



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

Papel de las NADPH oxidasas en el control biológico por *Trichodema atroviride*

TESIS QUE PRESENTA

BIOLOGA FABIOLA LÓPEZ RAMÍREZ

Para Obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

En la Especialidad de
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Director de la Tesis
DR. ALFREDO HERIBERTO HERRERA ESTRELLA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Expresión Génica y Desarrollo de Hongos de la Unidad de Genómica Avanzada del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Alfredo Herrera Estrella.

Agradecimientos

Al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (Conacyt) por la beca no. 346888, otorgada durante la realización de los estudios para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en el CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Al Dr. Alfredo Herrera Estrella por recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas y por su infinita paciencia. Principalmente la libertad que me concedió para jugar, aprender y desarrollar este proyecto.

A mi comité tutorial, la Dra. Laila Pamela Partida y Dr. Juan José Peña Cabriales por sus consejos, comentarios y el carácter crítico con el que me guiaron durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Vianey Olmedo Monfil por aceptar ser parte de mi comité, por su apoyo en momentos críticos y por siempre estar dispuesta a brindarme consejos.

Al Dr. Stefan de Folter y a los miembros de su laboratorio, por todo su apoyo en lo relacionado al estudio de con plantas, en especial a la M.C Karla González Aguilera.

Mis agradecimientos especiales a la Dr. Nohemí Carreras Villaseñor, por estar siempre dispuesta a enseñarme y a ayudarme a resolver mis dudas.

A los integrantes del Tricho's Lab, Miguel Ángel Hernández, Fabricio López, Elizabeth Medina, José Cetz y Karina Picazarri por su apoyo y los momentos de aprendizaje, en especial a Pedro Martínez por su invaluable apoyo en todo lo relacionado al material y reactivos.

Al M.C Irepan Reyes por toda su paciencia, enseñanzas y por introducirme al mundo de las plantas.

Le agradezco especialmente a mi familia, a mis padres Virginia y Calixto por ser mis padres, mi principal apoyo y por respetar mi tiempo. A mis hermanos Eva y Rubén por ser siempre mi compañeros de juegos y de vida. A los minimiembros de mi familia que siempre me alegran el día Yare, Yurem, Yiyi y Nahomí.

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES.....	4
	NADPH oxidasas (Nox).....	4
	Formación de Especies Reactivas de Oxígeno por las NADPH oxidasas	6
	Familia Nox.....	6
	Estructura de NADPH Oxidasas en hongos.....	7
	Las proteínas Nox en hongos	8
	<i>Trichoderma atroviride</i> como antagonista de hongos fitopatógenos.....	12
	Interacción <i>Trichoderma</i> -planta.....	13
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	15
V.	HIPOTESIS.....	16
VI.	OBJETIVOS.....	16
	Objetivo General	16
	Objetivos específicos.....	16
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
	Material biológico y condiciones de cultivo	17
	Medios de cultivo utilizados	18
	Ensayos de interacción antagónica directa.....	19
	Ensayos de antibiosis.	19
	Ensayos de Compuestos Volátiles Orgánicos	20
	Ensayos de interacción <i>Trichoderma-Arabidopsis</i>	20
	Análisis histoquímico	21
	Colonización de la raíz de <i>A. thaliana</i>	21
	Microscopía.....	21
	Diseño experimental para generación del transcriptoma de la interacción <i>T. atroviride</i> - <i>Arabidopsis</i>	22
	Secuenciación de RNA mensajero, mapeo y análisis de expresión diferencial	23
	Anotación y análisis de enriquecimientos de los genes diferencialmente expresados.....	24

VIII.	RESULTADOS.....	26
	Las mutantes <i>nox1</i> y <i>noxR</i> son incapaces de antagonizar hongos fitopatógenos.....	26
	Los compuestos antibióticos volátiles y no-volátiles de <i>nox1</i> y <i>noxR</i> no inhiben a hongos fitopatógenos.....	28
	Las mutantes de los genes <i>nox</i> fallan en establecimiento de la simbiosis.....	30
	Inducción de respuestas de defensa por las mutantes de los genes <i>nox</i>	32
	Inducción de respuesta de defensa por las mutantes <i>nox</i> en interacción indirecta.....	33
	Las mutantes de los genes <i>nox</i> afectan la arquitectura de la raíz	34
	Las mutantes de los genes <i>nox</i> son incapaces de colonizar la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
	Resultado del Análisis transcriptómico.....	41
	Análisis de categorías funcionales enriquecidas	43
	Comportamiento de genes altamente contrastantes	45
IX.	DISCUSION.....	49
X.	CONCLUSIONES	58
XI.	PERSPECTIVAS	59
XII.	REFERENCIAS	60
XIII.	ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Modelo para la activación del complejo NOX en hongos.	11
Ilustración 2. Ensayos de confrontación <i>T. atroviride</i> - fitopatógenos.	27
Ilustración 3. Efecto de compuestos antibióticos.	29
Ilustración 4. Efecto de los compuestos volátiles de las mutantes de los genes <i>nox</i>	30
Ilustración 5. Cocultivo de <i>T.atroviride</i> - <i>A. thaliana</i>	31
Ilustración 6. Efecto la interacción de <i>la cepa silvestre</i> y las mutantes <i>nox</i> de <i>T. atroviride</i> con <i>A. thaliana</i>	32
Ilustración 7. Tinción histoquímica de GUS. Interacción directa.	33
Ilustración 8. Tinción histoquímica de GUS en plántulas de <i>A. thaliana</i>	34
Ilustración 9. Comportamiento del meristemo de raíz en presencia de las mutantes <i>nox</i>	35
Ilustración 10. Micrografía confocal de la expresión de WOX5:GFP en interacción con <i>T. atroviride</i> y las mutantes de los genes <i>nox</i>	36
Ilustración 11. Micrografía confocal de raíces con el marcador de respuesta a auxina DR5:GFP	38
Ilustración 12. Micrografía confocal de raíces con marcadores de los transportadores de auxina	39
Ilustración 13. Micrografía confocal, colonización de raíz por <i>Trichoderma</i>	41
Ilustración 14. Contrastes realizados para el análisis de expresión diferencial.	43
Ilustración 15. Heatmap de las categorías funcionales enriquecidas	45
Ilustración 16. Diagrama de Venn con los genes más contrastantes.	46
Ilustración 17. Perfil transcripcional de los 20 genes más contrastantes	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla VI-1 Medio Mínimo 1X	18
Tabla VI-2 Buffer de reacción GUS	21
Tabla VI-3 Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X	22

I. RESUMEN

Trichoderma atroviride es un hongo de importancia comercial, usado principalmente debido a su habilidad de parasitar hongos fitopatógenos y a su capacidad de colonizar las raíces de las plantas estableciendo una relación simbiótica. En este trabajo, investigamos el papel de las NADPH oxidasas (Nox) en el establecimiento/mantenimiento de la simbiosis con *A. thaliana*, y en antagonismo con hongos fitopatógenos. Aquí nosotros reportamos que los genes *nox1* y *noxR* son necesarios para el mantenimiento de la capacidad micoparasítica de *T. atroviride*. A su vez el análisis del transcriptoma de la interacción $\Delta noxR$ -*A. thaliana* mostró que los procesos biológicos principalmente afectados en la mutante están relacionados a metabolismo y óxido-reducción. En este sentido en $\Delta noxR$ la inducción de genes relacionados con proteólisis, degradación de celulosa y lignina sugieren que la mutante $\Delta noxR$ utiliza a *A. thaliana* como una fuente de nutrientes y pierde su capacidad para establecer una interacción simbiótica. Lo anterior nos indica que los genes *nox* funcionan como un switch en balance simbiosis-patogénesis en *T. atroviride*.

