth Regul.*, vol. 65, no. 2, pp. 421–425, Jul. 2011.
- [14] M. Shores, G. E. Harman, and F. Mastouri, "Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents.," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 48, pp. 21–43, Jan. 2010.
- [15] J. a. Ryals, U. H. Neuenschwander, M. G. Willits, A. Molina, H. Y. Steiner, and M. D. Hunt, "Systemic Acquired Resistance.," *The Plant Cell*, vol. 8, pp. 1809–1819, Oct. 1996.
- [16] C. M. J. Pieterse, J. Ton, and L. C. Van Loon, "Cross-talk between plant defence signalling pathways : boost or burden ?," pp. 1–8, 2000.
- [17] C. M. J. Pieterse, A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, and S. C. M. Van Wees, "Networking by small-molecule hormones in plant immunity.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 308–16, May 2009.
- [18] M. B. Rubio, S. Domínguez, E. Monte, and R. Hermosa, "Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using

high-density oligonucleotide microarrays.,” *Microbiology*, vol. 158, pp. 119–28, Jan. 2012.

- [19] M. R. Chacón, O. Rodríguez-galán, T. Benítez, S. Sousa, M. Rey, A. Llobell, and J. Delgado-jarana, “Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*,” *Int. Microbiol.*, vol. 10, pp. 19–27, 2007.
- [20] S. Djonović, M. J. Pozo, L. J. Dangott, C. R. Howell, and C. M. Kenerley, “Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance.,” *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, vol. 19, pp. 838–53, Aug. 2006.
- [21] J.-H. Yu, Z. Hamari, K.-H. Han, J.-A. Seo, Y. Reyes-Domínguez, and C. Scazzocchio, “Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi.,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 41, no. 11, pp. 973–81, Nov. 2004.
- [22] S. Zhao, W.-P. Fung-Leung, A. Bittner, K. Ngo, and X. Liu, “Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells.,” *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e78644, Jan. 2014.
- [23] B. a Bailey, H. Bae, M. D. Strem, D. P. Roberts, S. E. Thomas, J. Crozier, G. J. Samuels, I.-Y. Choi, and K. a Holmes, “Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species.,” *Planta*, vol. 224, no. 6, pp. 1449–64, Nov. 2006.
- [24] I. Samolski, A. de Luis, J. A. Vizcaíno, E. Monte, and M. B. Suárez, “Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray.,” *BMC Microbiol.*, vol. 9, p. 217, Jan. 2009.
- [25] M. B. Rubio, S. Domínguez, E. Monte, and R. Hermosa, “Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using high-density oligonucleotide microarrays.,” *Microbiology*, vol. 158, no. Pt 1, pp. 119–28, Jan. 2012.
- [26] C. P. Kubicek, A. Herrera-Estrella, V. Seidl-Seiboth, D. a Martinez, I. S. Druzhinina, M. Thon, S. Zeilinger, S. Casas-Flores, B. a Horwitz, P. K.

Mukherjee, M. Mukherjee, L. Kredics, L. D. Alcaraz, A. Aerts, Z. Antal, L. Atanasova, M. G. Cervantes-Badillo, J. Challacombe, O. Chertkov, K. McCluskey, F. Couplier, N. Deshpande, H. von Döhren, D. J. Ebbole, E. U. Esquivel-Naranjo, E. Fekete, M. Flipphi, F. Glaser, E. Y. Gómez-Rodríguez, S. Gruber, C. Han, B. Henrissat, R. Hermosa, M. Hernández-Oñate, L. Karaffa, I. Kostı, S. Le Crom, E. Lindquist, S. Lucas, M. Lübeck, P. S. Lübeck, A. Margeot, B. Metz, M. Misra, H. Nevalainen, M. Omann, N. Packer, G. Perrone, E. E. Uresti-Rivera, A. Salamov, M. Schmoll, B. Seiboth, H. Shapiro, S. Sukno, J. A. Tamayo-Ramos, D. Tisch, A. Wiest, H. H. Wilkinson, M. Zhang, P. M. Coutinho, C. M. Kenerley, E. Monte, S. E. Baker, and I. V Grigoriev, "Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*.,” *Genome Biol.*, vol. 12, no. 4, p. R40, Jan. 2011.

- [27] W. a Vargas, J. C. Mandawe, and C. M. Kenerley, "Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants.,” *Plant Physiol.*, vol. 151, no. 2, pp. 792–808, Oct. 2009.
- [28] B. Henrissat and G. J. Davies, "Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics.,” *Plant Physiol.*, vol. 124, no. 4, pp. 1515–9, Dec. 2000.
- [29] E. Tisserant, a Kohler, P. Dozolme-Seddas, R. Balestrini, K. Benabdellah, a Colard, D. Croll, C. Da Silva, S. K. Gomez, R. Koul, N. Ferrol, V. Fiorilli, D. Formey, P. Franken, N. Helber, M. Hijri, L. Lanfranco, E. Lindquist, Y. Liu, M. Malbreil, E. Morin, J. Poulain, H. Shapiro, D. van Tuinen, a Waschke, C. Azcón-Aguilar, G. Bécıard, P. Bonfante, M. J. Harrison, H. Küster, P. Lammers, U. Paszkowski, N. Requena, S. a Rensing, C. Roux, I. R. Sanders, Y. Shachar-Hill, G. Tuskan, J. P. W. Young, V. Gianinazzi-Pearson, and F. Martin, "The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont.,” *New Phytol.*, vol. 193, no. 3, pp. 755–69, Feb. 2012.
- [30] M. I. Hood and E. P. Skaar, "Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 8, pp. 525–37, Aug. 2012.
- [31] D. Parisot, M. Dufresne, C. Veneault, R. Laugé, and T. Langin, "clap1, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of

infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*,” *Mol. Genet. Genomics*, vol. 268, no. 2, pp. 139–51, Oct. 2002.

- [32] P. Baldrian, “Interactions of heavy metals with white-rot fungi,” vol. 32, no. 2003, pp. 78–91, 2002.
- [33] J. M. Baek and C. M. Kenerley, “The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system.,” *Fungal Genet. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 34–44, Feb. 1998.
- [34] F. Murashige, T. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture,” *Physiol. Plant.*, vol. 15, pp. 473–497, 1962.
- [35] H. Li and R. Durbin, “Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 14, pp. 1754–60, Jul. 2009.
- [36] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, and R. Durbin, “The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078–9, Aug. 2009.
- [37] M. D. Robinson, D. J. McCarthy, and G. K. Smyth, “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 1, pp. 139–40, Jan. 2010.
- [38] S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, T. D. Williams, S. H. Nagaraj, M. J. Nueda, M. Robles, M. Talón, J. Dopazo, and A. Conesa, “High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 10, pp. 3420–35, Jun. 2008.
- [39] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–8, Dec. 2001.
- [40] M. G. Cervantes-Badillo, T. Muñoz-Centeno, E. E. Uresti-Rivera, G. R. Argüello-Astorga, and S. Casas-Flores, “The *Trichoderma atroviride* photolyase-encoding gene is transcriptionally regulated by non-canonical light response elements.,” *FEBS J.*, vol. 280, no. 15, pp. 3697–708, Aug. 2013.

