



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis del papel de la proteína EPL1 de
Trichoderma atroviride en la resistencia a
patógenos en *Arabidopsis thaliana***

Tesis que presenta

Mónica Montserrat Rojas Moreno

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., diciembre de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Análisis del papel de la proteína EPL1 de Trichoderma atroviride en la resistencia a patógenos en Arabidopsis thaliana*” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mónica Montserrat Rojas Moreno** y aprobada el quince de diciembre del dos mil diecisiete 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. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Miembro del Comité Tutorial

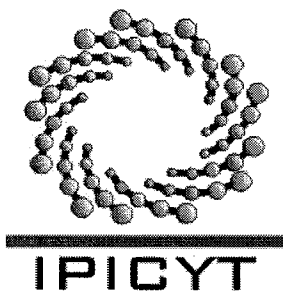
Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 588986) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 177 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 19 días del mes de diciembre del año 2017, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Mónica Montserrat Rojas Moreno

sobre la Tesis intitulada:

Análisis del papel de la proteína EPL1 de Trichoderma atroviride en la resistencia a patógenos en Arabidopsis thaliana

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:20 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 19 días del mes de diciembre de 2017.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



A los seres más importantes de mi vida...

Agradecimientos

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico que me brindó durante la realización de este proyecto. Agradezco, por supuesto también al IPICYT, una institución de alta calidad de la que me siento muy orgullosa de formar parte.

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por los conocimientos invaluable que me ofreció para llevar a cabo esta investigación.

También quiero dar gracias a los demás miembros de mi comité tutorial, el Dr. Ángel Alpuche Solís y el Dr. Samuel Lara González, por el tiempo que le dedicaron y las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final.

A la M.C. Alicia Becerra, por su apoyo técnico en la realización de este trabajo. A la Sra. Sonia por ayudarme con la limpieza y esterilización de mi material. Además a todos los miembros del laboratorio 7 de la División de Biología Molecular del IPICYT, que fueron unos compañeros estupendos con los cuáles compartí momentos divertidos y aprendí mucho de ellos.

Al Dr. Mario Serrano por permitirme realizar una estancia en el programa de Genómica Funcional de Eucariontes, en el CCG de la UNAM, Campus Morelos. Por compartirme sus conocimientos y siempre estar dispuesto a escucharme y discutir resultados. A la Ing. Martha Torres por la confianza que depositó en mí y por el apoyo técnico durante la estancia. También a los miembros del grupo del trabajo del Dr. Serrano, fueron unos excelentes compañeros que me dejan memorias inolvidables de mi estancia. Muchas gracias.

Agradezco a aquellas grandes personas que contribuyeron de alguna manera a mi crecimiento académico y personal dentro del IPICYT, las que me permitieron

ampliar mis conocimientos y siguen trabajando en la formación de científicos mexicanos, a todos los excelentes doctores que son profesores del programa de Biología Molecular y a todos los que permiten que este lugar siga en pie.

Muchas gracias a mis compañeros de generación que hicieron que esta experiencia fuera mucho mejor, vivimos momentos muy buenos y divertidos. He encontrado en ustedes muy buenas personas, y espero que nuestra amistad se mantenga por mucho tiempo. Gracias por estar ahí y soportarme en mi intensidad y enriquecerme de alguna manera. Aunque no lo exprese frecuentemente he llegado a apreciarlos mucho.

Agradezco a mis padres quienes me han dado todo su amor y su apoyo y me han otorgado todas las oportunidades necesarias para concluir mi maestría, y desean verme convertida en una persona de provecho, espero no decepcionarlos. También a mis hermanos por estar ahí y hacer de nuestra familia la mejor familia, por todos los buenos y malos momentos y las alegrías compartidas. Mis seres más queridos en el mundo. Gracias.

A Luis, mi amigo, compañero y más por mucho tiempo. Gracias por estar ahí, apoyarme, escucharme y aguantarme, por dejarme ganar siempre. Por simplemente ser tú y permitirme lograr todo lo que me he propuesto, y estar a mi lado haciéndome compañía.

A todos mis amigos y personas que han impactado mi vida de algún modo, no puedo nombrarlos a todos, pero espero que con estas palabras se sientan identificados, forman una parte importante de mi vida y por eso, también gracias. Sin todos ustedes yo no estaría aquí.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Agradecimientos	vi
Contenido	viii
Lista de figuras	xii
Anexos	xiii
Abreviaturas	xiv
Glosario	xvi
Resumen	xxi
Análisis del papel de la proteína EPL1 de <i>Trichoderma atroviride</i> en la resistencia a patógenos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	xxi
Abstract	xxii
Role of the EPL1 protein from <i>Trichoderma atroviride</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> pathogen resistance	xxii
CAPÍTULO 1	1
La sobreexpresión de TaEPL1, un miembro de la familia de las cerato-plataninas de <i>Trichoderma atroviride</i> confiere resistencia a patógenos en plantas de <i>Arabidopsis</i>	1
1.1 RESUMEN	2
1.2 ABSTRACT	3
1.3 INTRODUCCIÓN	4
Ilustración 1. Modelo zig-zag que ilustra el resultado cuantitativo del sistema inmune de la planta. (Tomada de Jones & Dangl 2006)	10
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	11
1.4.1 Generación de las líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sobreexpresoras del gen TaEPL1 (35S::TaEPL1)	11
1.4.2 Crecimiento de plantas y microorganismos	11
1.4.3 Interacción planta- <i>Pseudomonas syringae</i>	12

1.4.4 Interacción planta- <i>Botrytis cinerea</i>	13
1.4.5 Tinción con azul de tripano	14
1.4.6 Detección de H ₂ O ₂ mediante microscopia de fluorescencia	14
1.4.7 Cuantificación de H ₂ O ₂ mediante KI	15
1.4.8 Cuantificación de la expresión de genes utilizando RT-PCR tiempo real	15
1.5 RESULTADOS	18
1.5.1 Generación de las líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sobreexpresoras del gen EPL1 (35S::TaEPL1)	18
1.5.2 Las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 son más resistentes a la infección de la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomate</i> DC3000	18
1.5.3 La línea transgénica EPL1-3 es menos susceptible a la infección del hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinerea</i> B05.10	19
1.5.4 Las plantas que expresan el gen EPL1 tienen niveles endógenos de H ₂ O ₂ elevados	20
1.5.5 Las plantas transgénicas 35S::TaEPL1 acumulan transcritos de genes relacionados a defensa, antes de ser retadas con patógenos.	21
Figura 1. 1 Expresión relativa de los niveles de expresión de TaEPL1 en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Figura 1. 2 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra bacteria hemibiotróficas	25
Figura 1. 3 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra hongos necrotróficos	26
Figura 1. 4 La línea EPL1-3 presenta un retraso en la infección con <i>Botrytis</i> B05.10	27
Figura 1. 5 Las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 tienen niveles elevados de H ₂ O ₂	28
Figura 1. 6 Expresión relativa de los niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> 35S::TaEPL1	29
Figura 1. 7 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con <i>Pst</i> DC3000	30
Figura 1. 8 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con <i>Botrytis cinerea</i>	31
1.6 DISCUSIÓN	32

1.6.1 EPL1 confiere resistencia a enfermedades en las plantas de Arabidopsis que sobreexpresan el elicitor contra varios tipos de patógenos	32
1.6.2 La resistencia en las plantas transgénicas 35S::TaEPL1 es directamente proporcional a la expresión del gen EPL1	33
1.6.3 La expresión de TaEPL1 puede inducir la expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de Arabidopsis.	33
1.6.4 La sobreexpresión de EPL1 confiere un estado de priming a las líneas transgénicas.	34
1.7 CONCLUSIÓN	36
CAPÍTULO 2	37
Localización celular y formación del dímero del elicitor TaEPL1 de <i>Trichoderma atroviride</i> en células vegetales.	37
2.1 RESUMEN	38
2.2 ABSTRACT	39
2.3 INTRODUCCIÓN	40
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.4.1 Material vegetal	43
2.4.2 Diseño de los vectores para la construcción de las fusiones traduccionales con GFP	43
2.4.3 Diseño de los vectores BiFC	44
2.5 DISCUSIÓN	45
2.5.1 Se tienen realizadas las construcciones necesarias para llevar a cabo la expresión transitoria de una proteína en células vegetales..	45
2.5.2 EPL1 funciona como un dímero y se mantiene en el núcleo de la célula vegetal	46
2.6 CONCLUSIÓN	48
PERSPECTIVAS	49
REFERENCIAS	51
ANEXO 1	60
Generación de líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> 35S:EPL1-GFP	60
ANEXO 2	62

Generación de líneas transgénicas 35S::EPL1 sobre el fondo mutante <i>rh6</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
ANEXO 3	64
Papel del motivo de glicosilación y el sitio de oxidación de EPL1	64
Ilustración 2 Alineamiento de las proteínas TaEPL1 y TvSm1	65

Lista de figuras

Capítulo 1.

- Figura 1. 1 Expresión relativa de los niveles de expresión de TaEPL1 en las plantas de *Arabidopsis thaliana* 24
- Figura 1. 2 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra bacteria hemibiotróficas 25
- Figura 1. 3 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra hongos necrotróficos 26
- Figura 1. 4 La línea EPL1-3 presenta un retraso en la infección con *Botrytis B05.10* 27
- Figura 1. 5 Las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 tienen niveles elevados de H₂O₂ 28
- Figura 1. 6 Expresión relativa de los niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de *Arabidopsis thaliana* 35S::TaEPL1 29
- Figura 1. 7 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con *Pst DC3000* 30
- Figura 1. 8 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con *Botrytis cinerea* 31

Anexos

1. Generación de líneas transgénicas de <i>Arabiopsis thaliana</i> 35S:EPL1-GFP	71
2. Generación de líneas transgénicas 35S::EPL1 sobre el fondo mutante rhd6 de <i>Arabiopsis thaliana</i>	73
3. Papel del motivo de glicosilación y el sitio de oxidación de EPL1	75

Abreviaturas

BiFC	Complementación de Fluorescencia Bimolecular por sus siglas en inglés <i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
CPs	Cerato-plataninas
DCFH2-DA	Compuesto 2',7'-dicloro-dihidrofluorescein-di-acetato
Dpi	Después de la infección
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPL1	Por sus siglas en inglés <i>Eliciting plant response-like</i>
ET	Etileno
ETI	Inmunidad activada por efectores, por sus siglas en inglés <i>Effector-triggered immunity</i>
ETS	Susceptibilidad activada por efectores, por sus siglas en inglés <i>Effector-triggered susceptibility</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
ISR	Resistencia sistémica inducida, por sus siglas en inglés <i>Induced systemic resistance</i>
JA	Ácido jasmónico
KI	Yoduro de potasio
LRR-	Dominio rico en repetidos de leucinas, por sus siglas en inglés <i>Leucine-rich repeat domain</i>
MAMPs/ PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos o a microbios, por sus siglas en inglés <i>microbial- or pathogen-associated molecular patterns</i>
MTI/ PTI	Inmunidad provocada por MAMPs o PAMPS, por sus siglas en inglés <i>MAMPs- or PAMPS-triggered immunity</i>
NBS	Sitio de unión a nucleótidos, por sus siglas en inglés <i>Nucleotide-binding site</i>

PCD	Muerte celular programada, por sus siglas en inglés <i>Program cell-death</i>
PGPF	Hongos que promueven el crecimiento de las plantas, por sus siglas en inglés <i>Plant Growth Promoting Fungi</i>
PRRs	Receptores de reconocimiento a patrones, por sus siglas en inglés <i>pattern recognition receptors</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida, por sus siglas en inglés <i>Systemic acquired resistance</i>
SM1	Por sus siglas en inglés <i>Small protein 1</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias
Wt	Genotipo silvestre por el inglés <i>wild-type</i>

Glosario

Abaxial. Es el lado que encara hacia el otro lado del eje. La superficie abaxial de la hoja es el lado de la hoja que queda más lejos del tallo principal. Frecuentemente, la superficie inferior de la hoja.

Ácido abscísico (ABA). Una fitohormona que regula las respuestas de la planta al estrés ambiental. Regula la transición a la dormancia y la maduración de semillas. Tienen un papel importante en las respuestas a estrés hídrico y la apertura de estomas.

Ácido jasmónico. Fitohormona involucrada en la respuesta contra patógenos necrotróficos y la inducción de respuestas anti-herbívoros. Produce volátiles para sensibilizar a otros tejidos o atraer predadores contra los insectos.

Ácido salicílico. Fitohormona involucrada en la respuesta contra patógeno biotróficos. Induce las respuestas de defensa y participa en la resistencia sistémica adquirida (SAR).

Adaxial. Es el lado que queda frente al eje. La superficie adaxial de una hoja es el lado de la hoja que ve de frente o queda más cerca del tallo principal. Frecuentemente, la superficie superior de la hoja.

Alelo. Una de dos o más formas alternas de un gen.

Amino ácido. Unidad repetitiva de las proteínas; consiste de un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y un grupo variable R.

Apoptosis. Muerte celular programada, en la cual la célula lleva a cabo su propia degradación de DNA, el núcleo y el citoplasma se encojen y la célula sufre fagocitosis por otras células sin liberar su contenido.

Auxina. Fitohormona que estimula el crecimiento pero suprime el desarrollo de los meristemas. El ácido indol-acético es la auxina natural más frecuente. Esta hormona también participa en el fototropismo y gravitropismo. Está involucrada en

el mantenimiento de las células madre, la iniciación de organogénesis y la ramificación de las plantas.

Biblioteca de cDNA (DNA complementario). Colección de colias de bacterias que contiene fragmentos de DNA que han sido producidos por transcripción reversa de mRNA celular.

Citocinina. Hormona de la planta que estimula el crecimiento y promueve el desarrollo de brotes de los meristemas. Esta acción está inhibida por auxinas. También participa en la división celular, la senescencia de las hojas, la localización de nutrientes y el desarrollo de nódulos.

Clonación de un gen. Transferencia de un fragmento de DNA de interés de un organismo a un elemento genético auto-replicativo, como un plásmido bacteriano para posteriores aplicaciones particulares de dicho gen.

Control biológico o biocontrol. El uso de organismos específicos (insectos, parásitos o patógenos) que actúan como enemigos vivos naturales para reducir la población debajo de los niveles deseados de organismos dañinos para la planta.

Correlación. Grado de asociación entre dos o más variables.

Cotiledón. La primera hoja (en monocotiledóneas) o el primer par de hojas (en dicotiledóneas) producido por el embrión de una semilla germinada. Muchas veces es estructuralmente diferente de las hojas posteriores.

DNA. Ácido Desoxirribonucleico, un polímero de desoxirribonucleótidos que acarrea toda la información genética de una célula viva.

Elicitor. Compuestos que pueden inducir respuestas de defensa en las plantas similares a las que producen los patógenos.

Evolución. Cambios genéticos que toman lugar en un grupo de organismos.

Exón. Región codificante de un gen dividido (interrumpido por un intrón). Después del procesamiento los exones permanecen en el RNA mensajero.

Fitohormona. Hormonas de plantas, son sustancias que regulan los procesos celulares de la planta, frecuentemente a distancia. Esto significa que, una hormona puede ser sintetizada y secretada por un tejido o célula, liberarse en el sistema vascular, y eventualmente ser reconocidos por una célula en un lugar distante de la planta.

Gen constitutivo. Un gen que no es regulado y que es expresado continuamente.
Gen housekeeping.

Gen. Unidad física y funcional de herencia, que acarrea la información de una generación a la otra. En término moleculares, es la secuencia entera de DNA —incluyendo exones, intrones y regiones reguladoras de la transcripción— necesarios para la producción de un producto génico funcional.

Giberelinas. Hormonas de la planta que estimulan el crecimiento a través de la elongación celular. Se utiliza para estimular la germinación de las semillas, promover la floración y el crecimiento del fruto y en algunas especies promover la determinación del sexo.

Homocigoto. Se refiere a un organismo individual que posee dos copias idénticas del mismo alelo en un locus.

Intrón. Secuencia intermedia en un gen dividido; se remueve del RNA después de la transcripción.

Locus. Posición en un cromosoma donde se localiza un gen específico.

Micoparasitismo. Parasitismo de un hongo producido por otro hongo. El parasitismo de define como el ataque directo seguido de la utilización de nutrientes del hospedero por el parásito.

Organismo modelo. Un organismo que es ampliamente utilizado en estudios genéticos debido a sus características, como tiempo corto de generación, progenie numerosa, y genoma pequeño.