Abstract

Trichoderma atroviride is a commercially important fungus, mainly due to its ability to parasitize plant pathogenic fungi, and colonize plant roots by establishing a symbiotic relationship. Here, we investigated the role of NADPH oxidases (Nox) in the establishment/maintenance of a symbiotic interaction of *T. atroviride* with the model plant *Arabidopsis thaliana*, and in its antagonistic capacity against phytopathogenic fungi. We report that the *nox1* and *noxR* genes are required for the maintenance of the micoparasitic capacity of *T. atroviride*. Transcriptome analysis of a $\Delta noxR$ mutant in the interaction with *A. thaliana* showed that the main biological processes affected in the mutant are related to metabolism and oxidation-reduction. In this sense, in $\Delta noxR$ the induction of genes related to proteolysis, degradation of cellulose and lignin suggest that mutant $\Delta noxR$ used *A. thaliana* as a source of nutrients, and lose their capacity to establish a symbiotic interaction. This indicates that the *nox* genes function as a switch in the balance of symbiosis-pathogenesis in *T. atroviride*.

II. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza los organismos coexisten, no como entidades separadas, sino como organismos que se relacionan a diferentes niveles. Como organismos sésiles, las plantas están expuestas a una amplia variedad de microbios benéficos y patógenos de todos los reinos (Bonfante & Requena, 2011).

Para sobrevivir a una variedad de condiciones ambientales adversas, muchas plantas han desarrollado la habilidad de establecer asociaciones benéficas o simbiosis con microorganismos, los cuales proveen a estas plantas ventajas ecológicas (Eaton, 2009). Sin embargo, no todas las asociaciones entre plantas y microorganismos son benéficas. En el mutualismo ó asociaciones mutualistas, ambos huésped y simbiote, se benefician de la asociación. En contraste, en asociaciones antagónicas uno de los participantes se beneficia a costa de su socio, en muchos casos resultando en la muerte del huésped (Eaton, 2009). Es principalmente en la rizósfera donde se lleva a cabo un diálogo molecular entre la planta y sus microorganismos asociados, por medio de un intercambio de diferentes clases de compuestos, este diálogo es un proceso celular altamente coordinado.

Algunos microorganismos producen moléculas que las plantas reconocen y en consecuencia activan una respuesta inmune innata (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014) o respuesta temprana. Sin embargo, la asociación planta-microorganismo, también involucra el reconocimiento molecular entre las dos partes mediado por una red de señalización, en la que participan el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) (Hermosa *et al.*, 2012). Estas hormonas (AJ y ET), se conocen por participar como señales de transducción e inducen resistencia sistémica (ISR), cuando las plantas son estimuladas por microorganismos benéficos, aunque se conoce que AJ se induce por daño mecánico y por el daño causado por herbívoros (Olmedo-Bonfil comentario personal), mientras que la acumulación de ácido salicílico activa el Sistema de Resistencia Adquirida (SAR), que es generalmente inducido por ataque por patógenos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Hermosa *et al.*, 2012; Ryas *et al.*, 1997).

La asociación de las raíces con hongos benéficos está ampliamente extendida entre las plantas terrestres y juegan un importante papel en el incremento del desempeño de las plantas, por

ejemplo en la toma de nutrientes y la resistencia a condiciones de estrés biótico o abiótico (Borowicz, 2001; Smith & Read, 1997). Hongos de varios clados colonizan raíces, entre ellos los pertenecientes al género *Trichoderma* Pers.: Fr (Teleomorfo *Hypocrea*, *Ascomycota*, *Dikaria*). Especies de *Trichoderma* son con frecuencia componentes dominantes de la microflora del suelo, en una amplia variedad de hábitats (Gams & Bissett, 1998). Los miembros de este género son hongos oportunistas, simbioses avirulentos de plantas, y actúan como parásitos y antagonistas de varios hongos fitopatógenos, protegiendo a las plantas de enfermedades (Harman, 2000; Harman *et al.*, 2004).

Dentro de este género se encuentra *Trichoderma atroviride* P. Karst., que es un hongo filamentoso ampliamente usado como especie modelo para estudiar mecanismos de micoparasitismo y como agente de biocontrol de enfermedades de plantas (Dubey *et al.* 2013). *T. atroviride* vive como saprófito, interactúa con hongos fitopatógenos por medio de su capacidad micoparasítica, es capaz de colonizar raíces y puede vivir como endófito, induciendo respuestas de defensa en plantas (Druzhinina *et al.*, 2011; Harman *et al.*, 2004). Sin embargo, es poco lo que se sabe a nivel molecular acerca de cómo lleva a cabo todas estas funciones .

Uno de los eventos tempranos de respuesta de defensa en animales y plantas es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por NADPH oxidasas específicas (Nox) (Montero-Barrientos *et al.*, 2011). Las especies reactivas de oxígeno son importantes moléculas de señalización, se sabe que durante la interacción patógeno-planta o durante el reconocimiento, los niveles de ERO se incrementan y desencadenan respuestas tempranas de defensa. En hongos fitopatógenos, genes *nox* han sido identificados, estos tienen un papel importante en virulencia, por ejemplo en *Magnaporthe grisea*, mutaciones de *nox1* o *nox2* resultan en la completa pérdida de patogénesis (Egan *et al.*, 2007), algo similar ocurre en *Botrytis cinerea* donde ambas proteínas NoxA y NoxB son necesarias para la formación del esclerocio y para la patogénesis (Segmüller *et al.*, 2008). En contraparte, en simbiosis como la de *Epichloë/Neotyphodium*, la inactivación del gen que codifica para la isoforma NoxA resultó en el crecimiento desmedido de hifas en meristemas y hojas maduras, incrementando dramáticamente la biomasa del hongo, como consecuencia, las plantas infectadas con la mutante *noxA* perdieron dominancia apical y mostraron senescencia prematura, mientras que la mutante *noxB* no afectó la simbiosis, mostrado

que la producción de ERO es crítica para el mantenimiento de la interacción mutualista *Epichloë/Neotyphodium* (Scott *et al.*, 2007).

Existe más información acerca de las señales y mecanismos que dirigen las interacciones patógenas entre hongos y plantas, pero se conoce poco acerca de cómo los hongos mantienen una interacción mutualista y que eventos detonan el cambio de mutualismo a antagonismo.