- [41] U. Raeder and P. Broda, "Rapid preparation of DNA from filamentous fungi," *Lett. Appl. Microbiology*, vol. 1, pp. 17–20, 1985.

MÉTODOS

Materiales biológicos y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y la cepa silvestre del hongo filamentoso *Trichoderma virens* TvG29-8 [33]. El hongo *T. virens*, se creció de rutina en cajas con medio PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™) a 28 °C. La sincronización de las semillas se llevó a cabo durante 2 días a 4°C. Las semillas se esterilizaron colocándolas en una solución de etanol al 70% por 1 minuto, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 1 minuto. Finalmente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas en cajas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) [34] a una concentración 1X y se incubaron en una cámara de crecimiento, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura de 22 °C por 24 h. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a cajas de Petri con medio MS 0.2X cubiertas con un papel celofán estéril, y se incubaron por 15 días en las condiciones que se describieron anteriormente. Las plantas se inocularon en la punta de la raíz con fragmentos de micelio activo de *T. virens* Gv29-8, el cual se creció previamente en cajas de Petri con medio PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™) por 5 días a 28 °C. En paralelo con los cocultivos *T. virens-Arabidopsis*, el hongo fue inoculado en medio MS, el cual fue utilizado como control de la interacción. El micelio del hongo se recolectó a las 48, 72 y 96 horas de co-cultivo con la planta, se congeló con nitrógeno líquido, se molió, y se almacenó a -80°C hasta la extracción del RNA total.

Construcción y validación de las genotecas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa (qRT-PCR de sus siglas en inglés)

El RNA total de *T. virens* se extrajo utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El DNA contaminante de las muestras de RNA fue eliminado con la enzima TURBO DNase (Life Technologies), como se describe en el manual del vendedor. La transcripción reversa se llevó a cabo con la enzima SuperScript II, siguiendo las especificaciones del fabricante. El cDNA (DNA complementario) fue cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 Thermo Scientific a las densidades ópticas (OD) de 260 y 280 nm (nanómetros). Las genotecas se validaron por qRT-PCR tomando como marcador el nivel de expresión del gen *sm-1*, el cual se induce en el hongo en presencia de la planta [20]. El gen del factor de elongación de la traducción (*tef-1*) de *T. virens* fue empleado como gen de referencia para la normalización de los genes medidos, utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (ver más adelante). Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el software Primer 3 (Applied Biosystems) y se sintetizaron por la compañía IDT (Integrated DNA Technologies) (**Figura suplementaria 1**). Las genotecas para RNA-seq de 3 réplicas biológicas por cada tratamiento (48, 72 y 96 hpi), fueron sometidas a secuenciación en la plataforma SOLiD (“Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection”) de Applied Biosystems.

Análisis del transcriptoma

Los archivos *.csfasta (archivo de código de colores que contienen todos los reads secuenciados) y *.qual files (archivo de valor de calidad para .csfasta que contiene los reads secuenciados) provenientes de la plataforma SOLiD, se convirtieron en archivos *.fastq. Los archivos *.fastq fueron analizados con el programa FASTQC el cual evalúa la calidad de las genotecas tomando en cuenta los siguientes parámetros: calidad de las secuencias por base, scores de calidad por secuencia, contenido de secuencias por base, contenido de GC por base, contenido de GC por secuencia, distribución de la longitud de la secuencia, nivel de duplicación de

secuencias y contenido de Kmer. (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las secuencias fueron mapeadas contra los genes predichos de *T. virens* con la ayuda del software Burrows-Wheeler Aligner (BWA) [35], utilizando los parámetros de BWA dadas por defecto y permitiéndose un 4% de mismatches, los alineamientos de las secuencias se almacenaron en el formato Sequence Alignment/Map (SAM) [36]. Las tablas con el número de reads por gen fueron generadas y utilizadas para el análisis de expresión diferencial usando el programa edgeR [37] con un Log fold change ± 1 (LogFC) y un FDR ≤ 0.05 . Los datos de gene ontology (GO) del genoma de *T. virens* y los genes expresados diferencialmente se anotaron en Blas2GO [38] y se compararon con la finalidad de obtener el análisis de enriquecimiento de las categorías funcionales según el proceso biológico, el análisis tomo en cuenta un FDR de 0.05* y de 0.01**, respectivamente.

Validación del transcriptoma de *T. virens* por qRT-PCR

La validación del transcriptoma de *T. virens* se realizó con una de las réplicas biológicas. El cDNA fue sintetizado a partir de 5 μ g de RNA total como se describió en la sección anterior. Los oligonucleótidos se diseñaron empleando el software Primer 3 (Applied Biosystems) (**Tabla suplementaria 2**). La reacción de qRT-PCR se realizó empleando el kit Fast Syber Green Master Mix (Applied Biosystem), con 100 ng de cDNA de cada muestra. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el equipo Abiprism 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystem). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 20 s a 95° C, 40 ciclos de amplificación (3s a 95°C, 30 s a 60°C) y una “Melt Curve” (15 s a 95°C, 1 min 60°C). El gen *tef-1* fue empleado como gen de referencia para la normalización de los genes medidos, mediante el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [39].

Generación de las construcciones genéticas para el remplazo génico de los genes *Tvset*, *Tvgtpase*, *Tvsnf2* y *Tvpkc*

Las construcciones para el remplazo de los genes *Tvset*, *Tvgtpase*, *Tvsnf2* y *Tvpkc* por el casete de higromicina, se realizó en base a la técnica de “Double Joint-PCR” o PCR de doble unión. En una primera ronda de PCR se utilizó a la enzima Herculase II Fusion DNA Polymerase de alta fidelidad (Agilent Technologies), para amplificar los módulos 5' y 3' de cada gen con los oligonucleótidos específicos Forward y Reverse-*Fusión* y *Fusión-Forward* y Reverse respectivamente, utilizando DNA genómico de *T. virens* como molde. Los oligonucleótidos de fusión contienen una región de homología de 31 a 28 pb en sus extremos 5' pertenecientes al marcador de selección que confiere resistencia a higromicina (*hph*) (**Tabla suplementaria 3**) [21]. El casete de *hph* fue amplificado en su totalidad con los oligonucleótidos DJhph-F y DJhph-R (**Tabla suplementaria 3**), en presencia de la enzima Herculase II Fusion DNA Polymerase, utilizando como molde al plásmido 1519-LacZ [40]. Los amplicones se purificaron por columna con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. En la segunda ronda de PCR, se mezclaron a los módulos 5' y 3' y *hph* en una relación 1:1:3 y se agregaron los primers 5'-Forward y 3'-Reverse (**Tabla suplementaria 3**). Las construcciones resultantes TvSET, TvGTPase, TvPKc y TvSNF2 se purificaron por columna como se describió anteriormente, y se verificó por medio de digestión con las enzimas de restricción *Sph* I para TvSET, TvGTPase y TvPKc, mientras que TvSNF2 fue verificada con la enzima *Pst* I (ambas enzimas de New England BioLabs). La extracción del ADN total de micelio de *T. virens* se realizó según el protocolo descrito por Raeder y Broda [41].