Planta transgénica. Planta cuyo genoma ha sido modificado mediante ingeniería genética, bien para introducir uno o varios genes de otras especies.

Plásmido. Molécula de DNA pequeño y circular que se encuentra en bacterias y es capaz de replicarse de forma independiente del cromosoma bacteriano.

Priming. Plantas que se encuentran en este estado responden a muy baja estimulación con defensas más rápidas y más fuertes que las plantas sin sensibilizar.

Replicación. Proceso a través del cual el DNA es sintetizado a partir de una cadena monocatenaria molde.

RNA. Ácido Ribonucleico, un polímero de ribonucleótidos que es indispensable para el funcionamiento de la célula. RNA Ribosomal (rRNA) es un componente central en el funcionamiento de los ribosomas. RNA mensajero (mRNA) transporta el transcrito del gen de una proteína del DNA en el núcleo al ribosoma en el citoplasma, donde se traduce a la molécula de proteína con ayuda del RNA de transferencia (tRNA) que se encuentra unido a los aminoácidos necesarios para llevar a cabo el ensamble correcto de la proteína.

Secuenciación de DNA. Proceso para determinar la secuencia de bases a lo largo de una molécula de DNA.

Traducción. Proceso a través del cual una proteína se ensambla a partir de la información contenida en el mRNA.

Transcripción reversa. Síntesis de DNA a partir de un molde de RNA.

Transcripción. Proceso por el cual RNA es sintetizado a partir de una cadena molde de DNA.

Transformación. Mecanismo por el cual DNA que se encuentra en el medio es tomado por la célula.

Transgen. Gen externo o foráneo u otro fragmento de DNA llevado en el DNA de la línea germinal.

Vector de clonación. Molécula de DNA que se puede replicar de forma estable, al cual se le puede adjuntar un fragmento externo de DNA para transferido a una célula hospedera.

Vector de expresión. Un vector de clonación que además posee las secuencias de DNA de un promotor, un sitio de unión al ribosoma y sitios de iniciación y terminación de la transcripción que permiten que el fragmento de DNA insertado en el vector pueda ser transcrito y traducido.

Resumen

Análisis del papel de la proteína EPL1 de *Trichoderma atroviride* en la resistencia a patógenos en *Arabidopsis thaliana*

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran expuestas a diversos tipos de estrés abiótico o biótico. Para sobrevivir han evolucionado mecanismos de defensa que les ayudan a protegerse del ambiente; por ejemplo relaciones benéficas con habitantes de la rizósfera, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma*. Estos hongos han sido ampliamente estudiados por los beneficios que ofrecen a las plantas. Se ha demostrado que la interacción de algunas especies de *Trichoderma* con las plantas promueve su crecimiento, desarrollo e incluso la resistencia a patógenos. Uno de los mecanismos para promover las respuestas de defensa es a través de elicitores. EPL1 es un elicitador secretado por *Trichoderma atroviride* que pertenece a la familia de las cerato-plataninas y que se ha descrito que está involucrado en la resistencia a enfermedades en las plantas. El siguiente trabajo se divide en dos capítulos. En el primero se analizó el papel protector que confiere la sobreexpresión de EPL1 en plantas de *Arabidopsis* contra patógenos. Nuestros datos apuntan a que la expresión de TaEPL1 produce una acumulación de ROS y la inducción de genes relacionados a defensa, incluso antes de la interacción con organismos patógenos, además produce resistencia a enfermedades causadas por *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea*, principalmente en la línea transgénica EPL1-3. En el segundo capítulo se describe la importancia de determinar la localización intracelular de la proteína EPL1 y su conformación como dímero en plantas. Se espera que estos resultados aporten información trascendente que ayude a inferir la forma de acción de la proteína para activar las respuestas de defensa de la planta

PALABRAS CLAVE. *cerato-plataninas, efector, resistencia a patógenos, localización celular*

Abstract

Role of the EPL1 protein from *Trichoderma atroviride* in *Arabidopsis thaliana* pathogen resistance

Plants are sessile organisms that are exposed to different kinds of abiotic or abiotic stress. To overcome these, plants have evolved complex defense mechanisms that help them to protect themselves from the environment; for example, they have developed benefit relationships with rhizosphere inhabitants like fungi of the *Trichoderma* genus. These fungi have been widely studied due to the benefits they give to the plants. It has been shown that some *Trichoderma*-plant interaction promotes plant growth, development and even pathogen resistance. One of the mechanisms by which the *Trichoderma* genus fungi induce defense responses is through elicitors. EPL1 is an elicitor secreted by *Trichoderma atroviride* that belongs to the Cerato-platanin protein family and it has been described to be involved in plant disease resistance. The present work is divided into two chapters. In the first Chapter, the protective role of the EPL1 overexpression in *Arabidopsis* plants against plant pathogens was analyzed. Our data provides evidence that TaEPL1 expression produces ROS accumulation and induction of defense-related genes, even before of the plant-pathogen interaction, as well as it confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea*, especially in the EPL1-3 transgenic plant. The second chapter describes the importance of the determination of the EPL1 protein intracellular localization and the dimer conformation in vegetal cells. It is to be expected that this results offer some insight about the TaEPL1 protein function in the activation of the plant defense responses.

KEYWORDS. *cerato-platanins, effector, pathogen resistance, cellular localization*

CAPÍTULO 1

La sobreexpresión de TaEPL1, un miembro de la familia de las cerato-plataninas de *Trichoderma atroviride* confiere resistencia a patógenos en plantas de *Arabidopsis*

Rojas-Moreno Mónica M^a., Serrano Mario^b, y Jiménez-Bremont Juan Francisco^{1a}

^aLaboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, México.

^bLaboratorio de Genómica Funcional de Eucariontes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de México Campus Moleros, Morelos, México

¹ Autor de correposndencia: Juan Francisco Jiménez Bremont email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Revista:
Biochemical and Biophysical Research Communications

1.1 RESUMEN

Las plantas se encuentran constantemente expuestas a factores ambientales, como: frío, sequía, salinidad y también a la interacción con microorganismos que pueden ser deletéreos o benéficos. Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa complejos que les ayudan a protegerse; entre estos, han evolucionado relaciones simbióticas con habitantes de la rizósfera, como es el caso de los hongos del género *Trichoderma*. Los hongos filamentosos de este género son habitantes comunes del suelo que colonizan la raíz de la planta. Parte de esta interacción comprende una red de señalizadores moleculares para establecer un diálogo planta-hongo, y entre estas moléculas se encuentran las cerato-plataninas como *EPL1* de *Trichoderma atroviride*. Las plantas de *Arabidopsis* que expresan el elicitor *EPL1*, poseen niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y además genes relacionados a defensa como *PAL1*, *PDF1.2* y *LOX3* fueron inducidos aún sin estar expuestos a retos con patógenos. Estas características les confieren un estado de 'priming' o sensibilización a las plantas transgénicas que les permite responder de forma más rápida y eficiente a una infección una vez que se presenta el patógeno. Por lo tanto las plantas transgénicas *EPL1-2*, *EPL1-3* y *EPL1-4* fueron más resistentes a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae pv. tomatum* DC3000, y también la línea *EPL1-3* fue menos susceptible a la enfermedad causada por el hongo necrótico *Botrytis cinerea*. Es por esto que se propone que *EPL1* es una excelente molécula candidata que se puede emplear para generar cultivos de interés agrícola con una resistencia mejorada a enfermedades.

Palabras clave: *Arabidopsis*, *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea*, efector

1.2 ABSTRACT

Plants are constantly exposed to different environmental factors, such as: cold, drought, salinity and also microorganism interactions that can be deleterious or benefit the plant. The plant has developed complex defense mechanisms that help to protect themselves, among these, they have evolved symbiotic relationships with rhizosphere inhabitants, like is the case of fungi from the *Trichoderma* genus. Filamentous fungi of this genus are common in soils and can colonize plant roots. This interaction includes a network of signaling molecules to establish a plant-fungal dialogue, and among these molecules are the ceratoplatanins as EPL1 of *Trichoderma atroviride*. The *Arabidopsis* plants that express the TaEPL1 elicitor, exhibit high ROS levels and induce defense-related genes as PAL1, PDF1.2 and LOX3, even without being exposed to pathogen challenges. These characteristics confer a priming state to the transgenic plant that allows them to respond in a more efficient and faster way to an infection once the pathogen is introduced. Therefore, transgenic plants EPL1-2, EPL1-3 and EPL1-4 were more resistant to infection by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 *tomato*, and also the EPL1-3 line was less susceptible to the disease caused by the necrotic fungus *Botrytis cinerea*. That is why it is proposed that EPL1 is an excellent candidate molecule that can be used to generate crops of agricultural interest with an improved resistance to diseases.

KEYWORDS. *Arabidopsis*, *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea*, effector

1.3 INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos multicelulares sésiles que están sujetas a cambios en su metabolismo para regular su crecimiento y desarrollo [1,2]. Además se encuentran constantemente expuestas a una variedad de estreses bióticos como infecciones fúngicas, bacterianas o virales [3]; de hecho estas interacciones con microorganismos han moldeado la evolución de las plantas [4] y las han llevado a favorecer sus respuestas de defensa. Las respuestas de defensa de la planta contra microorganismos invasores comprenden al menos dos sistemas de reconocimiento. En el primer tipo de reconocimiento, conocido como inmunidad innata de la planta, aquí las defensas basales tempranas que limitan el crecimiento del microorganismo atacante son iniciadas en la cara externa de la célula hospedera, donde elicitores microbianos conservados, llamados patrones moleculares asociados a patógenos o a microbios (MAMPs o PAMPs), son reconocidos por receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) localizados en la membrana plasmática [5]. Los PRRs se subdividen en dos grupos principales: receptores de cinasas, que también son capaces de reconocer estrés abiótico, y las menos abundantes proteínas tipo-receptor [6]. La estimulación de los PRRs produce una cascada de transducción de señales y la activación de inmunidad provocada por los patrones moleculares MAMPs o PAMPs (MTI o PTI) [7].

El otro tipo de respuesta inmune de la planta es la resistencia inducida. Este tipo de resistencia frecuentemente actúa de forma sistémica en toda la planta y es típicamente efectiva contra un amplio espectro de microorganismos atacantes. Sin embargo, las plantas deben balancear los costos y los beneficios

potenciales de invertir en defensa ya que es ecológicamente costoso, esto significa que se invierten muchos recursos de la planta en la activación de este tipo de defensa [8]. Debido a esto, se cree que la selección natural ha favorecido la evolución de inducibilidad, es decir, estas defensas sólo se producen en presencia de un patógeno [9]. No obstante, cuando la infección se da por patógenos exitosos que liberan moléculas de virulencia (proteínas avr, giberelinas, entre otras), llamadas efectoras, se suprimen las respuestas PTI, facilitando la colonización y causando enfermedades; esto se conoce como susceptibilidad activada por efectores (ETS) [10]. En este tipo de susceptibilidad activada por efectores (ETS), los patógenos se las ingenian para suprimir las respuestas de defensa a través del despliegue de moléculas efectoras. Por el contrario, las plantas pueden sentir este tipo de efectores mediante productos génicos intracelulares de resistencia. Uno de éstos, el más abundante son una clase de receptores intracelulares polimórficos que contienen un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio rico en repetidos de leucina (LRR), estas proteínas son llamadas proteínas NBS-LRR. Los efectores de los patógenos de diversos reinos son reconocidos por las proteínas NBS-LRR y este fenómeno puede activar diferentes vías de transducción de señales, dependiendo del tipo de microorganismo que interactúa con la planta [8,10]. El reconocimiento del patógeno mediante estos receptores induce inmunidad activada por efectores (ETI). El resultado cuantitativo del sistema inmune de la planta puede ser ilustrado por el modelo de zigzag de la Ilustración 1, en el cual la amplitud final de la resistencia o la susceptibilidad [10] es proporcional a $[PTI-ETS+ETI]$.

Al mismo tiempo, las plantas son capaces de activar vías de defensa separadas que son dependientes de fitohormonas y que están sujetas al tipo de patógeno al cual se enfrentan [11]. Las respuestas derivadas del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) suelen ser iniciadas por organismos necrotróficos, mientras que las respuestas dependientes del ácido salicílico (SA) son activadas por patógenos biotróficos. Los mecanismos responsables de este reconocimiento y respuesta diferencial pueden involucrar un *'crosstalk'*, es decir, que componentes de una vía de transducción de señales afectan a la otra, por lo que no pueden ocurrir de manera simultánea [8,12]. La respuesta que involucra al ácido jasmónico (JA) y al etileno (ET) se conoce como vía de resistencia sistémica o resistencia sistémica inducida (ISR), es una respuesta a corto plazo y se ha propuesto que está involucrada con la respuesta que ocurre en la planta cuando interactúa con organismos benéficos. Mientras que la respuesta dependiente de ácido salicílico (SA) es de resistencia local y sistémica y se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR); es una respuesta a largo plazo y que es más específica a la infección por patógenos y se encuentra mediada por la producción de proteínas PR (proteínas relacionadas a patógenos) [8,12,13].

Numerosos reportes indican que los hongos filamentosos del género *Trichoderma* además de la habilidad de atacar o inhibir directamente el crecimiento de patógenos de plantas, tienen la capacidad de promover resistencia sistémica y localizada a una variedad de patógenos [12]. Las especies del género *Trichoderma* son hongos filamentosos de vida libre que son altamente interactivos con la raíz, el suelo y los ambientes foliares. Diversos reportes sugieren la

producción una amplia variedad de metabolitos y compuestos con actividad antibiótica. Además pueden competir con otros microorganismos en la rizósfera por nutrientes y/o espacio [14,15]. Estos hongos han sido ampliamente utilizados como agentes de biocontrol [16], suprimen enfermedades que afectan a la planta por uno o más mecanismos directos y/o indirectos, y logran estimular el crecimiento de la planta (PGPF) [13]. El éxito de *Trichoderma* en la rizósfera se debe a su alta capacidad reproductiva, su habilidad de sobrevivir en ambientes desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad de modificar la rizósfera y su alta agresividad contra hongos patógenos de plantas [14,17]. A la fecha se han identificado 1,100 cepas a partir de 75 especies caracterizadas molecularmente de *Hypocrea/Trichoderma* [18]. Las especies que se estudian con más frecuencia son las micoparásitas *T. atroviride* y *T. virens* [15].

Actualmente se sabe gracias a reportes bioquímicos y analíticos que estos hongos son productores prolíficos de metabolitos secundarios como: peptaiboles, cerato-plataninas, NRPs, terpenos volátiles y no volátiles, pironas, sideróforos y compuestos que contienen nitrógeno; se han identificado 373 moléculas diferentes, pero en la mayoría de los casos la actividad específica de la molécula sigue siendo desconocida [19]. En la naturaleza, estos compuestos llevan a cabo funciones especializadas en concentraciones muy bajas, y pueden ser considerados como moléculas mediadoras de la comunicación química entre los habitantes de los nichos ecológicos del suelo, facilitando la simbiosis con microorganismos, insectos, plantas y animales superiores [15,20].

De las moléculas que produce *Trichoderma atroviride* se ha reconocido a EPL1 (eliciting protein-like) [21], la cual se ha identificado como un elicitor [22]. Se denomina elicitor a aquellas moléculas que se originan ya sea de la planta hospedera (elicitores endógenos) o a partir del patógeno de la planta (elicitores exógenos), y que son capaces de inducir respuestas bioquímicas y/o estructurales asociadas con la expresión de resistencia a enfermedades en las plantas [3,23]. La proteína EPL1 se ha determinado que pertenece a la familia de proteínas de las cerato-plataninas [21,24–27], las cuáles son proteínas de tamaño pequeño, que son secretadas y cuya característica principal es que poseen cuatro cisteínas conservadas [28,29]. Las cerato-plataninas son producidas por hongos filamentosos y son factores importantes de interacción de los hongos con otros organismos, mediante la estimulación de la inducción de respuestas de defensa en la planta [27,30].