En 2011, Montero- Barrientos reportó que, como resultado de la sobreexpresión del gen *nox1* de *T. harzianum*, las transformantes mostraron mayor actividad antagónica que la cepa silvestre contra el patógeno *Pythium ultimum*, pero no contra *Rhizoctonia solani* o *B. cinerea*. También se incrementó la producción de ERO, así como la inducción de actividad de proteasas, celulasas y quitinasas. En *Trichoderma atroviride* IMI206040, Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella identificaron dos genes homólogos de gp91^{phox} (identificados en humanos), nombrados como *nox1* y *nox2* y un homólogo de p67^{phox} nombrado *noxR*. El papel de estos genes en el establecimiento y/o mantenimiento de la simbiosis y en la actividad micoparasítica por *T. atroviride* aún no ha sido del todo esclarecido, pero las evidencias de otras asociaciones sugieren que podrían desempeñar un papel importante. La secuenciación y anotación del genoma de *T. atroviride* ofrece una excelente oportunidad para el estudio y descubrimiento de genes que participan en funciones biológicas específicas

III. ANTECEDENTES

NADPH oxidasas (Nox)

Hasta los años 90's la producción de ERO con frecuencia se atribuía a la respiración mitocondrial o como un subproducto de otras reacciones. Sin embargo, el descubrimiento del fagocito NADPH oxidasa fue el primer ejemplo de un sistema que genera ERO, no como un subproducto, sino como resultado primario de un sistema enzimático (Bedard & Krauze, 2007; Lambeth 2004). La primera NOX1 descrita, entonces nombrada MOX1, homóloga de gp91^{phox} se expresa en colón, próstata, útero y músculo liso (Suh *et al.* 1999).

En mamíferos, se sabe que la generación de ERO por las enzimas NADPH oxidasas requiere el ensamblaje de un complejo multi-subunidad, formado por componentes reguladores del citosol

Rac1/2, p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox} y los componentes de membrana gp91^{phox} y la proteína adaptadora p22^{phox} (Scott, 2015), que es conocido como citocromo b₅₅₈. En macrófagos, donde se caracterizó originalmente este complejo, el proceso inicia en respuesta a una señal de activación, que lleva a la fosforilación de p47^{phox}, la cual induce su unión a p40^{phox} y p67^{phox}; éstos son reclutados desde el citosol a la membrana plasmática donde, posterior a una serie de fosforilaciones permiten a esta subunidad interactuar con gp91^{phox} y p22^{phox} a través de sus dominios SH3, los cuales se unen a regiones ricas en prolina (PRR) presentes en p22^{phox} (Sumimoto, 2008). Por su parte p67^{phox} se asocia a p40^{phox} mediante su dominio SH3, se sabe que la interacción de p67^{phox} con gp91^{phox} es fundamental para activación del complejo. La subunidad p40^{phox} también se fosforila y se une al complejo p47^{phox}-p67^{phox} a través de sus dominios PB1 (Phox/Bem1p). La GTPasa Rac1/2 se transloca en la membrana e interactúa con la región N-terminal de p67^{phox}. Rac1/2 sirve como un “switch” para la activación del complejo NADPH oxidasa.

La producción localizada de ERO por estas enzimas sirve como mecanismo de defensa y como señal de transducción en organismos multicelulares (Scott *et al.*, 2015). ERO derivadas de Nox son producidas en un amplio rango de concentraciones para afectar señalización y muerte de bacterias. La familia Nox es ampliamente distribuida y, en virtud de su potencial para inducir daño generalizado, su actividad es cuidadosamente regulada (Griffiths *et al.*, 2014). La mayoría de las isoformas Nox liberan superóxido al medio extracelular y, en consecuencia tienen el potencial de causar daño temporal a proteínas del plasma, adicionalmente también pueden interactuar con un amplio repertorio de moléculas entre las que se incluyen lípidos, carbohidratos, ácidos orgánicos, así como moléculas inorgánicas (Covarrubias *et al.*, 2008). Las enzimas NADPH oxidasas y dual oxidasa (DUOX) generan ERO de manera regulada, produciendo oxígeno reactivo en varias células y tejidos en respuesta a factores de crecimiento, citocinesis y señales de calcio (Lambeth, 2004)

Probablemente el recurso más importante de ERO es el anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), derivados de Nox 1-5 y DUOX (dual oxidasa). El anión superóxido se puede convertir en peróxido de hidrógeno por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y también por acción no enzimática en peróxido de hidrógeno y oxígeno en singulete (¹O₂), el

peróxido de hidrógeno producido puede ser subsecuentemente transformado en agua por enzimas como la catalasa y glutatión peroxidasa, y en presencia de metales de transición no reducidos, mediante la reacción de Fenton, puede ser convertido en el radical hidroxilo, que es altamente reactivo ($\bullet\text{OH}$).

Formación de Especies Reactivas de Oxígeno por las NADPH oxidasas

La generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) es generalmente una cascada de reacciones que inicia con la generación de superóxido.

Para la generación de ERO por las enzimas NADPH oxidasas, se requiere de la activación celular, seguida por el reclutamiento de proteínas del citosol, que organizan y ensamblan el complejo activo NADPH oxidasa (Lambeth, 2004). Este complejo, una vez formado transfiere electrones desde el NADPH en el citoplasma a través de la membrana a oxígeno molecular. El oxígeno sufre una reducción de un electrón que conduce a la formación del anión superóxido (O_2^-). Este superóxido es de vida corta y es la especie reactiva de oxígeno primaria que sirve para la formación de otras ERO, tales como peróxido de hidrógeno, hipoclorito u ozono (Bedard & Krauze, 2007). Aunque el superóxido es precursor de más especies reactivas, reacciona con un limitado repertorio de moléculas, como centros hierro-sulfuro, que funcionan como acarreadores de electrones en mitocondria y bacterias (Lambeth, 2004). En ausencia de activación celular, los componentes citosólicos del complejo NADPH oxidasa no se asocian, por lo tanto la generación de ERO por parte de Nox permanece en reposo (Nauseef *et al.*, 2013).

Familia Nox

La familia Nox se clasifica dentro de la superfamilia Dominio Reductasa Férrico (FRD por sus siglas en inglés), cuya característica principal es que poseen al menos un dominio transmembrana reductasa férrico que contiene un grupo hemo; este dominio se encuentra tanto en bacterias como en eucariontes. La superfamilia FRD a su vez se divide en tres grupos principales NOX, FRE y YedZ/STEAP.

Las enzimas reductasas férrico (FRE) y NADPH oxidasa (Nox), se encuentran con mayor frecuencia en células eucariotas, estas enzimas comparten tres dominios canónicos, un dominio

férrico reductasa de 6 hélices transmembranales, con un grupo hemo y dos dominios citoplasmáticos C-terminal de unión a FAD y NADPH. Este dominio deshidrogenasa les permite catalizar la transferencia de un electrón desde el NADPH citosólico a iones metal (FRE) u oxígeno (Nox) extracelular (Zhang *et al.* 2013).

En hongos se distinguen tres subfamilias de Nox. NoxA/ NoxB homólogos de gp91^{phox} descrita en humanos y mamíferos; NoxC cuya estructura es similar a Nox5 y DUOX de humanos y Rboh (Nox) de plantas y NoxR identificado como un homólogo de p67^{phox}.