Transformación de *T. virens* por el método de protoplastos y selección de transformantes estables

Los productos de la PCR de doble fusión TvSET y TvSNF2 fueron utilizados para transformar protoplastos de *T. virens*. La obtención de protoplastos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Baek y Kenerley[33], con ligeras modificaciones. Se inocularon conidias de *T. virens* en 100 ml de PDB (Caldo Papa dextrosa, DIFCOTM 24g/L) y se incubó por 3 días a 28°C con agitación a 250 rpm. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y 0.5 gramos (peso húmedo) fueron resuspendidos en la solución "Osmoticum" (CaCl₂ 50 mM, manitol 0.5 M y MES pH 5.5, 50 mM), con 200 mg/ml de Enzimas líticas de *T. harzianum* (LET) (Sigma). La mezcla se incubó a 28°C con agitación suave por 1 día. Los protoplastos se filtraron a través de una malla de nylon estéril con poros de 100 µm, y se centrifugaron 2000 rpm. Los protoplástos se lavaron dos veces con solución osmoticum y se resuspendieron en la misma solución. Se tomaron 10 µl de la suspensión de protoplástos para observar su integridad en el microscopio. A 250 µl de protoplastos se les agregó 1 µg de DNA transformante. La mezcla se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se agregaron 250 µl de PEG-4000 al 60% en Osmoticum y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. De la mezcla obtenida se hicieron diferentes diluciones y se mezclaron con 7 ml de medio de selección (200 µg de higromicina/ml) con agar suave y se vaciaron a cajas de Petri con medio selectivo con 200 µg de higromicina/ml. Las cajas se incubaron a 25°C por 72 h y se aislaron las transformantes obtenidas. Las distintas transformantes fueron sometidas a tres rondas de pases monoespóricos para obtener mutantes estables. Las conidias de las distintas transformantes fueron recolectadas de las cajas de Petri con 1 ml de agua bidestilada estéril y con ayuda de un vidrio doblado (espátula). Las conidias fueron contadas al microscopio en una cámara de Neubauer, para posteriormente hacer diluciones seriadas y sembrarlas en PDA con higromicina a una concentración de 200 µg/ml, a una densidad de 50 conidias por caja. De las colonias que emergieron, se tomaron dos al azar para seguir con las rondas de pases monoespóricos. Después de las tres

rondas de pases monoespóricos, se extrajo ADN de las distintas transformantes como se describió antes, y se realizó una PCR punto final para verificar el remplazo génico. Para verificar el remplazo génico se diseñó un oligonucleótido reverso sobre el casete *hph* y uno a 384 y 269 pb río arriba de la región del extremo 5' que se tomó para el remplazo génico para TvSET y TvSNF2, respectivamente (**Tabla suplementaria 4**). Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo inicial de 5 m a 95° C, 30 ciclos de amplificación (30s a 95°C, 30 s a 55°C, 2.30 m a 72°C) y un ciclo final de 5 m a 72° C.

Contribución de los autores:

Magnolia Estrada-Rivera realizó los experimentos, escribió el artículo y analizó los resultados. Miguel Ángel Hernández-Oñate realizó el análisis bioinformático. Sergio Casas-Flores diseñó los experimentos y escribió el artículo.

Agradecimientos

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 Dr. J. Sergio Casas Flores.

La investigación descrita en esta tesis fue financiada con recursos otorgados al Dr. J. Sergio Casas Flores por el proyecto SEP-CONACYT-2010-103733 y al Dr. Ramón Gerardo Guevara González de la Universidad Autónoma de Querétaro por el proyecto FORDECYT 2012-02-193512 en colaboración con el IPICYT, siendo el responsable técnico por parte del IPICYT el Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro: **279183**.

Tabla 1. Expresión relativa de los 19 genes regulados diferencialmente a las 48, 72 y 96 hpi (horas post-inoculación), en los análisis de RNA-Seq.

Nombre	Fold change ± 2		
	48 hpi	72 hpi	96 hpi
1. Glutación S-transferasa versión larga-Id. 34822	+7.56 ^a	+10.81 ^a	+5.30 ^a
2. Glutamina amidotransferasa 1-Id. 46295	+3.78 ^a	+45.74 ^a	+7.74 ^a
3. Glucósido hidrolasa de la familia 7-Id. 90504	-3125 ^b	-714.28 ^b	-25 ^b
4. Reductasa tipo ferredoxina-Id. 57247	-5 ^b	+4.96 ^a	^c
5. 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa-Id. 46955	+18.56 ^a	+4.40 ^a	^c
6. Proteína de choque térmico 30-Id. 215292	-20 ^b	^c	+4.50 ^a
7. Hidrofobina-Id. 143417	^c	+7 ^a	+2.94 ^a
8. Glutamina amidotransferasa-Id. 69268	^c	+41.45 ^a	+11.06 ^a
9. Transportador dicarboxilato/resistencia a telurita-Id.59885	^c	+11.32 ^a	+18.27
10. Metil transferasa de lisinas-Id. 77874	+7.85 ^a	^c	^c
11. Remodelador de la Cromatina-Id.113458	+4.45 ^a	^c	^c
12. Guanosina trifosfatasa-Id. 70852	+20.96 ^a	^c	^c
13. Glucosil transferasa de la familia 4-Id. 83336	-50 ^b	^c	^c
14. Glucósido hidrolasa de la familia 18-Id. 194859	-100 ^b	^c	^c
15. Cinasa-Id. 58043	-5.12 ^b	^c	^c
16. Glutación S-transferasa versión pequeña-.Id. 227149	^c	+117.78 ^a	^c
17. Reductasa de quelatos de fierro-Id. 69153	^c	^c	+11.36 ^a
18. Proteína de resistencia a 7-amicolesterol-Id.59885	^c	^c	+8.59 ^a
19. Acuaporina-Id.6760	^c	^c	-4.16 ^b