La inducción de resistencia en las plantas por especies de *Trichoderma* ha sido muy poco estudiada en comparación con el tipo de respuestas que son inducidas por rizobacterias, sin embargo existen varias evidencias [31–34] y el papel de protección es similar. A pesar de que se ha reportado la respuesta mediada por la planta como un componente de bioprotección por las especies de *Trichoderma*, los mecanismos moleculares involucrados siguen siendo desconocidos. El primer reporte de identificación, purificación y caracterización de un elicitor producida por el género *Trichoderma*, describe a una proteína denominada Sm1, la cual es un ortólogo de EPL1 y es secretada por *T. virens* [35]. Sm1 carece de toxicidad contra la planta y microbios; por el contrario, activa

la producción de especies reactivas de oxígeno en plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas (arroz y algodón) e induce la expresión de genes relacionados con la defensa tanto local como sistémica. También induce resistencia sistémica a enfermedades causadas por el patógeno *Pythium ultimum* en la dicotiledónea algodón (*Gossypium hirsutum*) [36] y es requerido para la protección contra enfermedades causadas por *Colletotrichum graminicola* en el maíz (*Zea mays*) asociado con una inducción de ácido jasmónico (JA) y de la expresión de genes biosintéticos de compuestos volátiles precursores de hormonas [37].

Existen muchas evidencias del papel protector de las proteínas Epl1 y Sm1 de *Trichoderma* [21,22,30,35–38] en plantas; sin embargo, hasta el momento no se ha generado una línea sobreexpresora del elicitor Epl1 en *Arabidopsis*. Por lo que el presente estudio se realizó para investigar los efectos del papel protector de la expresión de la proteína Epl1 de *T. atroviride* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, y determinar si existe una disminución de la infección causada por patógenos de plantas en las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el elicitor.

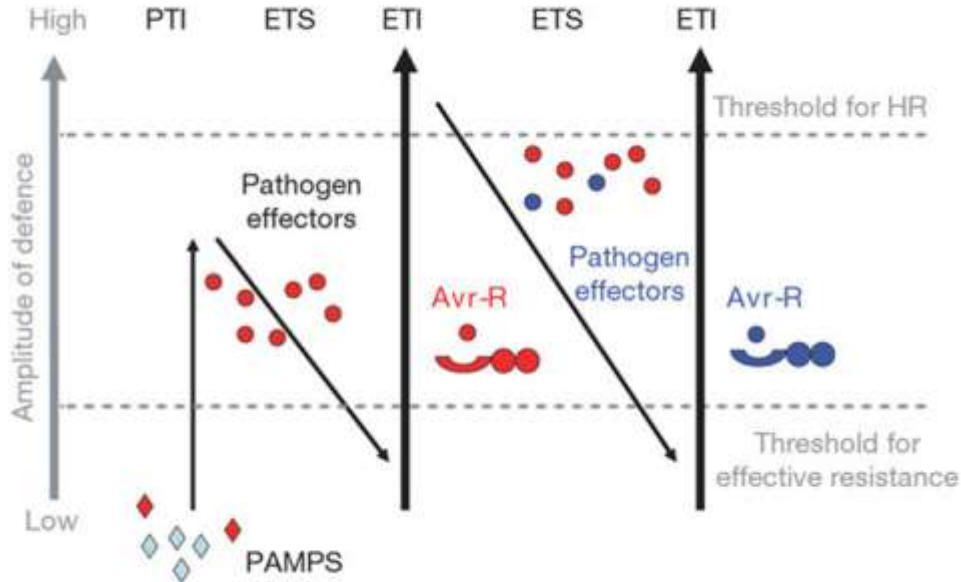


Ilustración 1. Modelo zig-zag que ilustra el resultado cuantitativo del sistema inmune de la planta. (Tomada de Jones & Dangl 2006)

En este esquema, la amplitud final de la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. En fase 1, las plantas detectan los patrones moleculares asociados a microbios/patógenos (MAMPs/PAMPs, diamantes rojos) a través de PRR para desencadenar inmunidad activada por PAMPs (PTI). En fase 2, los patógenos exitosos liberan efectores que interfieren con PTI, o de alguna manera permiten la nutrición y dispersión del patógeno, resultando en susceptibilidad activada por efectores (ETS). En fase 3, un efector (rojo) es reconocido por una proteína NB-LRR, iniciando la inmunidad activada por efectores (ETI), una versión amplificada de PTI que frecuentemente sobrepasa el umbral para la inducción de muerte celular hipersensible (HR). En fase 4, patógenos aislados que han sido seleccionados y han perdido el efector rojo y quizá ganado nuevos efectores a través de transferencia horizontal (azul) —pueden ayudar a los patógenos a suprimir ETI. La selección favorece nuevos alelos de la planta para la producción de NB-LRR que pueden reconocer uno de los nuevos efectores adquiridos, resultando nuevamente en ETI.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Generación de las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresoras del gen TaEPL1 (35S::TaEPL1)

A partir de una biblioteca de cDNA de *Trichoderma atroviride* se clonó el gen EPL1 utilizando los oligos EPL1-Fw 5' ATGCAGTTCTCCAGCCTCTTCAAG3' y EPL1-Rv 5' TTAGAGGCCGCGAGTTGCTCACAGC3', el producto de amplificación de 417pb fue clonado en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). La clona de entrada secuenciada y comprobada fue recombinada con el vector destino pMDC32[39] empleando la enzima LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). La cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada mediante electroporación con el plásmido pMDC32-EPL1. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron transformadas empleando estas células en el método de 'floral dip' [40]. Las líneas transgénicas insercionales de T-DNA que expresan el gen TaEPL1 bajo el promotor constitutivo CaMV 35S fueron seleccionadas en medio 0.5xMurashige&Skoog (MS) suplementado con 50mg/mL Higromicina. (Tesis Ramírez Alonso, 2015) La generación T4 de las plantas transgénicas se utilizó para los ensayos posteriores.

1.4.2 Crecimiento de plantas y microorganismos

Las plantas transgénicas *A. thaliana* 35S::TaEPL1 y la línea control *A. thaliana* ecotipo Col-0 se germinan en medio 0.5xMS en cámara de crecimiento. Posteriormente se transfieren a macetas con mezcla Sunshine mezcla comercial #3: vermiculita: perlita (3:1:1) en condiciones ambientales controladas de humedad y temperatura a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 horas luz ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

PPFD) 8 horas oscuridad. *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 fue crecida en medio Luria Bertani (10g/L Triptona, 5g/L Extracto de levadura y 5g/L NaCl pH=7.0) suplementado con Rifampicina 50mg/mL en agitación a 28°C. *Botrytis cinerea* cepa B05.10 fue en medio Agar Papa Dextrosa (PDA: 39g/L, Becton Dickinson, www.bd.com) en oscuridad a 25°C.

1.4.3 Interacción planta-*Pseudomonas syringae*

Plantas de 4 semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* transgénicas 35S::TaEPL1 y la línea control Col-0 fueron crecidas en condiciones óptimas hasta estar listas para la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000. El inóculo de Pst DC3000 se preparó creciendo la bacteria en medio LB con Rifampicina hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ de 0.8 a 1.0. El cultivo se centrifugó y se ajustó la O.D.₆₀₀ a 0.2 con MgCl₂ 10mM (Aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Se seleccionaron de 4 a 5 hojas por planta que fueron infiltradas en el lado abaxial de la hoja con una jeringa de 1mL sin aguja con la solución de bacterias recién preparada evitando el sistema vascular. Las plantas se cubrieron con domo de plástico para mantener la humedad durante 3 días. Para evaluar los síntomas de infección se hace conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), las hojas se colectan y se esteriliza la superficie con una solución de etanol al 70% por un minuto, seguido de tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril. Se cortan discos de las hojas de área conocida y se colocan en tubos de 1.5mL con agua destilada estéril, el tejido se muele completamente y se realizan diluciones seriadas. Se siembran 10µL de cada tubo en medio LB-Agar-Rif50, que se incuban a 28°C por aproximadamente 2 días y entonces se cuentan las UFC de

cada dilución de cada muestra [41]. Cada ensayo de interacción con *Pst DC3000* se realizó al menos tres veces con resultados similares en cada ocasión.

1.4.4 Interacción planta-*Botrytis cinerea*

Plantas de 4 semanas de edad de *Arabidopsis thaliana* transgénicas 35S::TaEPL1 y la línea control Col-0 fueron crecidas en condiciones óptimas hasta estar listas para la infección con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* cepa B05.10. El inóculo se preparó colectando las esporas a partir de la placa de medio PDA, añadiendo agua destilada estéril y raspando la superficie con un asa acodada, el micelio se recupera en un tubo Falcon de 50mL, el cual se agitó vigorosamente para separar las esporas. La solución se filtra a través de lana de vidrio y se centrifuga para colectar las esporas. Las esporas fueron resuspendidas en 500µL de agua destilada estéril y se preparó una solución 1/1000 para hacer conteo de espora. El inóculo se ajustó a 2×10^5 esporas/mL en medio PDB 0.25x y se infectaron de 4 a 5 hojas por planta con una gota de la suspensión de esporas (8000esporas/gota) en la parte adaxial de la hoja y evitando el sistema vascular. Las plantas se cubren con domo plástico y se mantiene una alta humedad relativa y oscuridad para favorecer la infección [42]. Tres días después de la infección se mide la incidencia de la infección y la longitud de la lesión con un Vernier Traceable® Carbon Fiber Calipers 4in. Cada ensayo de interacción con *B. cinerea* cepa B05.10 se realizó al menos tres veces con resultados similares en cada ocasión.

1.4.5 Tinción con azul de tripano

Las hojas de *Arabidopsis thaliana* fueron teñidas sumergiéndolas directamente en la solución de azul de tripano a una concentración de 10mg/mL (10mL ácido láctico 85% w/w, 10mL fenol buffer TE equilibrado pH=7.5-8.5, 10mL glicerol, 10mL agua destilada, 40mg azul de tripano) durante toda la noche en cada tiempo que desea evaluarse la presencia de muerte celular (antes de la interacción con *B. cinerea* T=0 h y después de la infección T=24 h). Para desteñir se retiró el colorante y se sumergieron las hojas en baños consecutivos de etanol 98-100% hasta que las hojas se volvieron incoloras. Posteriormente se observaron y se les tomó fotografía [43].

1.4.6 Detección de H₂O₂ mediante microscopia de fluorescencia

Localización in situ de H₂O₂ se realizó utilizando el compuesto permeable, altamente sensible 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA). Plántulas de 10 días de edad de la línea control Col-0 y las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 se transfirieron a placas de 24 pozos y se trataron con medio 0.5xMS líquido (como control) o con 0.5xMS + 100 U/ml CAT (enzima secuestradora de H₂O₂) a 22±3°C en luz durante 4 horas. Posteriormente las plántulas se incubaron con 25µM DCFH₂-DA disuelto en buffer Tris (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 7.2) en oscuridad durante 30 min en agitación (40rpm). Al finalizar la incubación las plantas fueron lavadas con buffer Tris (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 6.1) para remover el exceso de colorante [44] y las raíces fueron observadas en microscopio de Epi-fluorescencia (Axio Imager M2; Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA).

1.4.7 Cuantificación de H₂O₂ mediante KI

Plántulas de 10 días de edad germinadas en medio 0.5×MS se pesaron 100mg de tejido fresco que fueron homogenizados con 375µL de ácido tricloroacético 0.1% (Sigma-Aldrich) en hielo. Se centrifugó a 7000rpm a 4°C durante 20 min. Se tomaron 250µL del sobrenadante y se le agregaron 250µL de buffer de fosfato de sodio 10mM pH=7.0. Después se le añadió 500µL de yoduro de potasio 1M, y se midió inmediatamente en placa a una longitud de onda de 390nm. Se comparó con una curva de H₂O₂ control [45].

1.4.8 Cuantificación de la expresión de genes utilizando RT-PCR tiempo real

Se realizó la extracción de RNA de la línea control Col-0 y de las líneas transgénicas35::TaEPL1 siguiendo las instrucciones del proveedor de Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). Se emplearon plántulas de 15 días de edad crecidas en medio 0.5×MS, para cuantificar los niveles de transcrito del gen EPL1 y de hojas de roseta de 4 semanas de edad colectadas en los tiempos 0 horas y 24 horas post-infección con patógenos para medir la expresión de genes relacionados a defensa. Se verificó la calidad de la extracción en un gel de calidad y posteriormente se le dio un tratamiento con Turbo DNasa (Ambion). Se ajustó la cantidad la concentración del RNA a 50ng/µL. La síntesis de cDNA y los análisis cuantitativos de PCR se realizaron en una mezcla de reacción de 10µL que contenía 50ng de RNA total como molde usando el Kit Power SYBR® Green RNA-to-CT™ One-Step (Applied Biosystems). Las condiciones del termociclador consistieron de 30 min a 48°C (síntesis de cDNA), 10 min a 95°C (activación de la enzima AmpliTaqGold®DNA polymerase), seguido de 40 ciclos de PCR de 15 seg

a 95°C (desnaturalización) y 1 min a 60°C (alineamiento/extensión). Las curvas de fusión se realizaron en ciclos de 15 seg a 95°C (desnaturalización) 15 seg a 60°C (alineamiento) y 15 seg a 95°C (desnaturalización), incrementando la temperatura 0.3°C cada ciclo. El umbral del número de ciclos (valor Ct) fue empleado para calcular los niveles relativos de expresión mRNA- El valor Ct de cada gen blanco fue normalizado sustrayendo el valor Ct del gen de ubiquitinas 5 de Arabidopsis (At3g62250). El cambio en los niveles de expresión relativa de las muestras con respecto al control fue calculado usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [46]. La lista de genes analizados con RT-PCR tiempo real se muestra en la [Tabla 1](#). Para cada muestra tres replicas biológicas fueron analizadas con sus respectivas réplicas técnicas.

Tabla 1. Lista de genes de defensa utilizados para qRT-PCR

Gen	Locus	Descripción	Oligos
PR1	AT2G14610.1	La expresión del gen PR1 se induce en respuesta a una variedad de patógenos. Es un marcador molecular útil para la respuesta SAR. La expresión de este gen es en respuesta a SA.	5' -CGTCTTTGTAGCTCTTGTAGG-3'
			5' -ATGAGTCTGCAGTTGCCTCTTA-3'
PDF1.2a	AT5G44420.1	Codifica a una defensina de plantas que responde a etileno (ET) y ácido jasmónico (JA). Respuestas de defensa contra hongos. Resistencia sistémica dependiente de JA y ET. Respuesta a ET, respuesta a insectos, respuesta a JA.	5' -CTAAGTTTGCTTCCATCATCACC-3'
			5' - CTTCAAGGTTAATGCACTGATTC-3'
LOX3	AT1G17420.1	Respuestas de defensa. Proceso bio-sintético de ácido jasmónico, oxidación lipídica, desarrollo de polen. Respuesta a hongos, respuesta a alta intensidad de luz, respuesta a daño por heridas.	5' -CTTCACTGCTGGTGCATACG-3'
			5' - AAGACCATGTGGTTGTGTTGCA-3'
PAL1	AT2G37040.1	Codifica para una enzima liasa de fenilalanina-amonía. Involucrada en el proceso bio-sintético de SA. Involucrada en las respuestas de defensa, recuperación de sequía, respuesta a UV-B, respuesta a estrés oxidativo, respuesta a heridas.	5' -GTGGCTTGTTCCTTTCGTGCTT-3'
			5' -TGGTGTTACTACTGGTTTTGGTGCT-3'
PR4	AT3G04720.1	Codifica a una proteína similar a la <i>hevein</i> , una proteína anti-fúngica que une quitina del árbol de látex. Los niveles de mRNA aumentan en respuesta a etileno. Involucrada en las respuestas de defensa contra bacterias y hongos, respuesta a estrés salino y resistencia sistémica adquirida.	5' -GTACCACCGCGGACTACTGT-3'
			5' -TGGAGCAATAAGCACTCACG-3'
ZAT12	AT5G59820.1	Codifica a un dedo de zinc (factor de transcripción putativo). Proteína involucrada en la aclimatación a frío y a intensidad de luz alta. Regulada por ROS. Juega un papel central en la señalización de especies reactivas de oxígeno y estrés abiótico.	5' -ACAAAGCGTCGTTGTTAGGC-3'
			5' -ATCAAGTCGACGGTGGATGT-3'

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Generación de las líneas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresoras del gen EPL1 (35S::TaEPL1)

Para analizar la expresión del gen *EPL1* del hongo *Trichoderma atroviride* (TaEPL1) en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se generaron líneas transgénicas de T-DNA que sobreexpresan el gen. Se seleccionaron tres líneas de *A. thaliana* sobreexpresantes del gen EPL1 del hongo *T. atroviride*, denominadas EPL1-2, EPL1-3 y EPL1-4. Se cultivaron y crecieron hasta generar semilla de la generación T4. La sobreexpresión del gen EPL1 en cada línea se cuantificó mediante qRT-PCR en plantas de 28 días de edad. La línea EPL1-3 fue la que mostró mayor nivel de expresión 5.6 veces más que el gen *house-keeping*, seguida de la línea EPL1-4 que expresa TaEPL1 2.8 veces más, mientras que en EPL1-2 sólo se detecta una expresión relativa de 1.5 del transcrito TaEPL1. En la planta parental Col-0 no se detectó el transcrito EPL1 ([Figura 1.1](#)).