Estructura de NADPH Oxidasas en hongos

Como ya se describió, las NADPH oxidasas (Noxs) son una clase de proteínas transmembranales que catalizan la generación de ERO, por transporte de electrones desde el NADPH al oxígeno (Bedard & Krauze, 2007; Sumimoto H. 2008). Una de las enzimas de este tipo mejor estudiada es la de los fagocitos, los cuales generan grandes cantidades del O₂⁻, como parte de su actividad microbicida, mediante la activación del componente asociado a membrana NADPH oxidasa. En este sistema el componente redox clave es el flavocitocromo b₅₅₈, el cual comprende a la subunidad catalítica gp91^{phox} (Nox2) que genera el O₂⁻, y una subunidad no catalítica p22^{phox} (Kawahara *et al.*, 2007). El conocimiento básico acerca de la estructura de Nox consiste en dominios altamente conservados, tales como los dominios de unión a FAD- y NADPH-, seis probables dominios α -hélices transmembranales y cuatro histidinas de unión a grupo hemo, se localizan en la tercer y quinta hélice transmembranal, de acuerdo a predicciones basadas en Nox de mamíferos (Détry *et al.*, 2014; Lambeth, 2004; Nauseef, 2004).

Sin embargo, en hongos, los genes que codifican NoxA, tanto de basidiomicetos como de ascomicetos indican que en promedio poseen de cinco a siete hélices transmembranales, en NoxB tienen de siete a ocho hélices transmembranales, y NoxC posee cinco hélices transmembranales (Détry *et al.* 2014).

Nox A y B poseen un sólo centro catalítico, mientras que NoxC tiene un dominio adicional N-terminal que contiene motivos putativos de unión a calcio EF-hand. Por otra parte, se sabe que la unión a la subunidad reguladora NoxR es requerida para la activación de NoxA y B (Scott & Eaton, 2008), no siendo así para NoxC, la cual no parece requerir la unión a NoxR, quizá porque

los dominios de unión a Ca^{2+} podrían actuar como subunidades reguladoras (Aguirre *et al.* 2005; Sumimoto *et al.*, 2008)

Otra de las características de estas enzimas es la presencia de motivos histidina. En hongos las distancias de los motivos di-histidina para NoxA y NoxB son de 3 aa en HTM 3 y 11 aa en HTM 5, aunque la mayoría de los ascomicetos tienen un tercer motivo di-histidina en NoxA con una distancia que abarca de 2-8 aa en la HTM 1. NoxB tiene el mismo esquema de distancias, pero posee un residuo adicional de histidina en HTM 3 con una distancia de 13 aa para los ascomicetos. NoxC tiene tres histidinas separadas por distancias de 13 aa y 3 aa en HTM 3, mientras que la distancia de los residuos de histidina en la HTM 5 es de 12 aa (Détry *et al.* 2014). En lo referente a los sitios de glicosilación el análisis de Détry *et al.* (2013) sólo encontró sitios de glicosilación para NoxB y no para las otras isoformas de Nox, lo cual señala una característica propia de esta isoforma. También encontraron que NoxR se encuentra en todas las especies previstas para tener NoxA, NoxB o ambas, pero interesantemente en algunas especies sólo encontraron NoxR, aun cuando no se encontraban NoxA y NoxB (referencia??).

Las proteínas Nox en hongos

En hongos los genes *nox* juegan un amplio rango de funciones esenciales. NoxA esta presente en un número importante de especies fúngicas, seguido por NoxB y NoxC, esta última se encuentra principalmente en ascomicetos (Détry *et al.* (2013).

En *Aspergillus nidulans*, NoxA está involucrada en la formación del cuerpo fructífero (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) a su vez la actividad localizada de Nox genera una poza de ERO que define la dominancia apical de las hifas, por lo que proponen una conexión entre Nox, ERO y calcio (Semighini & Harris, 2008).

En *Neurospora crassa* Nox1 es requerida para el desarrollo sexual y asexual, mientras que Nox2 parece estar involucrada en la formación de la espora sexual (Cano-Domínguez *et al.*, 2008); también en *Sordaria macrospora* Nox1 es requerido para el desarrollo del cuerpo fructífero, regulación del crecimiento y fusión de hifas (Dirschnebel *et al.*, 2014). En *B. cinerea* se requiere de ambas, NoxA y NoxB para la diferenciación del esclerocio, pero en virulencia tienen diferente papel, mientras NoxB es importante para la penetración, NoxA está involucrada en la diseminación del patógeno y la generación de las lesiones en su huésped (Segmüller *et al.*, 2008).

En el patógeno necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* se requiere de NoxA y NoxB para el desarrollo del esclerocio, el silenciamiento de Nox1 comprometió severamente la habilidad de causar la enfermedad, reduciendo también la producción de oxalato en la mutante (Kim *et al.*, 2011). En otro patógeno *Fusarium graminearum*, NoxA y NoxB están involucradas en el desarrollo del peritecio y en la germinación de la ascospora, y ambas contribuyen a virulencia (Wang *et al.*, 2014). Así mismo, la importancia de Nox en *Magnaporthe oryzae*, también en desarrollo y patogénesis fue reportada por Ryder *et al.* (2013), quienes describieron que la configuración para el desarrollo del hilo de penetración de *M. oryzae* recae en la remodelación del citoesqueleto en dos pasos, donde Nox2 es requerido en el primero de ellos, para la formación adecuada de un anillo de septina y el segundo paso es dependiente de Nox1, donde se produce la elongación dependiente de actina.

Por último en el endosimbionte *Epichloë festucae*, *noxA* fue identificado como un gen esencial para el establecimiento de colonizaciones compatibles en su planta huésped, la delección de *noxB* no tiene efecto en el establecimiento de la simbiosis, indicando que en *E. festucae* NoxA y NoxB tienen funciones diferentes (Tanaka *et al.*, 2006 en Kayano *et al.*, 2013).

Evidencia de la importancia de estos genes en metabolismo ha sido provista en hongos como *Ganoderma lucidum*, un basidiomiceto de importancia farmacéutica, en el cual reportaron que la producción de especies reactivas de oxígeno vía NADPH oxidasas regula la biosíntesis ácido ganoderico (Mu *et al.*, 2013).

Aunque en mamíferos se ha descrito que la generación de ERO por estas enzimas requiere del ensamblaje de un complejo multi-subunidad, que se compone de los componentes reguladores del citosol Rac1/2, p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox} además del flavocitocromo b558, mismo que se compone de la subunidad catalítica gp91^{phox} (Nox1/Nox2) y de la proteína p22^{phox}, en hongos, no todos los homólogos de estas subunidades han sido encontrados.