^a El signo (+) denota inducción transcripcional con respecto al control

^b El signo (-) denota represión transcripcional con respecto al control

^c Sin cambio significativo con respecto al control

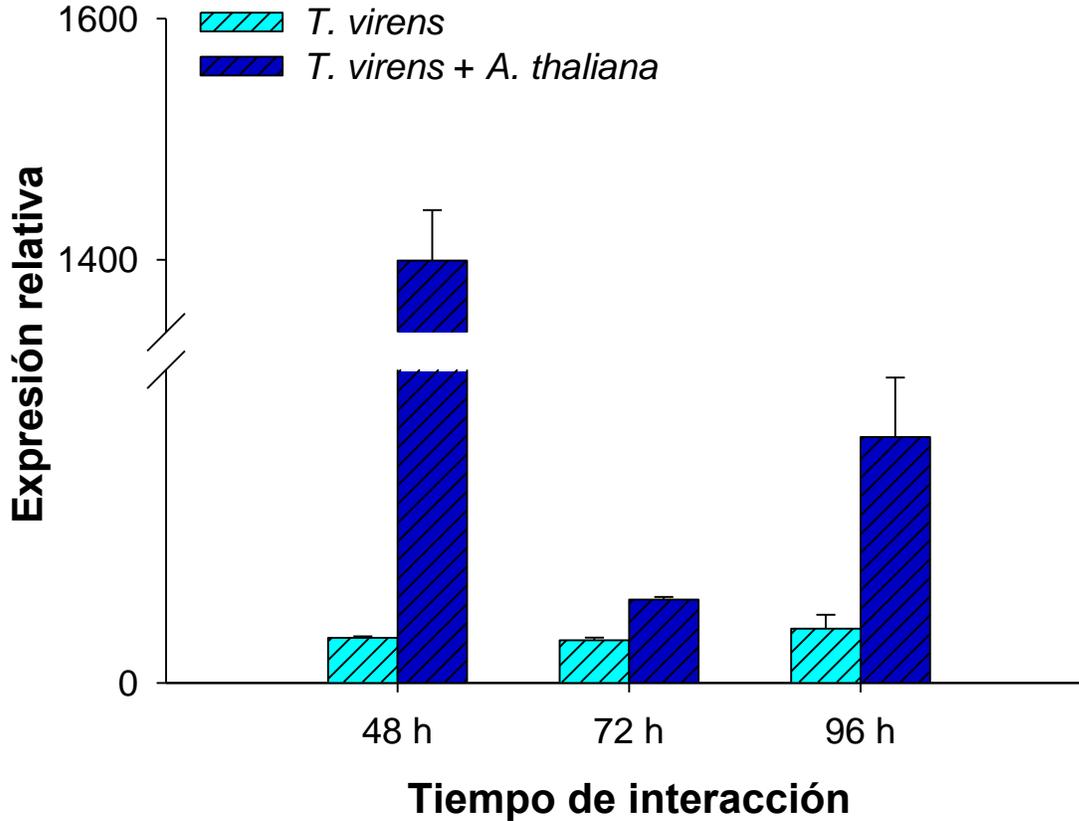
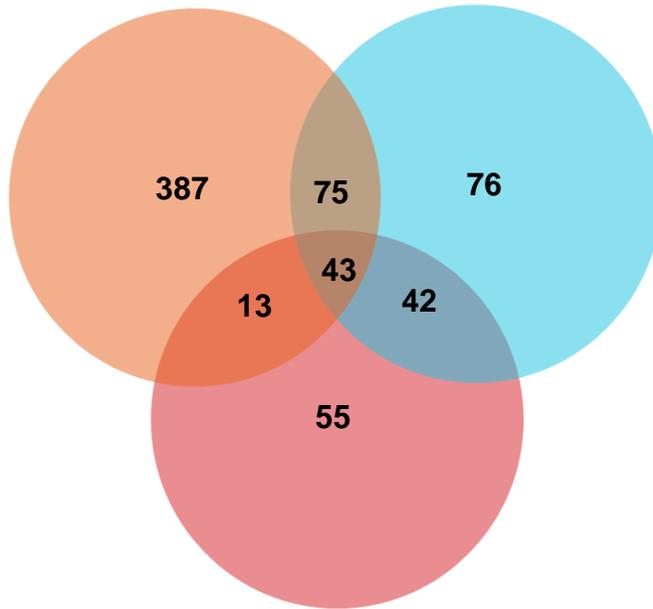
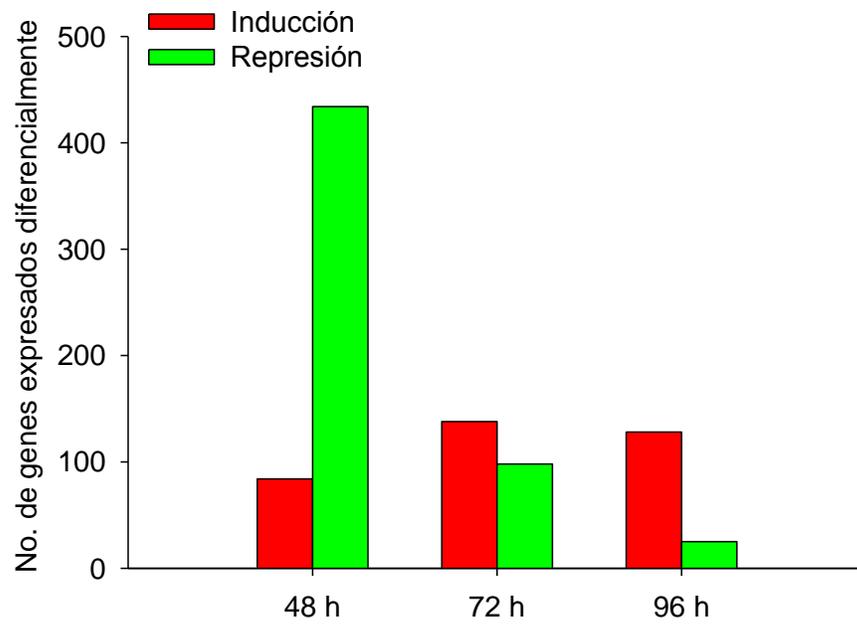


Figura 1. Niveles de expresión del gen *sm-1* de *T. virens* Tv28.9 en presencia y ausencia de *A. thaliana* mediante qRT-PCR. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 15 días de edad fueron inoculadas con discos miceliales de la cepa silvestre de *T. virens*. Como control se usaron los hongos crecidos en ausencia de la planta. El micelio del hongo se colectó a las 48, 72 y 96 horas post-inoculación, se extrajo el RNA total, se generó el cDNA, y se determinaron los niveles de expresión por qRT-PCR. Las barras azules representan a la cepa WT de *T. virens* en ausencia de plántulas y las barras verdes al hongo en co-cultivo con *Arabidopsis*. El gen del factor de elongación de la traducción (*tef-1*) fue empleado como gen de referencia para la normalización de los genes medidos, mediante el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [39]. La figura muestra los resultados de una réplica biológica representativa de tres.