1.5.2 Las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 son más resistentes a la infección de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000

Para analizar si la expresión del elicitor Epl1 del hongo *T. atroviride* promueve la resistencia a bacterias biotróficas en las plantas transgénicas de *Arabidopsis*, las plantas de *Arabidopsis* fueron retadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000. Plantas de cuatro semanas de edad de las líneas Col-0, EPL1-2, EPL1-3 y EPL1-4 fueron infiltradas con una suspensión de bacterias (1×10^8 UFC/mL). Tres días después de la infección (dpi) se evaluó la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en cada línea. Se encontró que las líneas transgénicas son

más resistentes a la infección por *Pseudomonas*, en comparación a la parental ([Figura 1.2B](#)). En las líneas transgénicas se obtuvieron 4×10^8 UFC/cm² de hoja, mientras que en las plantas Col-0 se alcanzaron hasta 8×10^8 UFC/cm² de tejido. Por lo que las plantas de las líneas transgénicas que expresan el elicitor Epl1 del hongo *T. atroviride* presentan la mitad de UFC que en las plantas control. Además observamos que los síntomas de infección de las plantas Col-0 fueron más evidentes, con zonas cloróticas de mayor tamaño causadas por la infección ([Figura 1.2A](#)).

1.5.3 La línea transgénica EPL1-3 es menos susceptible a la infección del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* B05.10

Para evaluar si la expresión del elicitor EPL1 confiere resistencia a hongos filamentosos en las plantas que sobreexpresan el gen EPL1, se evaluó la interacción de las plantas con el hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* cepa B05.10. Plantas de cuatro semanas de edad fueron inoculadas con esporas de *B. cinerea*. Tres días después de la infección se evaluaron los síntomas de daño en las plantas como: la incidencia de la infección y el área de la lesión. La incidencia de la infección en todas las plantas fue mayor al 90%. En el caso de la infección por *B. cinerea* sólo la línea EPL1-3 resultó ser menos susceptible a la infección por *Botrytis*, teniendo un área de lesión significativamente menor que las plantas Col-0 ([Figura 1.3](#)). Cabe mencionar que la línea EPL1-3 fue también la que mostró una mayor expresión del elicitor EPL1 de *T. atroviride*.

Asimismo se comprobaron estos resultados mediante la tinción con azul de tripano que evalúa la presencia del hongo dentro del tejido vegetal así como

también es un indicador de muerte celular programada (PCD por siglas en inglés). En Col-0 se detecta fácilmente la presencia del hongo 24 horas después del tratamiento ([Figura 1.4](#)), mientras que en EPL1-3 aún no se puede detectar la presencia del hongo dentro del tejido vegetal en este mismo tiempo.

1.5.4 Las plantas que expresan el gen EPL1 tienen niveles endógenos de H₂O₂ elevados

La actividad protectora de Epl1 (y elicitores ortólogos) está asociada con la acumulación de especies reactivas de oxígeno como lo es el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), por eso es de interés medir los niveles endógenos de esta especie reactiva en las líneas transgénicas. Primero se realizó mediante una técnica cualitativa empleando el compuesto 2',7'-diclorofluorescein-diacetato [44] que reacciona con especies reactivas de oxígeno y emite fluorescencia, así se pudo observar la acumulación de H₂O₂ en la raíz de las plantas bajo el microscopio de epi-fluorescencia. Se realizó en plantas de 10 d, que no estaban sometidas a ningún tipo de tratamiento y para comparar se evaluó plantas crecidas en las mismas condiciones pero que fueron incubadas durante 4 horas con catalasa, la cual es una enzima que reacciona con peróxido y lo reduce en oxígeno y agua. Como se puede observar en la [Figura 1.5A](#), todas las plantas tienen niveles altos de peróxido, pero una vez que se aplica el tratamiento con catalasa, en las plantas Col-0 se abate casi por completo la fluorescencia, mientras que en las líneas transgénicas 35S:EPL1 la intensidad de la fluorescencia emitida se mantiene casi igual. Esto además se corrobora al realizar una medición cuantitativa con el ensayo con yoduro de potasio (KI), el cuál al

reaccionar con el H₂O₂ presente en las células forma un precipitado de color café que se puede detectar y medir mediante espectrofotometría ([Figura 1.5B](#)). En este caso se observa que sí hay diferencias significativas entre la producción de peróxido entre las líneas transgénicas y la línea tipo *wt*, siendo las primeras las que acumulan mayor cantidad del compuesto, en particular EPL1-3.

1.5.5 Las plantas transgénicas 35S::TaEPL1 acumulan transcritos de genes relacionados a defensa, antes de ser retadas con patógenos.

Previo a los retos con patógenos se realizó un análisis inicial de los niveles de expresión de genes relacionados a defensa mediante qRT-PCR en plántulas de 15 días de edad de las líneas sobre-expresoras del elicitor EPL1. Se evaluaron dos genes de la vía del ácido salicílico (*PR1* y *PAL1*) y dos genes de la vía del ácido jasmónico (JA) como *LOX3* y *PDF1.2a*. En la [Figura 1.6](#) se observa que los genes de la vía del JA se encuentran inducidos en todas las plantas transgénicas que sobreexpresan el elicitor EPL1. También se observó para el gen *PAL1* una mayor expresión en las tres líneas sobreexpresoras de EPL1; sin embargo, para el otro gen *PR1* de la vía de SA mostró un comportamiento opuesto, mostrando una represión para las tres líneas transgénicas. Interesantemente, este perfil de expresión de las líneas sobreexpresoras de Arabidopsis del gen EPL1 de *Trichoderma* fue obtenido en condiciones control, sin ningún tipo de interacción con los microorganismos patógenos, indicando que las respuestas de defensa podrían estar encendidas aún sin encontrarse expuestas al estrés biótico.

Por lo tanto se decidió evaluar de igual manera genes involucrados en las respuesta de defensa, antes de la infección (T=0 h) y 24 h después de la infección

de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ([Figura 1.7](#)), y *Botrytis cinerea* B05.10 ([Figura 1.8](#)), en la planta control Col-0 y en la línea sobreexpresora EPL1-3, la cual fue la que mostró menor susceptibilidad a ambos patógenos. Para este análisis se seleccionó el gen de la vía SA (*PR1*) y un gen de la vía JA (*PDF1.2*), además se agregaron dos genes más, uno involucrado en las respuesta de etileno (ET) como es el gen *PR4*, y el gen *ZAT12* que se relaciona con el señalamiento de especies reactivas de oxígeno.

Durante la infección con *P. syringae* DC3000 en condiciones normales ([Figura 1.7](#)), es decir, en el tiempo cero el gen *PR1* se encuentra reprimido en la línea EPL1-3. Después de 24 h de infección con la bacteria en la planta Col-0 se dispara el nivel de transcrito presente, pero la línea EPL1-3 no presenta diferencias significativas con la expresión basal de este gen en condiciones normales. El gen *PR4* se encuentra 2.5 veces más expresado en la línea EPL1-3 que en Col-0 en el momento previo a la infección, ese nivel en EPL1-3 se mantiene igual aún después de la infección Pst DC300, mientras que en Col-0 los niveles después de la infección aumentan hasta 6 veces. Para el gen *PDF1.2* se observa que antes de la infección el gen se encuentra 10 veces más inducido en la planta EPL1-3 que en las plantas control Col-0, sin embargo, después de la interacción con *Pst* DC3000, en las plantas Col-0 este gen se reprime, mientras que en las plantas transgénicas EPL1-3 no hay diferencia con la planta Col-0 antes del tratamiento, es decir, que los niveles de transcrito se mantienen en un nivel basal. Finalmente el gen *ZAT12* se encuentra inducido en la línea transgénica EPL1-3, tanto antes de la infección como después de la interacción

con *Pst* DC300, en la línea control Col-0 los niveles de transcrito aumentan después de la infección y alcanzan un nivel similar a EPL1-3 en T=0 h.

En el caso del tratamiento con *Botrytis cinerea* ([Figura 1.8](#)), de igual forma se compararon los niveles de los transcritos antes de la infección (control) y 24 h después de la infección. El gen *PR1* en EPL1-3 se encuentra reprimido en condiciones sin el hongo y mantiene reprimido después de 24 h en interacción, pero en las plantas control Col-0 la represión de *PR1* fue mucho mayor después de la infección con *Botrytis*. Los niveles de transcrito de *PR4* que se encontraban inducidos en la línea EPL1-3 antes de la infección disminuyen a un nivel basal después de la infección con el hongo, mientras que en Col-0 bajaron después de la infección. Los niveles de los transcritos de *PDF1.2* y *ZAT12* se encuentran inducidos previo al tratamiento con el hongo en la línea transgénica EPL1-3, y se ven disminuidos después de la infección con *Botrytis* regresando a un nivel basal, similar a Col-0 en T=0 h; sin embargo, en las plantas control Col-0 la represión después de la infección con el hongo fue más evidente.

Los datos obtenidos de inducción de estos genes en el tiempo cero, son un indicio del 'priming' que pueden tener estas plantas debido a la expresión del elicitor EPL1, y el comportamiento de los genes durante la infección con la bacteria *Pst* Dc3000 son evidencia de que la planta posee niveles elevados de ROS y que la vía del ácido jasmónico se encuentra inducida, más que la vía del ácido salicílico, a pesar de que la planta es capaz de resistir a ambos patógenos.

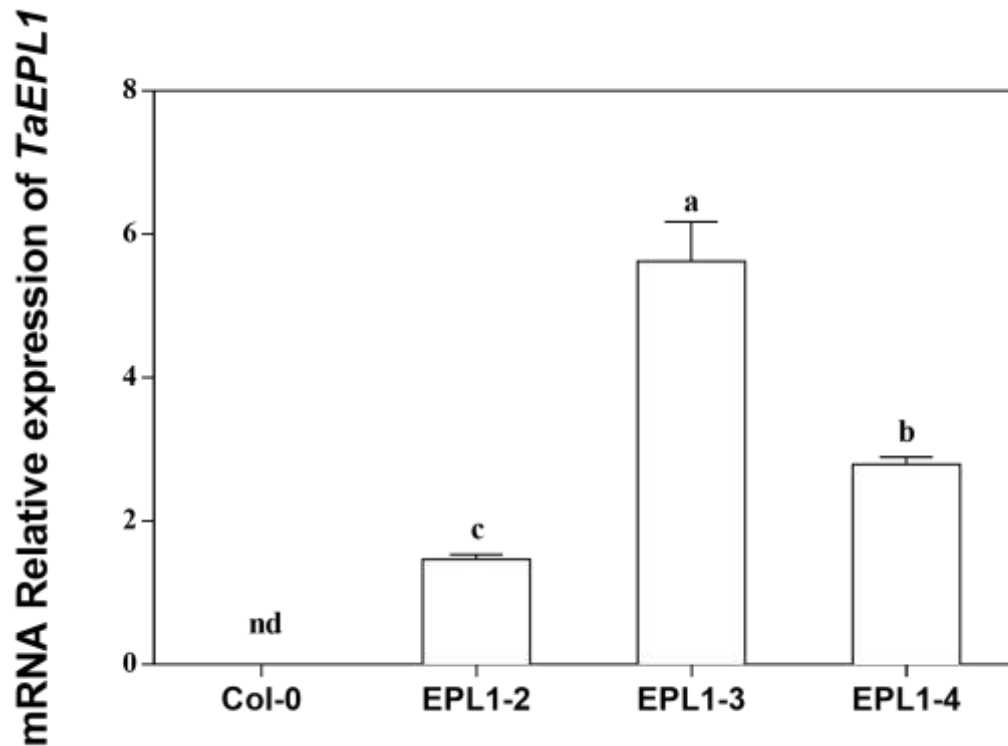


Figura 1. 1 Expresión relativa de los niveles de expresión de TaEPL1 en las plantas de *Arabidopsis thaliana*

Niveles de expresión del gen TaEPL1 en condiciones normales de crecimiento. Los niveles del transcrito de TaEPL1 en *Arabidopsis* Col-0 y las líneas transgénica 35S::TaEPL1 se determinó en hojas de roseta de plantas de 28 días de edad crecidas en suelo sunshine: vermiculita: perlita (3:1:1). La expresión relativa se determinó mediante qRT-PCR utilizando SYBR Green. Los valores representan la expresión relativa del gen TaEPL1 de cada línea transgénica con respecto al gen control de UBQ5 ([At3g62250](#)). Las barras representan el promedio \pm SEM (n=3). En Col-0 no se detectó presencia del transcrito (nd) de *EPL1*. Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey.

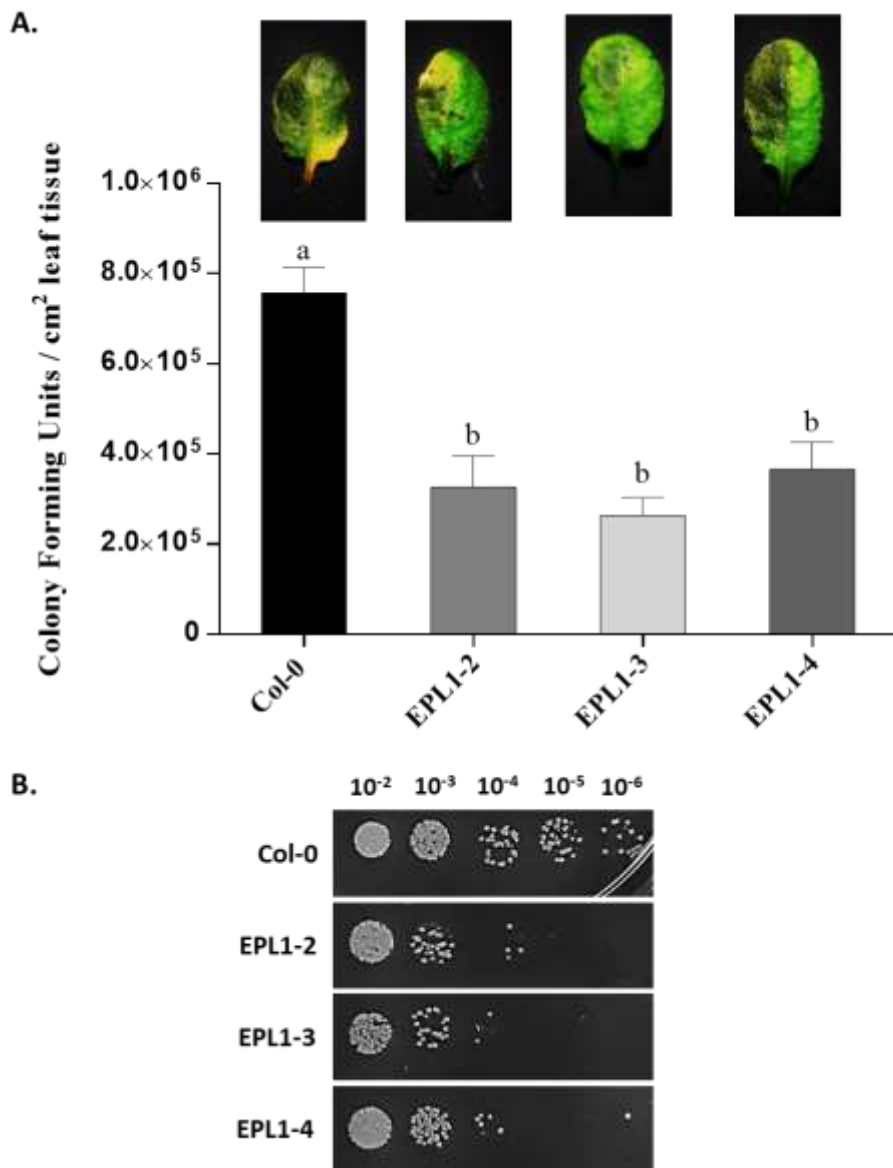


Figura 1. 2 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra bacteria hemibiotróficas

Plantas de cuatro semanas de edad fueron inoculadas con Pst DC300 a una concentración de 1×10^8 UFC/mL. **A.** Muestra hojas representativas de los síntomas de infección y la gráfica del conteo de unidades formadoras de colonias en cada línea 3 dpi. **B.** Imagen representativa de las UFC por cada línea en cada dilución. Los valores que se muestran son el promedio \pm SEM. Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey. El experimento se realizó al menos tres veces con resultados similares en cada ocasión.