En *Sordaria macrospora*, Nowrousian *et al.*, (2007) describieron el gen *pro41* que codifica una proteína que se localiza en la membrana del retículo endoplasmático, misma que es esencial en el desarrollo y maduración del peritecio. Sin embargo hasta este punto, no se habían encontrado evidencias de su relación con los genes *nox*. En *P. anserina* se encontró que la mutación en el gen *ls1* que codifica una tetraspanina, exhibe el mismo fenotipo que $\Delta nox2$ y que ambas se

encontraban presentes o ausentes en genomas de hongos, por lo que se sugirió que Pls1 se asocia a Nox2 (Lambou *et al.*, 2008). En *E. fetucae* y *Claviceps purpurea* se demostró que la proteína Bem1, tiene un dominio estructural similar a p40^{phox} y que ésta interactúa con NoxR, por medio de su dominio PB1, en estos mismos hongos también se describió que la proteína Cdc24 también interactúa con NoxR (Takemoto *et al.*, 2011; Schülman *et al.*, 2013 y Herrmann *et al.*, 2014 en Siegmud *et al.*, 2014)

Fue a finales del 2014 cuando Lacaze *et al.*, así como Siegmund *et al.*, identificaron un nuevo componente del complejo NADPH oxidasa en hongos, lo primeros lo describieron en *B. cinerea* y los segundos en *P. anserina*. se encontró que Este nuevo componente es un homólogo de la proteína transmembrana p22^{phox} de mamíferos y de Pro41 de *S. macrospora*, anteriormente descrita. La función de la proteína p22^{phox} es estabilizar a gp91^{phox} para formar el flavocitromo b₅₅₈ en mamíferos. De esta forma el complejo Nox de hongos parece estar completo (Ilustración1).

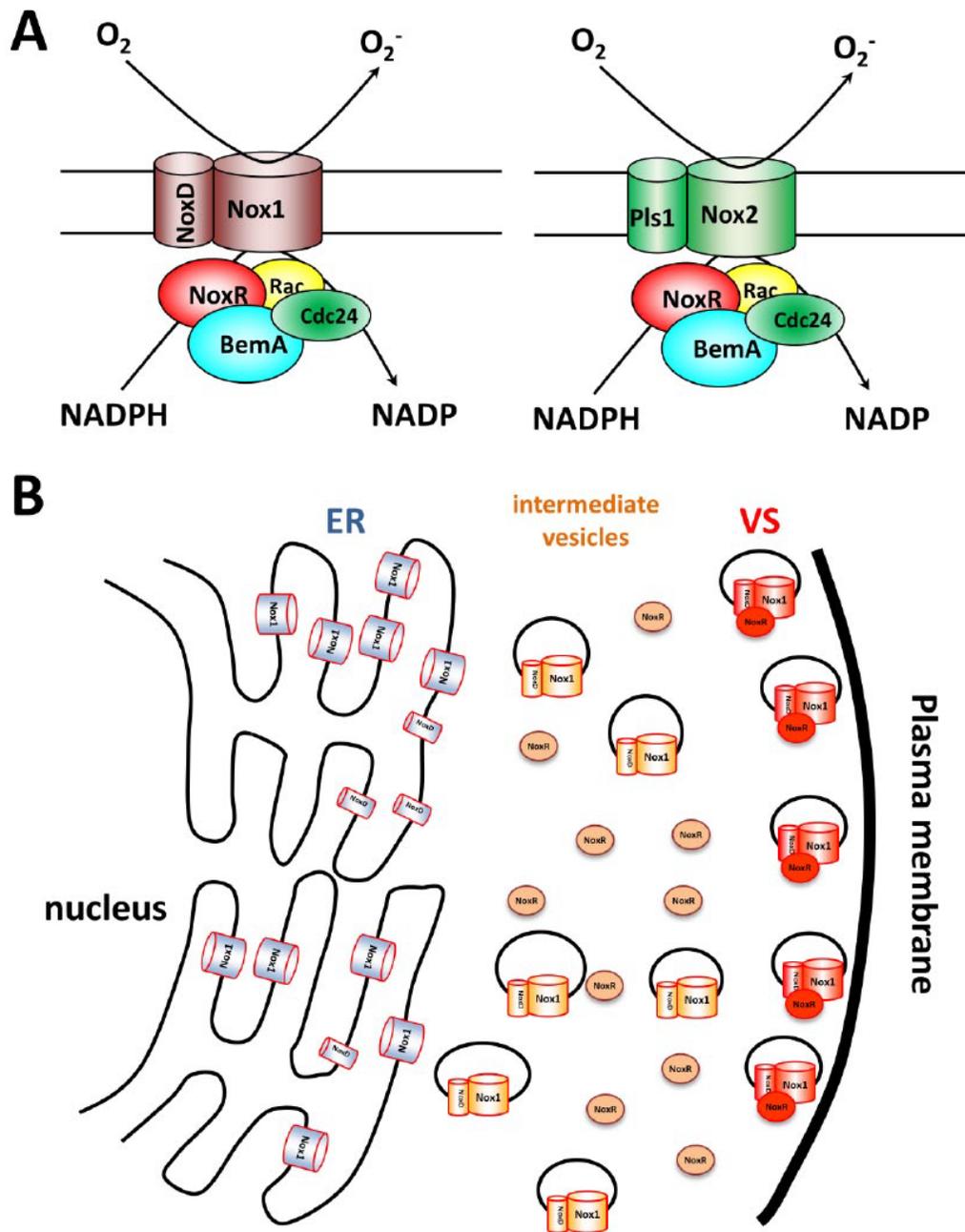


Ilustración 1. Modelo para la activación del complejo NOX en hongos. A) Propuesta de la composición de los complejos Nox1 y Nox2 en hongos: las subunidades catalíticas Nox1 y Nox2 se unen a NoxD y Pls1 para formar distintos complejos membranas enzimáticas. Una vez llevada a cabo la activación, los componentes citosólicos del complejo (BemA, NoxR, Cdc24 y Rac) se trasladan a la membrana para activar la oxidación del NADPH y la producción de O_2^- por el flavocitocromo. B) Modelo de activación de Nox1: mientras Nox1 y NoxD se ensamblan en el RE, la completa activación del complejo y la translocación de NoxR (y otros componentes) ocurre en vesículas en la red del Sistema de Vacuolas (Tomado de Lacaze et al., 2014)

***Trichoderma atroviride* como antagonista de hongos fitopatógenos**

Las especies de *Trichoderma* a menudo son referidas como agentes de biocontrol (Rocha-Ramírez *et al.*, 2002). *T. atroviride* tiene la habilidad de micoparasitar diferentes especies de hongos; durante el micoparasitismo *Trichoderma* compete por nutrientes, y responde adhiriéndose y enrollándose en las hifas de sus huéspedes, mientras produce metabolitos con actividad antimicrobiana. Esto fue confirmado por Atanasova *et al.*, (2013) donde generaron perfiles transcriptómicos de tres especies de *Trichoderma*, en ensayos de confrontación de estas especies de *Trichoderma* versus *Rhizoctonia solani*, encontrando que *T. atroviride* exhibe un comportamiento parasítico hacia *R. solani*, en el cual participan genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios, GH16 β -glucanasas, varias proteasas y pequeñas proteínas ricas en cisteína.