A)



B)



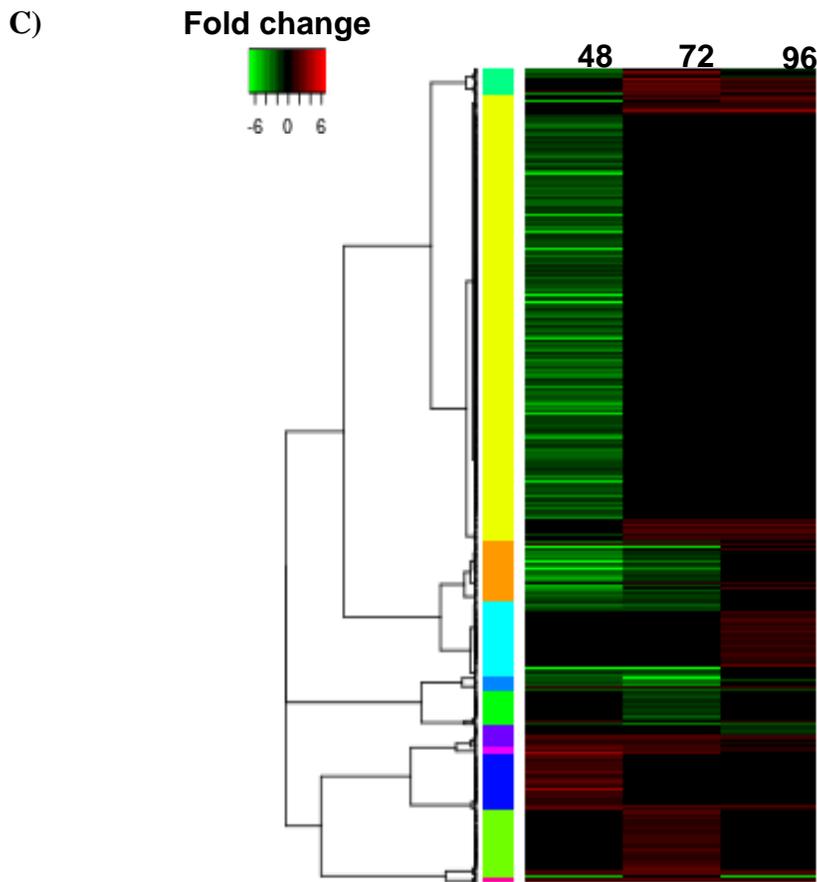


Figura 2. *T. virens* presenta una reprogramación de su transcriptoma en respuesta a la presencia de *A. thaliana*. **A)** Diagrama de Venn que resume la distribución de los 691 genes regulados diferencialmente. En color naranja se representan los genes que se regularon diferencialmente a las 48 hpi (horas post-inoculación), en color azul están los que se regularon diferencialmente a las 72 hpi y en color rosa los genes regulados diferencialmente a las 96 hpi en *T. virens* **B)** Número de genes regulados diferencialmente en *T. virens* a las 48, 72 y 96 h de co-cultivo con *A. thaliana*, con un FC de al menos ± 2 y un FDR de ≤ 0.05 . Los colores rojo y verde representan cambios positivos y negativos en la expresión respectivamente, comparados con la condición control. **C)** Agrupamiento

jerárquico de los genes regulados diferencialmente en *T. virens* a las 48, 72 y 96 h de co-cultivo con plantas de *A. thaliana*, con un FC de al menos ± 2 y un FDR de ≤ 0.05 . Los colores rojo y verde representan cambios positivos y negativos en la expresión respectivamente, comparados con la condición control. La intensidad del color es proporcional a la magnitud de la expresión diferencial. El agrupamiento jerárquico se realizó utilizando el paquete heatmap.2 en R.