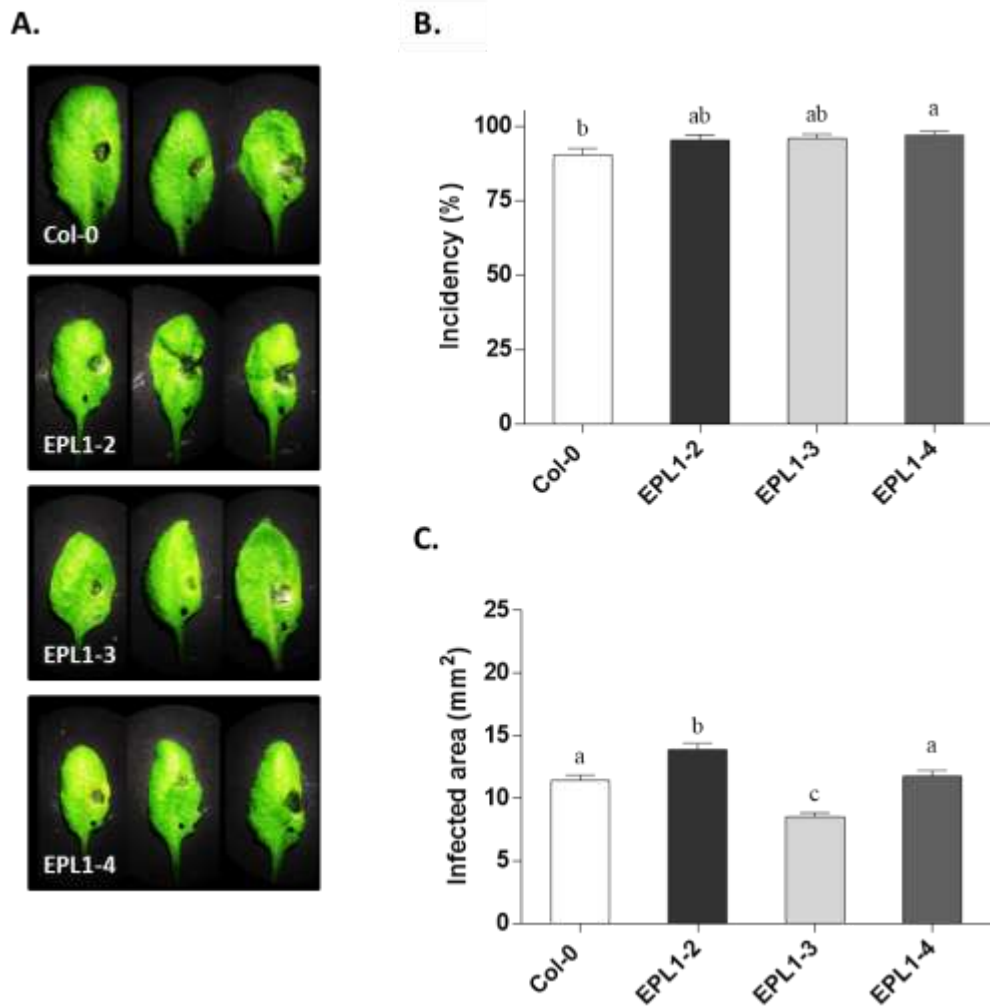


Figura 1. 3 TaEPL1 juega un papel en la resistencia contra hongos necrotróficos

Plantas de cuatro semanas de edad fueron inoculadas con *Botrytis cinerea* B05.10 a una concentración de 2×10^5 esporas/mL. **A.** Muestra de hojas representativas de los síntomas de infección 3 dpi. **B.** gráfica de incidencia de la infección. **C.** Área de daño causada por la infección. Los valores que se muestran son el promedio \pm SEM. Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey. El experimento se realizó al menos tres veces con resultados similares en cada ocasión.

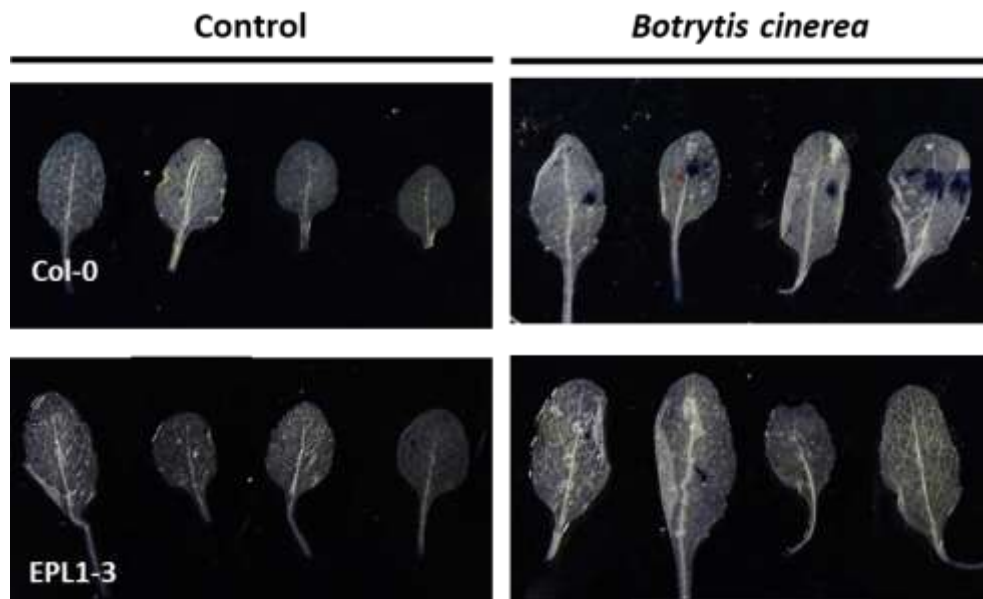


Figura 1. 4 La línea EPL1-3 presenta un retraso en la infección con *Botrytis B05.10*

Plantas de cuatro semanas de edad fueron inoculadas con una gota de *Botrytis cinerea* B05.10 a una concentración de 2×10^5 esporas/mL. Después de 24 h de inoculación se recolectaron muestras de hojas y se sometieron a la tinción con azul de tripano para revelar muerte celular causada por el hongo. Las fotografías se tomaron una semana después de los lavados con etanol 98% hasta que las hojas fueron totalmente incoloras. La línea transgénica EPL1-3 presentan menos síntomas de infección en comparación con la planta control Col-0.

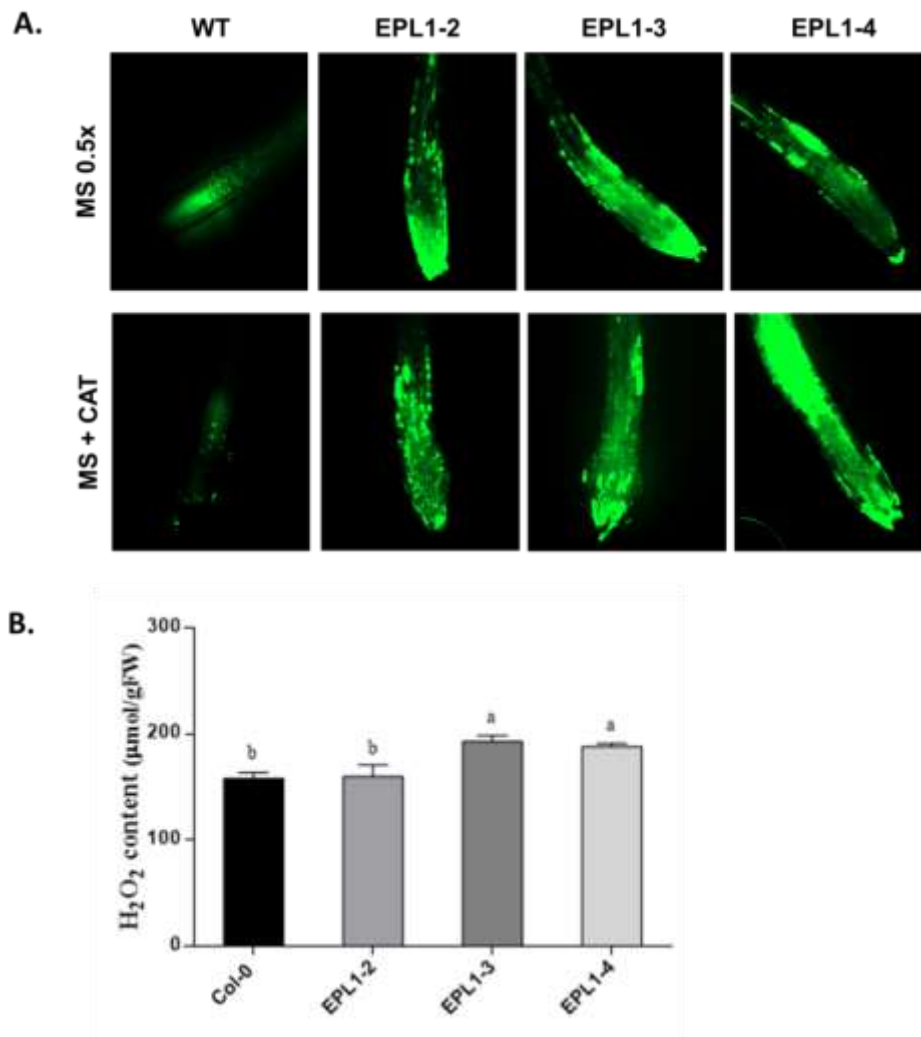


Figura 1. 5 Las líneas transgénicas 35S::TaEPL1 tienen niveles elevados de H₂O₂

Se evaluó la cantidad de especies reactivas de oxígeno en plántulas de 10 días de edad **A.** Método cualitativo con tinción de DCFH₂-DA. La aplicación exógena de catalasa no afecta el contenido de H₂O₂ en las líneas transgénicas, en comparación con la planta silvestre que no posee a la proteína EPL1. Se muestran imágenes representativas del tratamiento. **B.** Ensayo cuantitativo con KI para evaluación espectrofotométrica de los niveles endógenos de peróxido de hidrógeno. Las barras representan el promedio ± SEM. Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey. El experimento se realizó al menos tres veces con el mismo patrón de comportamiento en cada réplica.

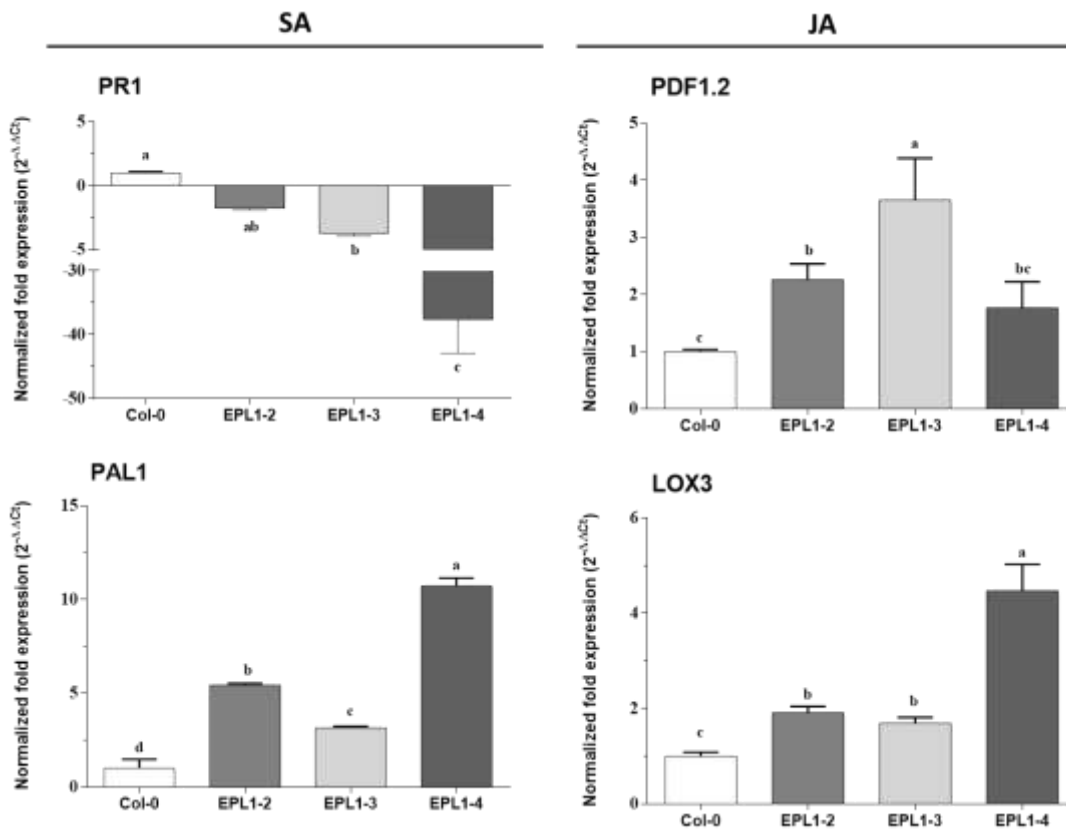


Figura 1. 6 Expresión relativa de los niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de *Arabidopsis thaliana* 35S:TaEPL1

Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las vías de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA). *PR1* que es un gen río abajo en la vía de señalización del SA se encuentra reprimido en todas las líneas. Mientras *PAL1* un gen de biosíntesis de SA se encuentra inducido. Además *LOX3* y *PDF1.2a* que corresponden a genes de la vía de biosíntesis y señalización de JA respectivamente, se encuentran ambos inducidos en las plantas transgénicas. La expresión relativa se determinó mediante qRT-PCR utilizando SYBR Green en plantas de 15 días de edad sin ningún tipo de tratamiento germinadas en medio 0.5x MS. Los valores representan la expresión relativa del gen TaEPL1 de cada línea transgénica con respecto al gen control de UBQ5 ([At3g62250](#)). Las barras representan el promedio \pm SEM (n=3). Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey.

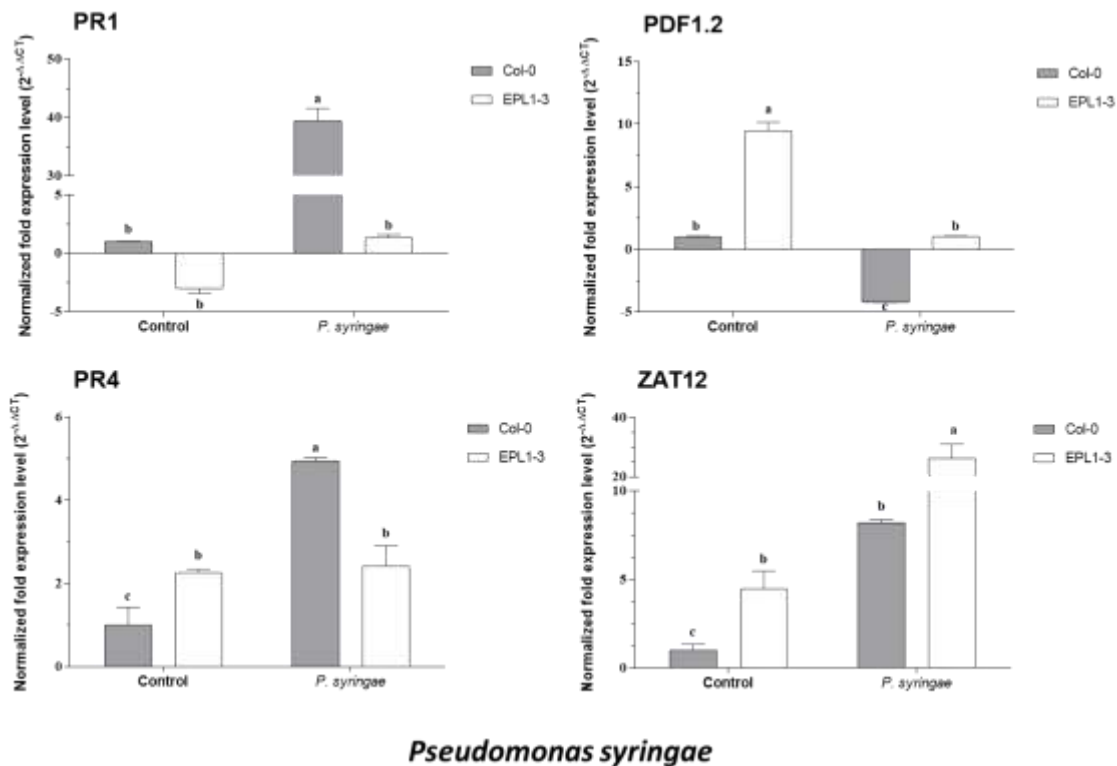


Figura 1. 7 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con *Pst* DC3000

Niveles de expresión de genes relacionados a defensa antes de la infección (control, T=0h) y después de 24h de interacción con los patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000. Comparación entre la línea tipo wt y la planta transgénica EPL1-3, que es la más resistente a ambos patógenos. Se tomó un gen de la vía de SA (*PR1*), uno de la vía de JA (*PDF1.2*). Además de uno de la vía de ET (*PR4*) y otro de la señalización de ROS (*ZAT12*). Con excepción de *PR1* que se encuentra reprimido en el T=0 h, los otros tres genes se encuentran inducidos en la línea EPL1-3. Sólo *PDF1.2* y *ZAT12* continúan inducidos después de la interacción con *Pst* DC300. La expresión relativa se determinó mediante qRT-PCR utilizando SYBR Green en plantas de 4 semanas de edad. Los valores representan la expresión normalizada del gen indicado en cada línea transgénica con respecto al gen control de UBG5 ([At3g62250](#)) y al valor correspondiente del gen en la línea Col-0. Las barras representan el promedio \pm SEM (n=3). Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey.