El grupo de Atanasova *et al.*, (2013) también encontró que los genes que se expresaban antes del contacto de las hifas con *R. solani*, no se expresaban más después del contacto con su presa, lo que indica un mecanismo de percepción por parte de *Trichoderma*. Por otra parte evidencia de la pérdida de capacidad micoparasítica en *T. atroviride* fue reportada por Rocha-Ramírez *et al.*, (2002) y Aghcheh *et al.*, (2013), en el primero la ausencia del gen *tgal* que codifica para la subunidad α de la proteína G, provocó la pérdida total de sobrecrecimiento y la capacidad micoparasitar a sus hospederos, así como también la reducción de la actividad quitinasa y la reducción en la producción del compuesto antifúngico 6-pentil-pirona; en el segundo la ausencia del gen que codifica una metiltransferasa, $\Delta lae1$, trajo consigo la pérdida de su capacidad micoparasítica y también la habilidad de defenderse contra otros hongos.

A nivel molecular, se intenta incrementar la habilidad de biocontrol de *Trichoderma* incrementando quitinasas o la actividad proteínasa, ya sea incrementando el número de copias de genes apropiados o fusionándolos a promotores fuertes (Brunner *et al.*, 2005). En *T. harzianum* la sobreexpresión del gen *nox1* mostró mayor actividad antagonista que la cepa silvestre contra el patógeno *Pythium ultimum*. También se incrementó la producción de ERO, así como la inducción de actividad de proteasas, celulasas y quitinasas (Montero- Barrientos *et al.*, 2011), sin embargo

los mecanismo moleculares y las señales que gobiernan la capacidad antagónica de *Trichoderma* aún no se han elucidado por completo.

Interacción *Trichoderma*-planta

Hasta la fecha se han descrito cuatro niveles de interacción en el proceso de fitoestimulación llevado a cabo por *Trichoderma*, el primero es la comunicación basada en la liberación de Compuestos Volátiles Orgánicos (CVOs); el segundo es producción auxinas y de precursores de auxinas que son detectados por la planta para modular la arquitectura de la raíz; el tercero es, la activación de respuesta de defensa local y sistémica a través de contacto físico entre las hifas y la epidermis de raíz, o por la liberación de elicitores y por último la proliferación de micelio en el apoplasto de las raíces de plantas (Brotman *et al.* 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014).

Reportes de la interacción de especies de *Trichoderma* con diferentes plantas de importancia agrícola revelan que incrementa el crecimiento y desarrollo de éstas en cultivos axénicos. Entre los beneficios reportados de la interacción se encuentran el aumento de la biomasa y estímulo de desarrollo de raíces laterales (Contreras- Cornejo *et al.*, 2009), este efecto es similar al descrito por auxinas en plantas. En plantas el aumento del sistema radicular permite tener mayor superficie para la toma de nutrientes, misma que se ve potenciada debido a que *Trichoderma* incrementa la solubilidad de nutrientes, así como la capacidad de la planta para tomarlos y distribuirlos (López-Bucio *et al.*, 2015); esta propiedad podría explicarse por la excreción de sideróforos y ácidos orgánicos que incrementan la disponibilidad de nutrientes (Samolski *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014 en López-Bucio *et al.*, 2015).

La interacción entre planta y microorganismos involucra eventos de reconocimiento y señales que son distintas para diferentes elicitores de microorganismos. Esos elicitores pueden ser patrones moleculares asociados a microorganismos o asociados a patógenos (MAMPs o PAMPs) (Contreras –Cornejo *et al.*, 2011). Se sabe que ciertos metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma* tienen un efecto antimicrobiano en altas dosis, pero actúan como patrones moleculares asociados microorganismos (MAMPs) y como compuestos tipo auxina a bajas concentraciones (Contreras –Cornejo *et al.*, 2014).

En la literatura existen evidencias que apoyan fuertemente el papel de auxinas en la regulación de arquitectura del sistema radicular. Aunque también se ha descrito que algunos microorganismos producen auxina en su interacción con plantas, esos microorganismos pueden interferir con el desarrollo ya que pueden perturbar el balance de auxinas en planta, sin embargo esto último ha sido mejor estudiado en bacterias fitopatógenas y en rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (Spaepen and Vanderleyden, 2010), con escasa atención en hongos promotores de crecimiento. En condiciones axénicas *T. virens* produjo compuestos relacionados a auxina, ácido indol-3-acético, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol, mismos que pueden activar diferencialmente la expresión de genes marcadores inducibles por auxina (Contreras- Cornejo et al., 2009).

En plantas adultas, las auxinas se producen en su mayoría en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo, y son transportadas activamente a través del tejido vascular y se acumulan en la punta de la raíz (Berleth & Sachs, 2001, en Jenik et al., 2007). El transporte polar de auxinas es mediado por una familia de acarreadores eflujo, las proteínas PIN (PIN-FORMED).

Se ha demostrado que las proteínas PIN median varios procesos importantes como el desarrollo de la flor y de tejido vascular (PIN1) o gravitropismo (PIN2 y PIN3) (Benková et al., 2003)

IV. JUSTIFICACIÓN

La seguridad alimentaria, la adaptación y fortalecimiento de la resiliencia de los sistemas agrícolas frente al cambio climático son parte de los objetivos que plantean nuevos retos para la agricultura. Para ello se requiere reducir el impacto negativo del uso de agroquímicos y pesticidas empleados comúnmente. De todo lo anterior se desprende el uso de tecnologías amigables con el medio ambiente que permitan mantener o aumentar la producción agrícola. Para ello, el uso de microorganismos benéficos es una de las opciones que han acompañado a la agricultura por mucho tiempo. Uno de estos microorganismos benéficos es *Trichoderma atroviride*, un hongo de importancia agrícola debido a su capacidad como agente de control biológico de diversos microorganismos causantes de enfermedades de plantas, mismo que adicionalmente ayuda a proveer minerales y nutrientes a las plantas con las que se asocia. En los últimos años se ha puesto especial interés en elucidar los mecanismos y señales por los cuales *T. atroviride* es capaz de micoparasitar y controlar a otras especies de fitopatógenos, así como los mecanismos moleculares por los cuales las plantas son capaces de percibir, reconocer y asociarse con especies de *Trichoderma*. Evidencia de las múltiples funciones biológicas de las enzimas NADPH oxidasas han puesto de manifiesto su importancia en procesos relacionados a desarrollo, metabolismos y virulencia en diferentes hongos. Estos antecedentes sugieren que las funciones de las enzimas NADPH oxidasas son conservadas en hongos; sin embargo, el papel que puedan estar desempeñando en *T. atroviride* es fundamentalmente desconocido, de ahí la importancia de llevar a cabo más esfuerzos para elucidar el papel de estos genes en el establecimiento de asociaciones con plantas y en procesos de micoparasitismo. El conocimiento de señales y mecanismos que pudiesen verse afectados por estos genes nos permitirán también desarrollar mejoras en la implementación de esta especie en beneficio del desarrollo de cultivos sostenibles.

V. HIPOTESIS

Las proteínas Nox de *Trichoderma atroviride* desempeñan un papel clave en el control biológico de hongos fitopatógenos y en la modulación de la simbiosis con plantas.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Elucidar el papel de los genes *nox* en la habilidad de biocontrol de *Trichoderma atroviride*.