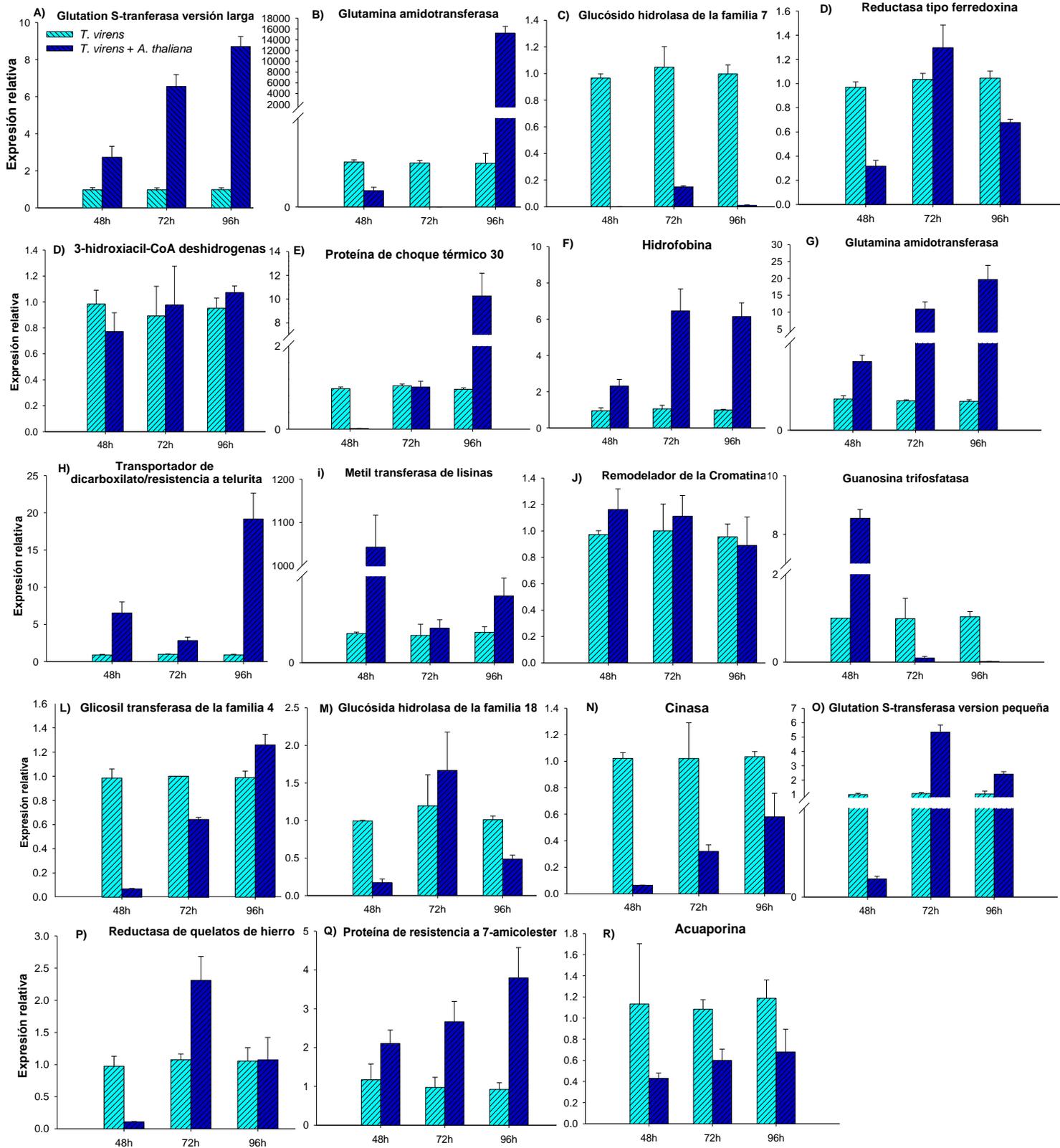


Figura 3. Análisis por qRT-PCR de 19 genes expresados diferencialmente en *T. virens* durante su interacción con *A. thaliana*. Los perfiles de expresión de los genes de *T. virens* a las 48, 72 y 96 h de cocultivo con plántulas de *A. thaliana* se muestran a continuación: **A)** Glutación S-transferasa versión larga-Id. 34822, **B)** Glutamina amidotransferasa-Id. 46295, **C)** Glucósido hidrolasa de la familia 7-Id. 90504, **D)** Reductasa tipo ferredoxina-Id. 57247, **D)** 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa-Id. 46955, **E)** Proteína de choque térmico-Id. 215292, **F)** Hidrofobina-Id. 143417, **G)** Glutamina amidotransferasa-Id. 69268, **H)** Transportador dicarboxilato/resistencia a Telurita-Id.59885, **I)** Metil transferasa de lisinas-Id. 77874, **J)** Remodelador de la Cromatina-Id.113458, **K)** Guanosina trifosfatasa-Id. 70852, **L)** Glucosil transferasa de la familia 4-Id. 83336, **M)** Glucósido hidrolasa de la familia 18-Id. 194859, **N)** Cinasa-Id. 58043, **O)** Glutación S-transferasa versión pequeña, **P)** Reductasa de quelatos de hierro-Id. 69153, **Q)** Proteína de resistencia a 7-amicolesterol-Id.59885, **R)** Acuaporina-Id.6760. Las barras representan los promedios obtenidos de un triplicado técnico con su respectiva desviación estándar. Las barras azules representan a la cepa WT de *T. virens* en ausencia de plántulas y las barras verdes al hongo en co-cultivo con *Arabidopsis*. El gen que codifica para el factor de la elongación de la traducción (*tef-1*) fue empleado para la normalización de los genes analizados, mediante el uso de la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [28].

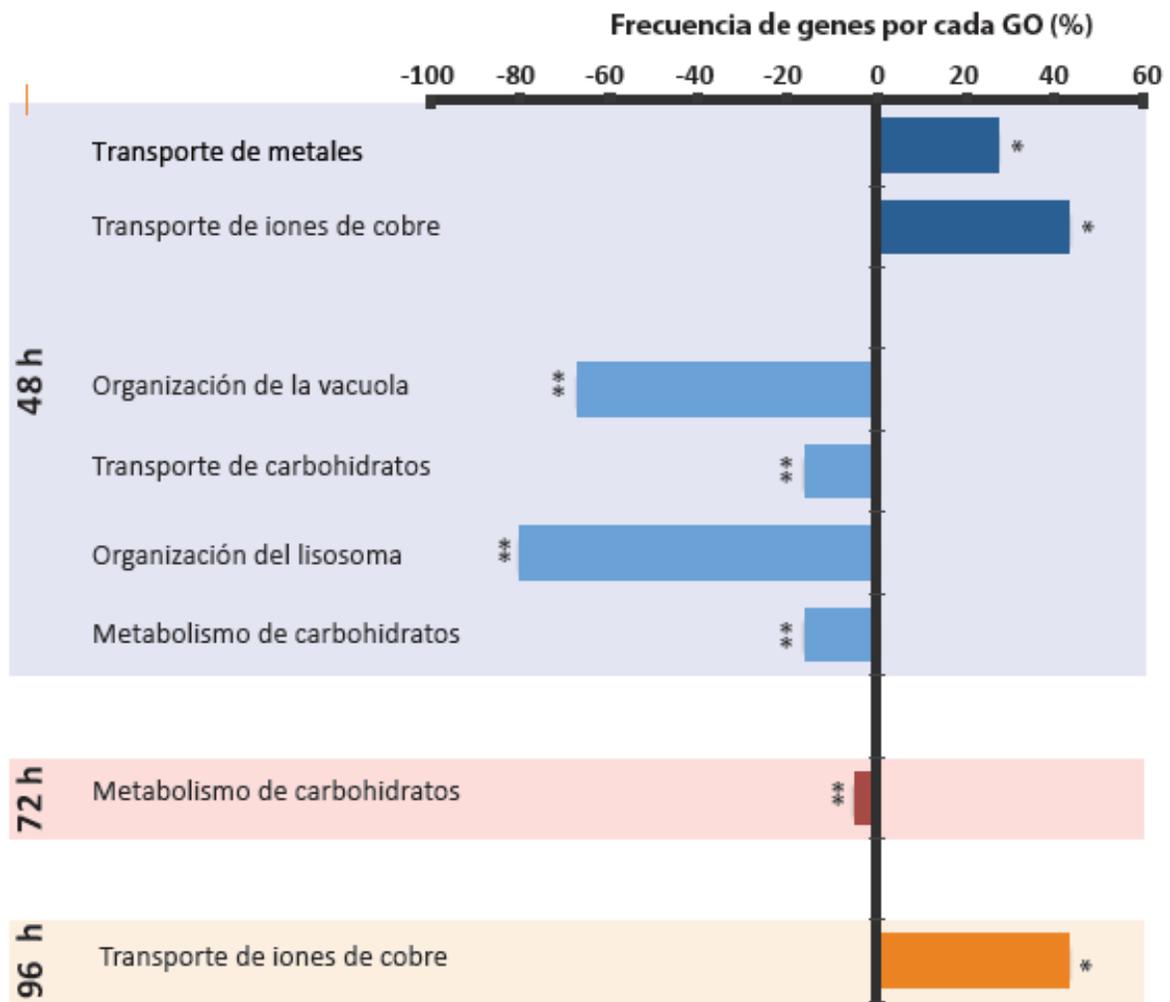
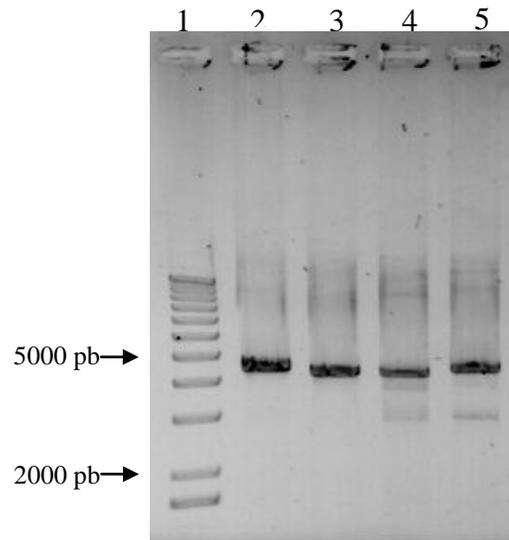
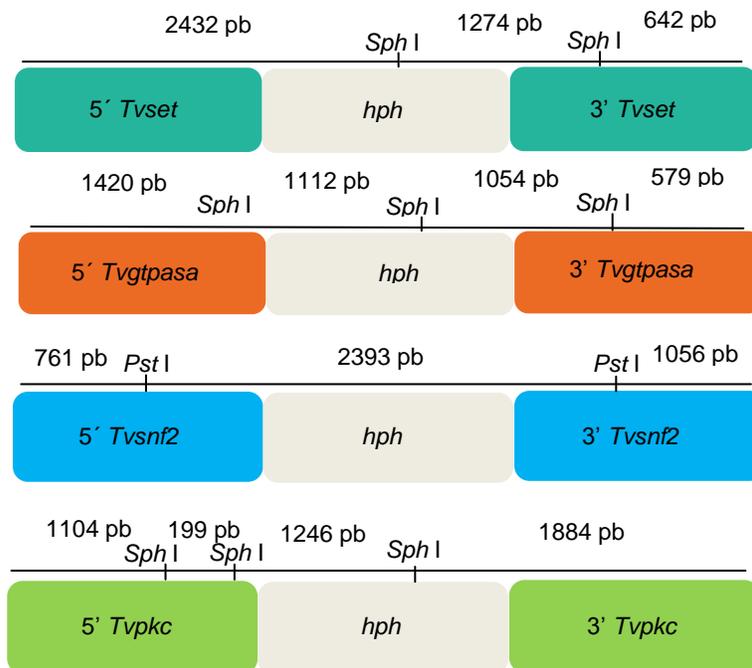