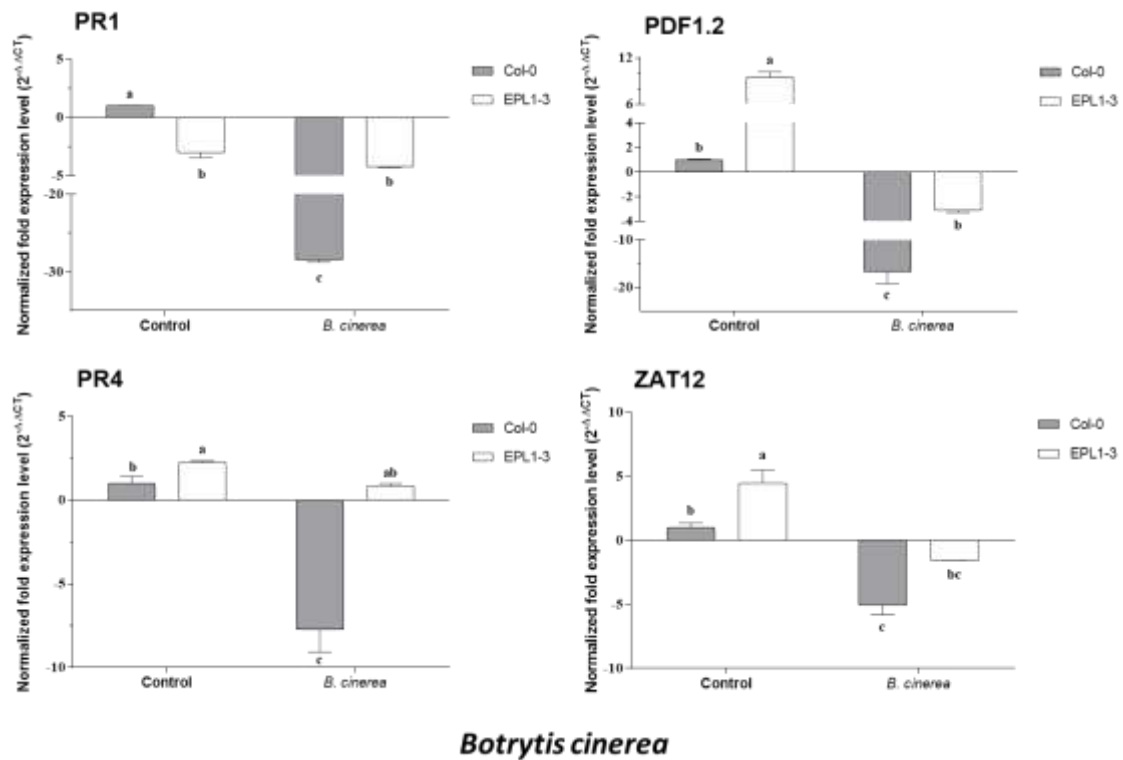


Figura 1. 8 Niveles de expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de EPL1-3 después de la interacción con *Botrytis cinerea*

Niveles de expresión de genes relacionados a defensa antes de la infección (control, T=0 h) y 24 h después de interacción con el patógeno *Botrytis cinerea* B05.10. Comparación entre la línea tipo *wt* y la planta transgénica EPL1-3, resistente a *Botrytis*. Se tomó un gen de la vía de SA (*PR1*), uno de la vía de JA (*PDF1.2*), uno de la vía de ET (*PR4*) y otro de señalización de ROS (*ZAT12*). *PR1* que se encuentra reprimido antes y después de la infección, los otros tres genes se encuentran inducidos en la línea EPL1-3 en el T=0 h, pero después de la interacción con el hongo los niveles disminuyen hasta un nivel basal y no hay diferencias con la línea control en T=0 h y la planta transgénica EPL1-3 T=24 h, pero los niveles se reprimen en la planta Col-0 después del tratamiento con el hongo. La expresión relativa se determinó mediante qRT-PCR utilizando SYBR Green en plantas de 4 semanas de edad. Los valores representan la expresión relativa del gen correspondiente de cada línea transgénica con respecto al gen control de UHQ5 ([At3g62250](#)) y la normalización con respecto al valor de ese gen en Col-0. Las barras representan el promedio \pm SEM (n=3). Las letras representan diferencias significativas entre las muestras de acuerdo con el test de ANOVA de una sola vía con la prueba de Tuckey.

1.6 DISCUSIÓN

1.6.1 EPL1 confiere resistencia a enfermedades en las plantas de Arabidopsis que sobreexpresan el elicitor contra varios tipos de patógenos

Las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen EPL1 fueron más resistentes a la infección con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* DC3000, y además la línea EPL1-3 fue también más resistente a la infección de *Botrytis cinerea* B05.10, en comparación con la línea parental Col-0. Estos resultados concuerdan con un reporte previo donde la expresión heteróloga de la proteína Sm1 de *Magnaporthe grisea* (MgSM1) en plantas de Arabidopsis [47] confiere resistencia de amplio espectro a las plantas transgénicas. Sin embargo, *M. grisea* se trata de un hongo fitopatógeno que causa enfermedad severa en arroz y otros pastos, mientras que las especies del género *Trichoderma* son ampliamente utilizadas como agentes de biocontrol [16,19,38,48,49], y su uso es importante en el agricultura actual [50] e incluso algunas enzimas producidas por especies de este género son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la FDA. Por otro lado, la expresión del gen *SM1* de *M. grisea* se realizó bajo un promotor inducible, ya que grandes cantidades de la proteína producen una respuesta hipersensible, mientras que, para el caso de las proteínas TaEPL1 y TvSM1 no se ha detectado este efecto, es decir, se ha demostrado que la aplicación exógena de la proteínas EPL1 y SM1 purificadas y disueltas en agua, tratando diferentes plantas como maíz [22], tabaco, algodón y cacahuate [35] no producen un efecto fitotóxico.

1.6.2 La resistencia en las plantas transgénicas 35S::TaEPL1 es directamente proporcional a la expresión del gen EPL1

Las plantas transgénicas que sobreexpresan *EPL1* son más resistentes al ataque de patógenos, en particular la línea EPL1-3. Que además de ser la línea menos susceptible a patógenos también correlaciona con ser la línea que presenta los niveles de transcrito del mRNA de EPL1 más elevados. EPL1-3 es resistente a la bacteria biotrófica *P. syringae pv. tomate* DC3000 y además fue también más resistente a la infección del hongo necrotrófico *B. cinerea* B05.10, lo cual es un indicio de que EPL1 confiere resistencia de amplio espectro a las plantas transgénicas. De esta manera se cree que la menor susceptibilidad que genera el elicitor puede deberse a un retraso en la infección, ya que en la infección por *Pst* DC3000 la cantidad de bacterias presentes dentro de la hoja de la línea EPL1-3 es la mitad en comparación con las bacterias presentes en la planta parental. Asimismo la infección dada por el hongo se ve retardada, ya que al momento de evaluar la incidencia de la infección de *B. cinerea* esta sí es detectable, pero el daño que presentan las hojas de estas planta es menor que en las otras líneas.

1.6.3 La expresión de TaEPL1 puede inducir la expresión de genes relacionados a defensa en las plantas de Arabidopsis.

Las plantas que sobreexpresan al elicitor EPL1 cuentan con niveles basales inducidos de genes relacionados a defensa, tanto de la vía del ácido salicílico (PAL1) como de la vía del ácido jasmónico (PDF1.2 y LOX3), pues aún antes de estar expuestas a algún tratamiento ya se observa una mayor acumulación de estos transcritos en comparación con la línea parental. Dicha acumulación se mantiene o se potencia después de la interacción con patógenos.

Además al analizar los niveles basales de expresión de genes relacionados a defensa también se observa que la línea EPL1-3 la que posee una mayor acumulación del transcrito EPL1 es también la que posee niveles más elevados del transcrito PDF1.2, sugiriendo un posible papel de activación de EPL1 sobre PDF1.2, un marcador muy importante de la vía JA.

1.6.4 La sobreexpresión de EPL1 confiere un estado de priming a las líneas transgénicas.

Una característica común en las respuestas de resistencia inducidas por microorganismos benéficos como *Trichoderma* es el '*priming*' [51], que se trata de la activación de las defensas de la planta dependiente de ácido jasmónico en forma previa al contacto con un patógeno retador. Esto hace que la planta pueda defenderse de una forma más rápida y más robusta.

De hecho este '*priming*' podría explicar en primer lugar porque son los genes de la vía del JA los que se encuentran más inducidos y en segundo lugar porque no es necesario que los niveles de transcrito de genes relacionados a defensa se eleven de manera repentina como lo hacen en la planta parental después del tratamiento con patógenos. Esto se debe a que de cierta manera ya se encuentran listas las defensas de la planta para responder, y por eso lo hacen de una manera más efectiva y sin restar recursos importantes a otras funciones del crecimiento y desarrollo de la planta.

Previamente ya había sido reportado que la actividad protectora de Sm1 (y elicitors ortólogos) está asociada con la acumulación de especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos, además de con un aumento en los de la

transcripción de genes de defensa regulados por SA y JA/ET, así como en los genes involucrados en la biosíntesis de fitoalexinas [3,15,35]. Con estos reportes aquí mencionados se tiene evidencia de que estos elicitores están implicados en la inducción de ISR, sin embargo, los mecanismos subyacentes aún siguen siendo desconocidos. Pero se puede considerar que la expresión del elicitador EPL1 en las plantas las predispone a un estado de *'priming'* pues genes relacionados a defensa ya se encuentran inducidos, además de que hay una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

1.7 CONCLUSIÓN

EPL1 es un excelente candidato para utilizarse como molécula que provee protección contra enfermedades en plantas. Podría ser de bastante interés en cultivos de interés agrícola por su capacidad de conferir resistencia de amplio espectro y además de no mostrar evidencia hasta el momento de ser perjudicial para el desarrollo de la planta.

CAPÍTULO 2

Localización celular y formación del dímero del elicitor TaEPL1 de *Trichoderma atroviride* en células vegetales.

Rojas-Moreno Mónica M. y Jiménez-Bremont Juan Francisco¹

Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, División de Biología Molecular,
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí,
México.

¹ Autor de correposndencia: Juan Francisco Jiménez Bremont email:
jbremont@ipicyt.edu.mx

Revista:
Biochemical and Biophysical Research Communications

2.1 RESUMEN

La interacción Arabidopsis-Trichoderma proporciona beneficios para la planta, entre ellos la activación de las respuestas de defensa de la planta. EPL1 es un elicitor secretado por *Trichoderma atroviride* que pertenece a la familia de las cerato-plataninas. Existen evidencias que apuntan a que esta proteína se encuentra involucrada en la resistencia a enfermedades causadas por patógenos, sin embargo hasta el momento se desconoce su localización celular dentro de la planta. En este proyecto se explora la localización celular de la proteína EPL1 en células vegetales para elucidar cuál es el mecanismo de acción de este elicitor dentro de la planta. Para ello se analizó la expresión de la proteína fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) y también el sistema de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC) para evaluar la formación de dímero. Puesto que, previamente se ha propuesto que el elicitor EPL1 se encuentra de manera natural como un dímero es necesario analizar la formación del dímero dentro de las plantas y los posibles motivos de la proteína que podrían estar involucrados en la formación de agregados y potencialmente afectar su localización celular. Las construcciones para llevar a cabo estos experimentos se han diseñado y producido con la finalidad de determinar la localización celular de la fusión TaEPL1:GFP se localiza en la célula vegetal. Además determinar el papel de los motivos de la proteína como el péptido señal y su implicación en la formación del dímero y en la localización celular de TaEPL1.

Palabras clave. *efectores, cerato-plataninas, localización celular, BiFCs*

2.2 ABSTRACT

The Arabidopsis-Trichoderma interaction provides benefits to the plant, among them the activation of the plant defense responses. EPL1 is an elicitor that belongs to the Cerato-platanin protein family secreted by *Trichoderma atroviride*. Current evidence proposes that this protein is involved in pathogen disease resistance, however, until now; its cellular location within the plant is unknown. In this project, the EPL1 cellular localization in plant cells is explored. To this end, the expression of the protein fused with the green fluorescent protein (GFP) as well as the Bimolecular Fluorescence Complementation system (BiFC) to evaluate dimer formation was analyzed. Since it has been previously proposed that the EPL1 elicitor is naturally found as a dimer, is necessary to assess the dimer formation within plants and the possible motives of the protein that could be involved in the aggregation and potentially affect the protein cellular localization. The genetic constructions to accomplish this experiments have been designed and produced to revealed the TaEPL1:GFP fusion localization in the plant cell. Furthermore, to analyze the role of the proteins motifs like the signal peptide and its implication in dimer formation and cellular localization of TaEPL1.

Keywords. *effectors, cerato-platanins, cellular localization, BiFCs*

2.3 INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran en constante comunicación con los microorganismos con los cuáles interaccionan [1]. Los principales microorganismos con los cuáles interactúan las plantas son con los habitantes de la rizósfera [13,52] como es el caso de los hongos del género *Trichoderma* [15,53]. Los hongos filamentosos de este género colonizan las raíces de plantas mono- y dicotiledóneas, y esto resulta en cambios significativos en el metabolismo de la planta, alterando el contenido de hormonas, azúcares solubles, compuestos fenólicos, aminoácidos y poliaminas; la tasa de fotosíntesis, transpiración y contenido de agua [15,51,54]. Dadas las circunstancias de que *Trichoderma* puede colonizar una amplia gama de hospederos, es de esperarse que hayan evolucionado estrategias eficientes para superar la inmunidad de la planta y establecer un ambiente apropiado para adquirir nutrientes y reproducirse.

Estos hongos son productores prolíficos de metabolitos secundarios, se han identificado más de 300 compuestos, pero la mayoría de ellos aún tienen función desconocida [15,49]. Entre los compuestos identificados se encuentran las proteínas elicitoras sin actividad proteolítica Sm1 y Epl1, producidas por *Trichoderma virens* y *T. atroviride* respectivamente [21,35]. Ambas proteínas pertenecen a la familia de proteínas de las cerato-plataninas (CPs) [21,24–27] y comparten un 80% de identidad entre ellas.

La primer proteína descrita de esta familia fue la Cerato-Platanina (CP) de *Ceratocystis fimbriata f. sp. platani* [55], y a partir de ella se han identificado tanto en hongos benéficos como patógenos de plantas [56]. Todas las proteínas de esta familia poseen un péptido señal, una longitud entre 105-134 aminoácidos y cuatro

cisteínas conservadas involucradas en la formación de puentes disulfuro, además son secretadas al espacio extracelular y se encuentran involucradas en la interacción hongo-hospedero [24].

Las plantas han evolucionado la capacidad de reconocer CPs y activar respuestas de defensa cuando entran en contacto con ellas, actuando como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [26], es decir, son moléculas ampliamente reconocidas como elicitoras de las respuestas de defensa.

EL gen *epl1* de *T. atroviride* contiene un ORF de 417 pb interrumpido por un intrón (63 pb). El gen codifica para una proteína de 138 aminoácidos y contiene una secuencia predicha de péptido señal de 18aa en el extremo N-terminal [21].