Objetivos específicos

- Establecer el papel de los genes *nox* en la capacidad antagónica de *T. atroviride*.
- Establecer el papel de los genes *nox* en la interacción con plantas.
- Generar y analizar el transcriptoma de la interacción *T. atroviride* IMI 206040- *A. thaliana* y *T. atroviride* Δ *noxR*- *A. thaliana*

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se emplearon la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* IMI206040, y tres mutantes de los genes *nox*; *nox1* (Id. 302802), *nox2* (Id: 300495) y *noxR* (Id. 315943). Estas mutantes fueron generados de acuerdo al método de *PCR de doble unión* (Yu *et al.*, 2004), en los cuales, el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés), para cada uno de los genes, fue reemplazado por un cassette de resistencia a higromicina, mismo que contiene el gen de higromicina fosfotransferasa (*hph*).

También se usaron los siguientes hongos *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, ambos miembros de la división Ascomycota; *Fusarium oxysporum*, que pertenece a la división Deuteromycota, y tres pertenecientes a la división Basidiomycota, *Sclerotium rolfsii* y dos grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* AG 2 y *R. solani* AG 5, todos estos hongos reportados como fitopatógenos de importancia agrícola.

Para los ensayos de interacción hongo-planta, colonización de raíz y la generación del transcriptoma se usó el ecotipo Columbia-0 de *Arabidopsis thaliana*. También se usaron las líneas transgénicas derivadas del de *A. thaliana* Col-0 que llevan fusiones de los promotores de los genes de *lipoxygenase2* inducible por AJ (ácido jasmonico) (At3g45140) y *pathogenesis-related1* (At2g14610), al gen reportero *uidA* (Schommer *et al.* 2008; Shah *et al.* 1997), para ser referidas como *pLox2:uidA* y *pPr1:uidA* (proporcionadas por la Dra. Olmedo Monfil, V). También se usaron líneas etiquetadas con la proteína verde fluorescente de los transportadores de auxinas pPIN1::PIN1:GFP, pPIN2::PIN2:GFP, pPIN3::PIN3:GFP y pPIN7::PIN7:GFP y el marcador de respuesta a auxina DR5:GFP, para observar posibles cambios en la arquitectura de la raíz se uso la línea WOX5:GFP. Estas líneas fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Stefan de Folter.

En todos los casos, para el establecimiento de los ensayos las semillas se desinfectaron con etanol 70% (v/v) por 7 minutos y con hipoclorito (cloro comercial) al 20% (v/v), en agitación suave

también por 7 minutos, seguidos por 4 lavados con agua destilada estéril. Posterior a la desinfección, se sometieron a un periodo de vernalización de 2-4 días en oscuridad, a 4 °C.

Medios de cultivo utilizados

En este trabajo se emplearon los siguientes medios de cultivo. Agar Papa Dextrosa (PDA) de la marca Difco de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para los ensayos de confrontación *Trichoderma atroviride*-fitopatógenos se usó Medio Mínimo (MM) como lo refiere *Carsolio et al.*, 1994, sin asparagina. Del cual se preparó un stock al 100X sin K₂HPO₄, sin FeSO₄·7H₂O, sin agar y sin glucosa, mismos que se adicionaron al momento de preparar el medio que se ajustó a un pH final de 5.5. Cabe mencionar que al Stock 100X se adicionó 3 ml de cloroformo para su preservación.

Tabla VII-1 Medio Mínimo 1X

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.9 g
KCl	0.2 g
NH ₄ NO ₃	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 mg
MnCl ₂ ·7H ₂ O	2mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2mg
Glucosa	20 g
Agar bacteriológico	20 g

Para la preparación de medio 1X se tomó un volumen de 10 ml del stock, se complementó como se mencionó anteriormente, y esterilizó por 20 minutos, a 120 °C a 15 lb de presión. Posterior a esto, se vertió en cajas Petri de 90 mm.

Para los ensayos de interacción *Trichoderma atroviride*- *Arabidopsis thaliana* se usó medio MS mezcla basal de sales (Murashige and Skoog basal salt mixture, Cat M5524, Sigma) al 0.2X, suplementado con 0.3 % de sacarosa y con 10 gr de agar bacteriológico. Se ajustó a un pH final de 5.7.

Ensayos de interacción antagónica directa

Para los ensayos de interacción *T. atroviride*-fitopatógenos, tanto las cepas silvestres y las mutantes se propagaron en oscuridad, a 26 °C. Los ensayos de interacción antagónica directa se llevaron a cabo usando el Medio Mínimo descrito, y para los ensayos de interacción indirecta (ensayos de antibiosis y de compuestos volátiles), generación de preinóculos y obtención de esporas se usó medio PDA.

En placas Petri conteniendo medio PDA se prepararon preinóculos de los hongos fitopatógenos *A. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *S. rolfsii* y *R. solani* AG2 y AG5, los cuatro primeros se dejaron crecer de 3-5 días ó hasta cuando alcanzaran el crecimiento necesario para obtener suficiente micelio para los ensayos. Para los preinóculos de los dos grupos de anastomosis de *R. solani* y las cepas mutantes y silvestre de *T. atroviride* se inoculó y dejó crecer por un lapso de 36-40 horas.

Discos de micelio de 5 mm de diámetro se colocaron en extremos opuestos de cada caja de MM. *A. solani*, *B. cinerea* y *F. oxysporum* se dejaron crecer por 3 días, posterior a este periodo se colocaron discos de micelio de las cepas de *T. atroviride* en el extremo opuesto; *Sclerotium rolfsii* y los dos grupos de anastomosis de *R. solani* se inocularon al mismo tiempo que las cepas de *T. atroviride*. Se incubaron a 26 °C en oscuridad y se tomaron fotografías a los 4 días posteriores al contacto.

Ensayos de antibiosis.

Discos de micelio joven se inocularon en el centro de cajas de medio PDA cuya superficie estaba cubierta por un celofán estéril, se incubaron por 36 h a 26 °C, en oscuridad. Después de este período el celofán en cuya superficie crecieron las diferentes cepas de *T. atroviride* fue retirado para inocular en su lugar discos de micelio fresco de los diferentes hongos fitopatógenos, cuyo preinóculo fue preparado como se describió para las interacciones directas. Se incubaron nuevamente en oscuridad a 26 °C, por períodos de 40 h, en el caso de *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* y 5 días para el resto de los patógenos.

Ensayos de Compuestos Volátiles Orgánicos

Al igual que en el ensayo anterior discos de micelio de 5mm de inocularon en el centro de cajas con medio PDA, tanto de los fitopatógenos como de *T. atroviride*. Se retiraron las tapas de las cajas Petri y se colocaron uno frente al otro (*T. atroviride*-fitopatógeno) con los discos de micelio y medio al interior, y se sellaron con papel plástico adherente de cocina. Estos ensayos sólo se realizaron con los dos grupos anastomosis de *R. solani*. Se incubaron por 36 h en oscuridad, 26 °C.