Figura 4. Análisis de enriquecimiento de los principales grupos de GenOntology (GO) de la interacción *T. virens*-*A. thaliana*. Los datos de GO del genoma de *T. virens* y los genes expresados diferencialmente se anotaron en Blas2GO y se compararon con la finalidad de obtener el análisis de enriquecimiento (frecuencia de genes por cada GO) de las categorías funcionales según el proceso biológico, el análisis tomó en cuenta un FDR de 0.05* y de 0.01**, respectivamente. En la imagen las categorías enriquecidas tanto inducidas como reprimidas, están diferenciadas por el eje de las X con valores positivos y negativos.

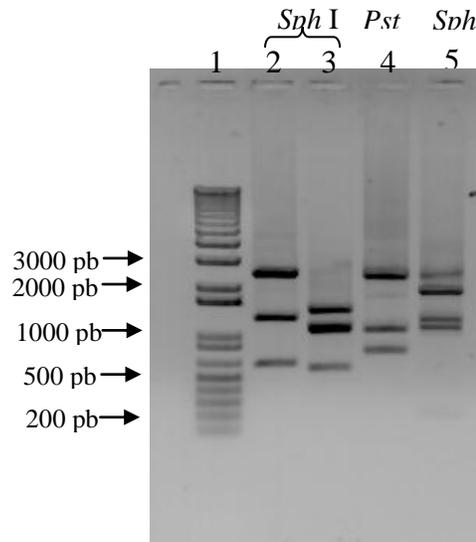
A)



B)



C)



Construcciones genéticas que abarcan las regiones flanqueantes 5' y 3' de TvSET, TvGTPase, TvSNF2 y TvPKc, fusionadas al casete *hph* que confiere resistencia a higromicina y verificación por restricción de las mismas. A) Las construcciones fueron generadas a partir de la fusión de los extremos 5' y 3' con *hph*. Los fragmentos esperados son de 4348 pb para TvSET (carril 2), de 4165 pb para TvGTPasa (carril 3), de 4210 pb para TvSNF2 (carril 4) y de 4433 pb para TvPKc (carril 5). El carril 1 corresponde al MPM (Marcador de Peso Molecular de 1Kb). **B)** Representación gráfica de los sitios de restricción y la enzima utilizada para la verificación de las construcciones genéticas *Tvset*, *Tvgtpasa*, *Tvsnf2* y *Tvpkc*, respectivamente. En el panel de arriba de cada construcción se señala el tamaño de los fragmentos generados tras el corte de la enzima correspondiente. **C)** Los tamaños de los fragmentos de la digestión de las construcciones son: de 2432 pb, 1274 pb, 642 pb para TvSET (carril 2), de 1420 pb, 1112 pb, 1054 pb, 579 pb para TvGTPase (carril 3), de 2393 pb, 1056 pb y 761 pb para TvSNF2 (carril 4) y de 1884 pb, 1246 pb, 1104 pb y 199 pb para TvPKc (carril 5). El carril 1 corresponde al MPM (Marcador de Peso Molecular de 1Kb). En la parte superior de los paneles se indica el nombre de la enzima con la que se realizó la digestión.