Existen numerosas evidencias del papel protector de las proteínas Epl1 y Sm1 que exporta *Trichoderma* [21,22,30,35–38] a las plantas. La habilidad de estas moléculas de inducir respuestas de defensa en la planta se comprobó por Vargas et al. (2008), ellos describen que existe una relación entre en el estado oligomérico de las proteínas y su función. Además análisis bioquímicos de Sm1 de *T. virens* y Epl1 de *T. atroviride* indican que Sm1 es producido como un monómero y tiene un motivo que sufre N-glicosilación, el cual no está presente en su ortólogo Epl1 que es producido como dímero, lo cual sugiere que la glicosilación en ese sitio da un impedimento estérico para la formación del dímero. De hecho parece haber una correlación entre la presencia del sitio de glicosilación y la habilidad para formar agregados. Estos datos sugieren que la dimerización puede controlar el diálogo molecular planta-*Trichoderma* y bloquear la activación de la resistencia sistémica inducida en las plantas [22]. Incluso se propone que Sm1 es más activo,

ya que la forma monomérica es más eficiente en la elicitación de respuestas de defensas de la planta.

Hasta este momento se tiene evidencia que la expresión heteróloga de la proteína EPL1 de *T. atroviride* en plantas de *Arabidopsis thaliana* provee protección contra agentes patógenos tanto biotróficos (*Pseudomonas syringae*) como necrotróficos (*Botrytis cinerea*) (Capítulo 1 de esta tesis). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular de su papel de acción dentro de la célula vegetal.

Es un axioma fundamental de la biología que la estructura tridimensional de una proteína determina su función. Además la localización de una proteína en la célula también provee información valiosa de su función. Si un producto génico es nuclear, citoplásmico, mitocondrial, o se localiza en la membrana plasmática, por ejemplo, o especialmente si su localización cambia en diferentes estadios de la célula, entonces se puede inferir sobre las vías en las cuales la proteína participa [57]. Es por esto que el propósito de este trabajo es determinar la localización intracelular de la proteína EPL1 en células vegetales, y la formación del dímero en planta. Es importante mencionar que muchas proteínas funcionan en interacción con otras proteínas, incluso formando homodímeros como se ha reportado para EPL1; no se ha demostrado la formación de los dímeros de EPL1 *in planta*.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Semillas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) se crecen esparcidas en una mezcla de suelo con Sunshine mezcla comercial #3: vermiculita: perlita (3:1:1) en condiciones ambientales tipo invernadero bajo un fotoperíodo largo 16 horas luz / 8 horas oscuridad a $22\pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.4.2 Diseño de los vectores para la construcción de las fusiones traduccionales con GFP

A partir del vector de entrada pCR8-Epl1 (Capítulo 1 de esta tesis) que posee la proteína de interés Epl1 se recombino con ayuda de la enzima LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) en el vector destino pMDC43 [39] con el cual se obtiene la fusión traduccional de la proteína EPL1 con la proteína GFP. Además a partir del mismo plásmido pCR8-Epl1 se hizo la amplificación del fragmento del gen que corresponde a la proteína EPL1 sin los primeros 18 aminoácidos que corresponden al péptido señal (wsEpl1) con el oligo *wsEpl1-Fw* 5´ATGTACGATACCGGCTACGATGAC3´ y el oligo *EPL1-Rv*, este fragmento es de 354pb, es decir que se le han quitado los primeros 22aa, dando lugar a una proteína de 117aa; siguiendo una estrategia similar al caso anterior se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen), y posteriormente fue transferido al vector pMDC43 [39] para hacer la fusión traduccional de la proteína wsEpl1 con GFP. Ambas construcciones [pMDC43:Epl1] y [pMDC43:wsEpl1] fueron transformadas por separado en células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa

GV3101, las cuáles serán empleadas para la expresión transitoria de la proteína en planta.

2.4.3 Diseño de los vectores BiFC

Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC), esta técnica consiste en separar a la proteína fluorescente en dos segmentos no fluorescentes por sí mismos, el N-terminal y el C-terminal a los cuáles se les fusiona las proteínas de las que se desea saber si interactúan, si existe tal interacción dada la proximidad de ambas proteínas, la proteína fluorescente es capaz de reconstituirse y se observa la emisión de la fluorescencia. En este caso se han utilizado los vectores proporcionados por Ferrando y sus colaboradores, los cuales son adecuados para uso del sistema BiFC en planta. Se hizo la clonación de Epl1 en pYFC43 (extremo C-terminal de la proteína GFP) y también en pYFN43 (extremo N-terminal de la proteínas GFP) para hacer la fusión traduccional de la proteína Epl1 con el extremo respectivo de la proteína fluorescente. Además se sigue el mismo protocolo para la obtención de pYFC43:wsEpl1 y pYFN43:wsEPI1, haciendo la recombinación a partir del vector de entrada pCR8-Epl1 y pCR8-wsEPI1 con ayuda de la enzima LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). Todas las construcciones son transformadas por separado en células de *A. tumefaciens* cepa GV3103 para su transfección en plantas de tabaco y/o cebolla [58,59].

2.5 DISCUSIÓN

2.5.1 Se tienen realizadas las construcciones necesarias para llevar a cabo la expresión transitoria de una proteína en células vegetales.

Determinar la localización celular de una proteína puede ayudar a elucidar su papel de acción dentro de la célula. Un método comúnmente usado es fusionar la secuencia que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP) a un extremo de la secuencia del gen en cuestión, y utilizar la fluorescencia intrínseca de GFP para monitorear dónde se encuentra la proteína dentro de la célula *in vivo* [57]. Empleando esta estrategia de fusión traduccional y la expresión transitoria de una proteína en tejido vegetal, se elucidará la localización de EPL1 la célula vegetal. Además es importante determinar la localización celular de la proteína trunca que no posee el péptido señal ya que se ha reportado que este péptido señal etiqueta a la EPL1 como una proteína extracelular e incluso existe evidencia de que Epl1 de *Trichoderma harzianum* es acarreada a través de vesículas y transportada a la pared celular del hongo a lo largo de las hifas [60]. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de cómo es que Epl1 se comporta una vez que se encuentra dentro de la célula vegetal. Se sabe que durante la interacción Trichoderma-planta, el hongo es capaz de penetrar las primera capaz de la epidermis de la raíz de la planta e incluso sobrevivir como un organismo endófito [19,48,61] y ahí es donde ocurre el intercambio de compuestos que lleva a cabo el diálogo molecular entre ambos organismos. Para EPL1 se ha comprobado su capacidad de promover la activación de genes de defensa y la disminución de síntomas de infección [22,62], del mismo modo que lo hemos comprobado en las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* 35S::TaEPL1 (Ver Capítulo 1). Sin

embargo, se sabe muy poco de cómo se da el reconocimiento del elicitor por la planta, se ha sugerido que es reconocido por la célula vegetal [22] y que debe entrar, provocando una acumulación de ROS y desencadena las respuestas de defensa de la planta. En este caso, la presencia de EPL1 en la célula vegetal durante la expresión transitoria de la proteína en plantas nos podría proveer pistas sobre su posible función. Además se tiene evidencia de que la sobreexpresión de EPL1 en plantas induce la respuesta de genes de defensa (Capítulo 1 de esta tesis) y provoca la acumulación de ROS.

2.5.2 Formación del dímero EPL1 y localización en la célula vegetal

El hongo *Trichoderma virens* secreta una proteína llamada Sm1 la cual carece de toxicidad contra la planta y microbios; por el contrario, activa la producción de especies reactivas de oxígeno en plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas (arroz, maíz y algodón) e induce la expresión de genes relacionados con la defensa tanto local como sistémica [35–37]. Epl1 es homóloga a Sm1 y es secretada por *T. atroviride* [21]. La habilidad de estas moléculas de inducir respuestas de defensa en la planta se comprobó por Vargas et al. (2008), ellos describen que existe una relación entre en el estado oligomérico de las proteínas y su función [22], por lo que es de nuestro interés determinar si la proteína se comporta como un dímero dentro de la célula vegetal. Es por esa razón que quisimos investigar si una vez que la proteína se expresa dentro de la célula vegetal se forman agregados o si se mantiene como monómero, puesto que se ha reportado al monómero como la forma activa de la proteína. Para este propósito de utilizó el sistema Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC)

[58,63,64] para determinar si existe interacción entre la proteína consigo misma, formando un homodímero.

En este punto se tienen las construcciones de los vectores necesarios, tanto de la proteína completa, como de la proteína trunca. Para determinar si el péptido señal posee una función en la formación del dímero y en la localización celular del mismo.

Además es necesario completar esta investigación con el análisis de los sitios de oxidación y glicosilación que se han reportado involucrados en la formación del dímero y afectar de alguna manera su localización celular (Ver Anexo 3).

2.6 CONCLUSIÓN

El papel de Epl1 dentro de la célula vegetal sigue siendo desconocido, sin embargo con estos experimentos se pretende obtener evidencia de la posible función que desempeña dentro de la célula. Los resultados de estos experimentos aunados a la evidencia que se tiene de que induce genes relacionados a defensa y la acumulación de ROS podría sugerir un papel en la activación y/o regulación de genes.

PERSPECTIVAS

1. Las plantas transgénicas de Arabidopsis 35S::TaEPL1 poseen niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sin embargo, es necesario determinar si presentan acumulación de otros compuestos como superóxido ($O_2^{\cdot-}$) o radical hidroxilo (OH^{\cdot}), por lo tanto, evaluar la presencia de esto permitiría establecer si la acumulación de ROS originada por EPL1 es exclusiva de H_2O_2 como molécula señalizadora, o si también incluye otras ROS para desencadenar una explosión oxidativa. Además podría ser útil la determinación del origen de la acumulación de ROS, midiendo la actividad de enzimas de la vía de detoxificación celular como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).
2. Evaluar otros genes involucrados en la señalización de ROS y la respuesta de defensa de la planta como AOS, UPOX, WRKY33, WRKY70, etc., para tratar de elucidar el mecanismo por el cual la presencia del elicitor TaEPL1 en las plantas transgénicas favorece la resistencia a enfermedades.
3. Definir si la presencia del elicitor TaEPL1 en las plantas transgénicas afecta los contenidos de fitoalexinas u otros compuestos de la planta involucrados en las respuestas de defensa de la planta.
4. Llevar a cabo la expresión transitoria de la proteína EPL1 en células vegetales, para comprobar su localización intracelular. Evaluar la formación del dímero tanto de la proteína completa, así como el papel de la proteína trunca en la localización celular y la formación del dímero.

5. Continuar con los análisis de los sitios de la proteína que están involucrados en la formación del dímero. El sitio de oxidación y el sitio de glicosilación. Evaluar la presencia de esto en la planta.
6. Analizar si la presencia de patógenos puede afectar la localización de la proteína y/o la formación del dímero en las células vegetales. Empleando un sistema transitorio en tabaco y un sistema estable en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan la proteína TaEPL1 fusionada con la proteína verde fluorescente GFP.
7. Hacer un estudio similar al aquí presentado pero con la proteína ortóloga SM1 de *Trichoderma virens*.

REFERENCIAS

- [1] R. Ortiz-Castro, H.A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, The role of microbial signals in plant growth and development, *Plant Signal. Behav.* 4 (2009) 701–712.
- [2] V. Verma, P. Ravindran, P.P. Kumar, Plant hormone-mediated regulation of stress responses., *BMC Plant Biol.* 16 (2016) 86. doi:10.1186/s12870-016-0771-y.
- [3] M. Thakur, B.S. Sohal, Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review, *ISRN Biochem.* 2013 (2013) 1–10. doi:10.1155/2013/762412.
- [4] S.T. Chisholm, G. Coaker, B. Day, B.J. Staskawicz, Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response, *Cell.* 124 (2006) 803–814. doi:10.1016/j.cell.2006.02.008.
- [5] T. Boller, G. Felix, A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors., *Annu. Rev. Plant Biol.* 60 (2009) 379–406. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.
- [6] P.N. Dodds, J.P. Rathjen, Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions, *Nat. Rev. Genet.* 11 (2010) 539–548. doi:10.1038/nrg2812.
- [7] E.M. Reimer-Michalski, U. Conrath, Innate immune memory in plants, *Semin. Immunol.* (2016) 1–9. doi:10.1016/j.smim.2016.05.006.
- [8] R. Hermosa, M. Belén Rubio, R.E. Cardoza, C. Nicolás, E. Monte, S. Gutiérrez, The contribution of Trichoderma to balancing the costs of plant growth and defense, *Int. Microbiol.* 16 (2013) 69–80. doi:10.2436/20.1501.01.181.
- [9] J.S. Thaler, P.T. Humphrey, N.K. Whiteman, Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 260–270. doi:10.1016/j.tplants.2012.02.010.

- [10] J.D.G. Jones, J.L. Dangl, The plant immune system, *Nature*. 444 (2006) 323–329. doi:10.1038/nature05286.
- [11] A. Garcia-Brugger, O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot, D. Wendehenne, A. Pugin, Early signaling events induced by elicitors of plant defenses., *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19 (2006) 711–724. doi:10.1094/MPMI-19-0711.
- [12] G.E. Harman, C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, M. Lorito, *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts., *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 43–56. doi:10.1038/nrmicro797.
- [13] C.M.J. Pieterse, C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C.M. Van Wees, P.A.H.M. Bakker, Induced systemic resistance by beneficial microbes., *Annu. Rev. Phytopathol.* 52 (2014) 347–75. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102340.
- [14] G.E. Harman, Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp., *Phytopathology*. 96 (2006) 190–194. doi:10.1094/PHYTO-96-0190.
- [15] H.A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, E. Del-Val, J. Larsen, Ecological functions of *Trichoderma* spp . and their secondary metabolites in the rhizosphere : interactions with plants, *FEMS Microbiol. Ecoly.* 92 (2016) 1–17. doi:10.1093/femsec/fiw036.
- [16] T. Benítez, A.M. Rincón, M.C. Limón, A.C. Codón, Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains, *Int. Microbiol.* 7 (2004) 249–260. doi:1139-6709.
- [17] Y. Brotman, U. Landau, Á. Cuadros-Inostroza, T. Takayuki, A.R. Fernie, I. Chet, A. Viterbo, L. Willmitzer, *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003221. doi:10.1371/journal.ppat.1003221.
- [18] 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, C.P. Kubicek, *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success, *Nat Rev Micro.* 9 (2011) 749–759. doi:10.1038/nrmicro2637.