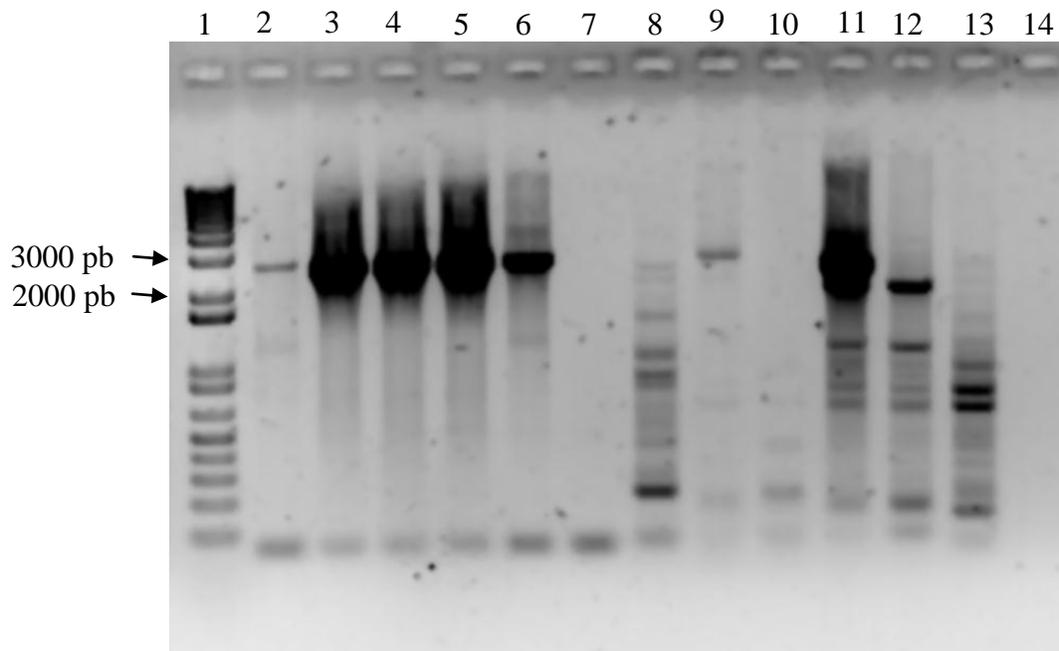


Figura 6. Análisis de PCR punto final para verificar el reemplazo génico en cepas transformantes de Tvset y Tvsnf2. La PCR punto final de las transformantes con un posible reemplazo génico se realizó con un oligonucleótido reverso diseñado sobre el casete *hph* y uno sentido en el 5' río arriba de la región seleccionada para el reemplazo génico. Los fragmentos esperados son de 2564 pb para TvSET (carril 2-5) y de 2417 pb para TvSNF2 (carril 9-10). Los carriles 6 y 11 corresponden a los controles positivos (DNA correspondiente a la primera ronda de pases monoespóricos que arrojaron un resultado positivo). Los carriles 7 y 12 a la cepa WT. El carril 8 y 13, controles negativos. El carril 1 corresponde al MPM (Marcador de Peso Molecular).

Tabla suplementaria 1. Oligonucleótidos para verificar las genotecas de la interacción *T. virens*-*A. thaliana*.

Nombre	Oligonucleótido Forward (5'-3')	Oligonucleótido Reverse (5'-3')
EF-1	CAGGTCGGTGCCGGATAC	TCAGAGAAGCTTGCAGGCAATGT
SM1	CCATCTACGTCTTGGCTGTTGA	GCATCGAGCGCAATGTTG

Tabla suplementaria 2. Oligonucleótidos para la validación del transcriptoma de *T. virens* durante su interacción con *A. thaliana*.

Nombre/Id	Oligonucleótido Forward (5'-3')	Oligonucleótido Reverse (5'-3')
GTPase-70852	TGCCAATGTGGCGAGTATCA	CGTGGCTGGCTAGTTGACACT
SET-77874	GAATGGCGGCCTTGGATT	TCCACTCAGTTCTCGTGACGTT
GT4-83336	AGTTGCACGAGCGAATGTCA	TCCAACCTTCGCACGAAACAC
GH18-194859	TGAACTTTCTGGGCATTGCA	CGCTCCCCCTTCTGATAGC
GST S.V.-227149	GCTCTGCTTGAGGCTGGACTT	GTCACGCTCCCAATTTGGA
NOX-69153	CCCTCGTCTCGCCTCTAGTCT	CGCTGCACACTCGTCAAGA
RTM1-59885	CTGGATGCACTGCCAATGTT	TCGCCAGGGTATTTCCAATG
AQPs-6760	GATGGCGGGAAGCTGGAT	CCCAAAGACGACGCAATGT
GATase1-46295	GGCCGAACCCACTCACTTT	CATGGCGACGGATGAACTC
GST L.V.- 34822	AAGCAATCACCCCGTTGGT	CCAAAACATCGGGAGAATGAA
FNR-57247	CCAGGAGAGCCGCTGCTA	TGGCCGTTTCCGTCGAT
3HCDH_N-46955	CGC CTG GAG CTC ACG AA	TTGTCACCCACTCGTGTTTCA
HSP-215292	GCACGAGTCGGGCTTTGA	CCTTGTTCTCGGGCTTCTTCT
TDT-158830	TTGCCCGTTGCACCTCTAG	AGACTTTTCCCAGCTGCATGA
Hydrophobin-143417	CAAGGCCCCGAGGTTGA	TCCCCAGAGAAGGAATGC
GATase-69268	TCATGGAAGCCGTA AAAACGT	GCCTTTGCCACGGTTGAGT
HSP-215292	GCACGAGTCGGGCTTTGA	CCTTGTTCTCGGGCTTCTTCT
KN-58043	GCCCAAGCCGATAAGAAAGG	ATTATTCCGTATTTGCGCCATT
SNF2-113458	GCCGTGGGATTAGCAGCAT	GGCGAAAGGGCAGAAAGTCT

Tabla suplementaria 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la PCR Double-Joint.

Nombre	Oligonucleótidos (5'-3')
5 SET-F	CTACAAGATATAAGCCCTTATTGATGCG
5 SET-R-Fusión	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCG ATCTATAAAGAGAAGTCTGACGTGAGAGAAT
3 SET-F-Fusión	GCGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG ATTCAACATCTTAACACATGTTTCCTTC
3 SET-R	AACCACAAAGAGAACAAAAGATGAAAAG
5 SNF2-F'	TCTCTCATATCTTTTACTCGGATAGG
5 SNF2-R-Fusión	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATC ATCCCATGAAATGACAACTCCATTTA
3 SNF2-F-Fusión	GCGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG CTAGAGGTTCGTATAACAGTATCATGGC
3 SNF2-R	CTTGAAGAACGCTGGATATAGGGTC
5 Kinase-F	AATGAACACCTTCACGGAATACATTG
5 Kinase-R-Fusión	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATC ATTAGCACATAATATTCGAAATCAGCCT
3 Kinase-F- Fusión	GCGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG AAATAAAATCTGGGTGCTTGGGATTT
3 Kinase-R	TTTTATCGATAGCCACGGTACTAAAG
5 GTPasa-F	AAACGCCAAGTCAAAGCTTCGCCTTT
5 GTPasa-R-fusión	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATC CAAAGACTGATTCTAGTTTGGAGAATAGGAA
3 GTPasa-3-F-fusión	CGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG ACTATCATATGTATTTACTTACATAAATTA
3 GTPasa-3-R	TGTTCTGGCAGTGCAATGAGACAAGAGACG
DJhph-F	GATCGACGTTAACTGATATTGAAGGA
DJhph-R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGC

Las secuencias remarcadas corresponden a las regiones que hibridan con el marcador de selección *hph* (higromicina).

Tabla suplementaria 4. Oligonucleótidos utilizados para verificar el reemplazo génico de las transformantes candidatas TvSET y TvSNF2.

Nombre	Oligonucleótidos (5'-3')
F-SET 5'-HPH	GGGCCATACTGCGCACGAACC
F-SNF2 5'-HPH	TTTTGCCGCTCCCAACGCAGC
Id-Mut R	TTTTGCCGCTCCCAACGCAGC