- [19] M. Mukherjee, P.K. Mukherjee, B.A. Horwitz, C. Zachow, G. Berg, S. Zeilinger, Trichoderma-plant-pathogen interactions: Advances in genetics of biological control, *Indian J. Microbiol.* 52 (2012) 522–529. doi:10.1007/s12088-012-0308-5.
- [20] F. Vinale, K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, M.J. Barbetti, H. Li, S.L. Woo, M. Lorito, A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72 (2008) 80–86. doi:10.1016/j.pmpp.2008.05.005.
- [21] V. Seidl, M. Marchetti, R. Schandl, G. Allmaier, C.P. Kubicek, Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors, *FEBS J.* 273 (2006) 4346–4359. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05435.x.
- [22] W.A. Vargas, S. Djonović, S.A. Sukno, C.M. Kenerley, Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 19804–19815. doi:10.1074/jbc.M802724200.
- [23] N. Benhamou, Elicitor-induced plant defence pathways, *Trends Plant Sci.* 1 (1996) 233–240. doi:10.1016/1360-1385(96)86901-9.
- [24] H. Chen, A. Kovalchuk, S. Kerio, F.O. Asiegbu, S. Keriö, F.O. Asiegbu, Distribution and bioinformatic analysis of the cerato-platanin protein family in *Dikarya.*, *Mycologia.* 105 (2013) 1479–88. doi:10.3852/13-115.
- [25] A. Frischmann, S. Neudl, R. Gaderer, K. Bonazza, S. Zach, S. Gruber, O. Spadiut, G. Friedbacher, H. Grothe, V. Seidl-Seiboth, Self-assembly at air/water interfaces and carbohydrate binding properties of the small secreted protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 4278–4287. doi:10.1074/jbc.M112.427633.
- [26] I. Baccelli, S. Luti, R. Bernardi, A. Scala, L. Pazzagli, Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles?, *Front. Plant Sci.* 5 (2015) 2013–2016. doi:10.3389/fpls.2014.00769.
- [27] R. Gaderer, K. Bonazza, V. Seidl-Seiboth, Cerato-platanins: A fungal protein

- family with intriguing properties and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98 (2014) 4795–4803. doi:10.1007/s00253-014-5690-y.
- [28] H. Yu, L. Li, Phylogeny and molecular dating of the cerato-platanin-encoding genes, *Genet. Mol. Biol.* 37 (2014) 423–427. doi:10.1590/S1415-47572014005000003.
- [29] S. Luti, A. Caselli, C. Taiti, N. Bazihizina, C. Gonnelli, S. Mancuso, L. Pazzagli, PAMP activity of cerato-platanin during plant interaction: An -Omic approach, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17060866.
- [30] E.V. Gomes, M.D.N. Costa, R.G. de Paula, R. Ricci de Azevedo, F.L. da Silva, E.F. Noronha, C. José Ulhoa, V. Neves Monteiro, R. Elena Cardoza, S. Gutiérrez, R. Nascimento Silva, The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17998. doi:10.1038/srep17998.
- [31] J. Bigirimana, G. De Meyer, J. Poppe, Y. Elad, M. Höfte, Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*., *Med Fac Landbouww Univ Gent.* 62 (1997) 1001–1007.
- [32] Y. et al. De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*, *Eur. J. Plant Pathol.* 104 (1998).
- [33] G.E. Harman, R. Petzoldt, A. Comis, J. Chen, Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*., *Phytopathology.* 94 (2004) 147–153. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.147.
- [34] C.R. Howell, L.E. Hanson, R.D. Stipanovic, L.S. Puckhaber, Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*, *Phytopathology.* 90 (2000) 248–252. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.3.248.
- [35] S. Djonović, M.J. Pozo, L.J. Dangott, C.R. Howell, 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.* 19 (2006) 838–53. doi:10.1094/MPMI-19-0838.
- [36] S. Djonovic, M.J. Pozo, C.M. Kenerley, Tvbg3, a beta-1,6-glucanase from the biocontrol fungus *Trichoderma virens*, is involved in mycoparasitism and control of *Pythium ultimum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 7661–7670. doi:10.1128/AEM.01607-06.
- [37] S. Djonovic, M. V. Vargas, M. V Kolomiets, M. Horndeski, A. Wiest, C.M. Kenerley, A Proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize, *Plant Physiol.* 145 (2007) 875–889. doi:10.1104/pp.107.103689.
- [38] M. Shoresh, G.E. Harman, F. Mastouri, Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents, *Annu. Rev. Phytopathol.* 48 (2010) 21–43. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114450.
- [39] M.D. Curtis, U. Grossniklaus, A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta [w], *Plant Physiol.* 133 (2003) 462–469. doi:10.1104/pp.103.027979.specific.
- [40] X. Zhang, R. Henriques, S. Lin, Q. Niu, N. Chua, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 641–646. doi:10.1038/nprot.2006.97.
- [41] F. Katagiri, R. Thilmony, S. Yang He, The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction, in: *Arab. B.*, 2002: pp. 28–35. doi:10.1199/tab.0039.
- [42] L. Benikhlef, F. L’Haridon, E. Abou-Mansour, M. Serrano, M. Binda, A. Costa, S. Lehmann, J.-P. Métraux, J.-P. Métraux, F. L’Haridon, E. Aboumansour, M. Serrano, M. Binda, A. Costa, S. Lehmann, J.-P. Métraux, Perception of soft mechanical stress in *Arabidopsis* leaves activates disease resistance, *BMC Plant Biol.* 13 (2013) 133. doi:10.1186/1471-2229-13-133.
- [43] N. Fernández-Bautista, J.A. Domínguez-Núñez, M.M. Castellano Moreno, M. Berrocal-Lobo, Plant Tissue Trypan Blue Staining During Phytopathogen

Infection, Www.bio-protocol.org/e2078. 6 (2016) 1–7.
doi:10.21769/BioProtoc.2078.

- [44] W. Wang, J. Liu, CsPAO4 of *Citrus sinensis* functions in polyamine terminal catabolism and inhibits plant growth under salt stress, *Nat. Publ. Gr.* (2016) 1–15. doi:10.1038/srep31384.
- [45] S. Junglee, L. Urban, H. Sallanon, F. Lopez-Lauri, Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide, *Am. J. Anal. Chem.* 5 (2014) 730–736.
doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2014.511081>.
- [46] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method, *METHODS*. 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [47] Y. Yang, H. Zhang, G. Li, W. Li, X. Wang, F. Song, Ectopic expression of MgSM1, a Cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol. J.* 7 (2009) 763–777. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00442.x.
- [48] C.R. Howell, The nature and application of biocontrol microbes II : *Trichoderma* spp . Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases, *Phytopathology*. (2005) 178–180. doi:10.1094/PHYTO-96-0178.
- [49] J.L. Reino, R.F. Guerrero, R. Hernandez-Galan, I.G. Collado, Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 89–123. doi:10.1007/s11101-006-9032-2.
- [50] R.R. Waghunde, R.M. Shelake, A.N. Sabalpara, *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment, *African J. Agric. Res.* 11 (2016) 1952–1965. doi:10.5897/AJAR2015.10584.
- [51] Y. Brotman, J.G. Kapuganti, A. Viterbo, *Trichoderma*, *Curr. Biol.* 20 (2010) 390–391. doi:10.1016/j.cub.2010.02.042.
- [52] H.P. Bais, S.-W. Park, T.L. Weir, R.M. Callaway, J.M. Vivanco, How plants

communicate using the underground information superhighway, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 26–32. doi:10.1016/j.tplants.2003.11.008.

- [53] W.A. Vargas, J.C. Mandawe, C.M. Kenerley, Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants, *Plant Physiol.* 151 (2009) 792–808. doi:Doi 10.1104/Pp.109.141291.
- [54] F. Salazar-Badillo, D. Sánchez-Rangel, A. Becerra-Flora, M. López-Gómez, F. Nieto-Jacobo, A. Mendoza-Mendoza, J. Jiménez-Bremont, *Arabidopsis thaliana* polyamine content is modified by the interaction with different *Trichoderma* species., *Plant Physiol Biochem.* 95 (2015) 49–56. doi:10.1016/j.plaphy.2015.07.003.
- [55] L. Pazzagli, G. Cappugi, G. Manao, G. Camici, A. Santini, A. Scala, Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin, a New Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani**, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24959–24964.
- [56] I. Baccelli, L. Lombardi, S. Luti, R. Bernardi, P. Picciarelli, A. Scala, L. Pazzagli, Cerato-platanin induces resistance in *Arabidopsis* leaves through stomatal perception, overexpression of salicylic acid- and ethylene-signalling genes and camalexin biosynthesis, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0100959.
- [57] G.A. Petsko, D. Ringe, *Protein Structure and Function*, 1st ed., New Science Press, London, UK, 2004.
- [58] B. Belda-Palazo, L. Ruiz, E. Martí, A.F. Tiburcio, S. Tárraga, F. Culiáñez, R. Farras, P. Carrasco, A. Ferrando, Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells, *PLoS One.* 7 (2012) e46907. doi:10.1371/journal.pone.0046907.
- [59] K. Xu, X. Huang, M. Wu, Y. Wang, Y. Chang, K. Liu, J. Zhang, Y. Zhang, F. Zhang, L. Yi, T. Li, R. Wang, G. Tan, C. Li, A rapid, highly efficient and economical method of *Agrobacterium*-mediated in planta transient transformation in living onion epidermis, *PLoS One.* 9 (2014) 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0083556.

- [60] M.B. Rubio, R. Hermosa, J.L. Reino, I.G. Collado, E. Monte, Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity, *Fungal Genet. Biol.* 46 (2009) 17–27. doi:10.1016/j.fgb.2008.10.008.
- [61] H. Bae, R.C. Sicher, M.S. Kim, S.-H. Kim, M.D. Strem, R.L. Melnick, B.A. Bailey, The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 3279–3295. doi:10.1093/jxb/erp165.
- [62] M. a. Salas-marina, M.I.M.I. Isordia-Jasso, M. a. M.A. Islas-osuna, P. Delgado-Sánchez, J.F. Jiménez-Bremont, M. Rodríguez-Kessler, M.T. Rosales-Saavedra, A. Herrera-Estrella, S. Casas-Flores, P. Delgado-sánchez, The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*, *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 1–13. doi:10.3389/fpls.2015.00077.
- [63] N. Ohad, K. Shichrur, S. Yalovsky, The Analysis of Protein-Protein Interactions in Plants by Bimolecular Fluorescence Complementation, *PLANT Physiol.* 145 (2007) 1090–1099. doi:10.1104/pp.107.107284.
- [64] T.K. Kerppola, Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as Probe of Protein Interactions in Living Cells, *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008) 465–487. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842.BIMOLECULAR.
- [65] J.D. Masucci, J.W. Schiefelbein, The rhd6 Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process', (1994) 1335–1346.
- [66] H.A. Contreras-Cornejo, L. Macías-Rodríguez, C. Cortés-Penagos, J. López-Bucio, *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 149 (2009) 1579–1592.

doi:10.1104/pp.108.130369.

- [67] K.L. Heckman, L.R. Pease, Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension, *Nat. Protoc.* 2 (2007). doi:10.1038/nprot.2007.132.

ANEXO 1

Generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* 35S:EPL1-GFP

El experimento se realizó para obtener líneas transgénicas de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* las cuáles expresan de forma heteróloga estable la proteína de interés Epl1 del hongo *Trichoderma atroviride* fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP). Esto es importante para comprobar que la localización intracelular que se observa de la proteína con la expresión heteróloga transitoria de la proteína Epl1 se mantiene con una expresión constitutiva en la planta modelo. Para este propósito se utilizó la técnica de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El gen Epl1 se encontraba clonado en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) (ver Materiales y Métodos). La clona fue recombinada con el vector destino pMDC43, —que proporciona la secuencia de GFP en el extremo C-terminal— [39] empleando la enzima LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). La cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* fue transformada mediante electroporación con el plásmido pMDC43-EPL1, se recuperó la clona mediante selección con Rifampicina + Ampicilina. Posteriormente plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 fueron transformadas empleando estas células con el método de 'floral dip' [40]. Las líneas transgénicas fueron seleccionadas en medio 0.5xMS suplementado con 50mg/mL Higromicina. Las plantas transgénicas 15 días después de germinar se crecen en macetas con mezcla Sunshine comercial mezcla #3: vermiculita: perlita (3:1:1) en condiciones ambientales controladas humedad y temperatura a 23±2°C, con un fotoperíodo de 16 horas luz (300µmol m⁻² s⁻¹ PPF) 8 horas oscuridad.

De las plantas transformadas inicialmente se recuperaron seis tubos de semilla. De los cuáles después del primer pase con el factor de selección (50mg/mL Higromicina) se obtuvieron 17 líneas que posiblemente poseen la inserción. A partir de estas líneas se volvieron a sembrar en higromicina cuatro de ellas para obtener plantas transgénicas homocigotas con el gen EPL1 fusionado con GFP, es decir la generación T2.

Aún no se ha realiza la genotipificación de las líneas, ni se ha comprobado con microscopía la localización intracelular de la proteína EPL1.

ANEXO 2

Generación de líneas transgénicas 35S::EPL1 sobre el fondo mutante *rhd6* de *Arabidopsis thaliana*

El experimento se realizó para obtener líneas transgénicas que expresan la proteína Epl1 de *Trichoderma atroviride* en la planta con el fondo mutante *rhd6* de *Arabidopsis thaliana*. La línea *rhd6* también conocida como deficiente en pelos radiculares (*Root Hair Deficient 6*) es mutante el factor de transcripción RHD6 ([AT1G66470.1](#)) que se acumula en las células H (*hair-forming cells*) de la raíz, por lo tanto estas plantas no poseen pelos radiculares. Sin embargo, se ha demostrado que este fenotipo es revertido por la adición de auxinas o precursores de etileno [65], por lo que esta línea es una herramienta para analizar el mecanismo de acción de compuestos relacionados a las auxinas. Además se tiene evidencia de *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* producen compuestos con actividad de auxinas [66]. Es por esto que la intención de este experimento es tratar de elucidar el papel de la proteína Epl1 en la red de señalización de fitohormonas de la planta.

Para esto se empleó la cepa de GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens* que posee el vector pMDC32-EPL1 (ver Materiales y Métodos, Capítulo 1 de esta tesis) para llevar a cabo la transformación de plantas mediante la técnica de 'floral dip' [40] para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana rhd6*. Las semillas transgénicas fueron seleccionadas en medio 0.5xMS suplementado con 50mg/mL Higromicina. Las plantas transgénicas 15 días después de germinar se crecen en macetas con mezcla Sunshine comercial mezcla #3: vermiculita: perlita (3:1:1) en

condiciones ambientales controladas humedad y temperatura a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 horas luz ($300\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) 8 horas oscuridad. De las plantas transformadas inicialmente se recuperaron dos tubos de semilla (rhd6:EPL1). De los cuáles después del primer pase con el factor de selección (50mg/mL Higromicina) se obtuvieron 7 líneas que posiblemente poseen la inserción.

Hasta el momento no se han generado líneas homocigotas ni se ha comprobado la transformación de las líneas por genotipificación.

ANEXO 3

Papel del motivo de glicosilación y el sitio de oxidación de EPL1

En un estudio previo (Vargas et al., 2008) se compararon las secuencias de los dos elicitores más conocidos producidos por hongos del género *Trichoderma*, que son Sm1 secretado por *T. virens* y Epl1 secretado por *T. atroviride*. Las dos proteínas poseen un 81% de identidad y se determinó que Sm1 tiene una asparagina (N) en la posición 29 mientras que en Epl1 se encuentra sustituido por un ácido aspártico (D), este cambio de aminoácido se dice que está relacionado con la tendencia de Epl1 para formar dímero, en cuanto que la asparagina sufre N-glicosilación y por lo tanto Sm1 no es capaz de formar dímero de forma natural debido a un impedimento estérico. Además Epl1 tiene en la posición 53 un triptófano (W) seguido de una glutamina (Q) lo cual permite que este Trp sea oxidado, y este tipo de motivo se ha reportado como relacionado con la formación de agregados. En el caso de Sm1, tiene el mismo triptófano, pero es seguido por una serina (S) y debido a esto no es oxidado, y por lo tanto se dice que no es capaz de llevar a cabo la formación del dímero ([Ilustración 2](#)). Es de nuestro interés analizar los dos motivos de la proteína Epl1 descritos anteriormente: el sitio de N-glicosilación y el posible sitio de oxidación de la proteína de Epl1, así como estudiar la formación del dímero y la participación de estos motivos en la formación de agregados. Para el análisis del péptido señal se realizarán las mutaciones puntuales de cambio de aminoácido empleando los oligos descritos en la Tabla 2, empleando la técnica de PCR de fusión [67] para obtener las mutaciones deseadas. Después de la amplificación las tres versiones mutadas Gli-

EPL1, Oxi-EPL1 y la doble mutada GliOxi-EPL1 fueron clonadas en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). En este momento ya se tienen las muestras clonadas en el vector de entrada, sin embargo, falta analizar las secuencias (parece ser que la enzima utilizada no es de tan alta fidelidad y no se logró obtener las mutaciones deseadas). Una vez que se compruebe la secuencia, se realizará la recombinación en los vectores de expresión del sistema BiFC, para analizar el papel de estos sitios en la formación del dímero y en la localización intracelular de la proteína en células vegetales.

```

[T. atroviride] EPL1 1 MCFSSLEKLALEFTAAVSADTVSYDTGYDASRSLTVVSCSDGANGLETTRYHWLTQGGQIPR 60
[T. virens] Sm1 MQLSNIEFLALEFTAAVSADTVSYDTGYDNGSRSLNDVSCSDGENGLETRYHWLTQGGQIPR
**:*:*.*,*****;****,*****,* ***,*****
[T. atroviride] EPL1 61 FPYIGGVQAVAGWNSPSCGTCWKLTYSGRTIYVLAVDHSAAGFNIGLDAMNALTNGQAVQ 120
[T. virens] Sm1 FPYIGGAAAVAGWNSPSCGTCWKLQYSGETIYVLAVDHAAAGFNIGLDAMNALTGGQAVQ
*****,*****,***** ***,*****;*:*****,*****,*:**
[T. atroviride] EPL1 121 YGRVDATASQVAVVSNCGL 138
[T. virens] Sm1 LGRVSATALQVAVVSNCGL
***,***:**,* ***,**

```

Ilustración 2 Alineamiento de las proteínas TaEPL1 y TvSm1

Las dos proteínas elicitoras son secretadas por especies de hongos del género *Trichoderma*, TaEPL1 por *T. atroviride* y TvSm1 por *T. virens*. Según el alineamiento generadp en BLAST.P poseen 81% de identidad. Los principales sitios donde son distintas es la asparagina de Sm1 que se ha relacionado con un sitio de glicosilación (rojo) y el triptófano seguido de una glutamina en el caso de EPL1 para un posible sitio de oxidación (verde).