Ensayos de interacción *Trichoderma-Arabidopsis*

Para los ensayos de interacción *T. atroviride-A. thaliana*, se usaron cajas Petri que se colocaron en posición vertical para permitir el crecimiento de las raíces en la superficie del medio, se incubaron en cámara de crecimiento a 24 °C, con un fotoperiodo de 16 h de luz constante (200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8 h de oscuridad. En placas de medio MS al 0.2X se sembraron en línea recta 10 semillas de las respectivas líneas transgénicas de *A. thaliana*, a una distancia de ~4 mm cada una. Se incubaron en cámara de crecimiento con las condiciones que se describieron anteriormente.

Después de 4 días, a una distancia de 5 cm se inoculó con 1×10^6 esporas sobre un círculo de papel filtro estéril de 5mm de diámetro, esto para asegurar un crecimiento uniforme de las colonias, se dejó que el agua acumulada en las cajas se secase, se cubrieron y sellaron con papel plástico adherente. Se incubaron de acuerdo con las condiciones anteriormente descritas. Los ensayos se repitieron por triplicado para las líneas *pLox2:uidA* y *pPr1:uidA*, y por duplicado para las líneas etiquetadas con GFP.

Para los ensayos por compuestos volátiles se usaron cajas Petri con una división, en las cuales se vertió medio MS. En un compartimento se sembraron en línea recta 8 semillas de las respectivas líneas *pLox2:uidA* ó *pPr1:uidA* y se incubaron en cámara de crecimiento; en el día 4 se inocularon 1×10^6 esporas en el otro compartimento de la caja; se incubaron nuevamente durante por 3 y 5 días más. Estos ensayos se llevaron a cabo por triplicado con 30 plantas para cada mutante de los genes *nox*.

Análisis histoquímico

Para el análisis histoquímico de la actividad del gen reportero GUS, plántulas de *A. thaliana* se incubaron de 12- 14 h en buffer de reacción GUS, en oscuridad a 37 °C.

Tabla VII-2 Buffer de reacción GUS

NaH ₂ PO ₄ 100mM pH 7	1.342 ml
Na ₂ HPO ₄ 100mM pH 7	1.158 ml
Triton 10 %	200 µl
K ₃ Fe(CN) ₆ 100 mM	350 µl
K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O 100 mM	350 µl
X-Gluc (Biosynth)	5 mg
H ₂ O	16.1 ml

Para limpiar las plántulas teñidas de restos de clorofila se trataron con el protocolo de Malamy & Benfey (1997). Se teñeron y analizaron no menos de 20 plántulas de cada línea por mutante, por cada réplica biológica.

Colonización de la raíz de *A. thaliana*

Con la intención de corroborar si *T. atroviride* era capaz de colonizar la raíz de *A. thaliana*, se sembraron e incubaron en cajas de medio MS, 10 semillas por caja Petri, cuando la plántulas alcanzaron la edad de 4 días, se inocularon con una dilución de ~5 esporas en 10 µl, pero éstas en lugar de inocularse en papel filtro de 5 mm de diámetro, se procedió, con la ayuda de una pipeta a inocular en línea recta a una distancia de 5 cm de las raíces, esto con la finalidad de poder observar hifas individuales en raíz. Se analizaron 15 plántulas por cada cepa en experimentos por duplicado.

Microscopía

Para observar la expresión de las líneas transgénicas de *A. thaliana* se procedió a teñir la raíz con Ioduro de propidio (IP) (Propidium iodide, Sigma) a una concentración de 0.01mM, disuelto en

agua destilada estéril. Mientras que para verificar la colonización por *T. atroviride* las hifas se tiñeron con WGA Alexa Fluor 488 diluido en buffer PBS 1X (Phosphate-buffered saline) (Cold Spring Harb Protoc; 2006) a una concentración de 10 µg/ml, por 5 minutos, posteriormente las raíces se lavaron con un poco de buffer PBS, se retiró el exceso de WGA con ayuda de papel absorbente, y se procedió a teñir la raíz con IP con la concentración antes indicada pero en este caso también diluido en buffer PBS.

Tabla VII-3 Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X

NaCl	8 gr
KCl	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr

Se ajusta a un pH 7.4 y se esteriliza en autoclave por 20 minutos a 15 lb.

Las raíces se observaron en microscopio confocal (LSCM) Zeiss LSM 510 META. La presencia de GFP /Alexa Fluor 488 e IP se observó con el laser Argon, Abs/Em 488/515-530 nm. LA imagen confocal fue capturada con el software del mismo y evaluada con LSM-510 Image Examiner.

Diseño experimental para generación del transcriptoma de la interacción *T. atroviride* - *Arabidopsis*

En placas Petri de 90 mm que contenían medio MS al 0.2X, suplementado con 0.3 % de sacarosa y con 10 gr de agar bacteriológico a un pH final de 5.7 se procedió a sembrar 20 semillas de *A. thaliana* Col-0 en línea recta. Estas semillas previamente habían sido esterilizadas como se describió anteriormente y sometidas a un periodo de vernalización de 2 días, a 4°C en oscuridad. Una vez sembradas se sellaron e incubaron en cámara de crecimiento a 24°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz constante (200 µmolm²s⁻¹)/ 8 h de oscuridad.

Después de 4 días a una distancia de 5 cm se colocó un disco de papel filtro estéril en cual se inocularon 1x10⁶ esporas de las respectivas cepas. Se inocularon tanto las cepas silvestre *T.*

atroviride IMI206040 como las mutantes Δ nox1, Δ nox2 y Δ noxR. Para el control de *A. thaliana* en lugar de esporas se usó agua destilada estéril; en el caso del control de las cepas de *T. atroviride*, éstas se inocularon en placas Petri de medio MS en ausencia de las plántulas de *A. thaliana* sobre discos de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro. Se sellaron e incubaron en las condiciones antes mencionadas.

A los 3 días posteriores a la inoculación, y antes del contacto micelio-raíz se colectó con ayuda de una espátula estéril el frente del micelio de cada cepa que crecía en dirección a las raíces de *A. thaliana*. Inmediatamente se procedió a congelar este micelio en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta la extracción de RNA. Para *A. thaliana*, con ayuda de un bisturí se procedió a cortar en la base del tallo (cuello) para separar el brote de las raíces. Se colectaron por separado las raíces y el tejido aéreo, se procedió a congelar inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C . La colecta se repitió a los 5 días posteriores a la inoculación y para el control. Se llevaron a cabo tres réplicas de este experimento.

Para la generación del transcriptoma se colectó micelio de la interacción *A. thaliana*- *T. atroviride* IMI206040; *A. thaliana*- *T. atroviride* Δ noxR, y como control cada cepa creciendo sola. De *A. thaliana* se usaron las raíces para la obtención de RNA por ser la zona que coloniza *T. atroviride*.

Para la extracción de RNA de raíz de *A. thaliana* y de *T. atroviride* se usó el método basado en TRIZOL (INVITROGEN) pero modificado por Amorós Seller (2008), al que también se realizaron modificaciones (ANEXO 1).

Secuenciación de RNA mensajero, mapeo y análisis de expresión diferencial

La síntesis de cDNA fue realizada según el protocolo *TruSeq® RNA Sample Preparation v2 Guide* y la secuenciación se hizo en la plataforma Illumina HiSeq 2000, en un formato de 2X100. Se generaron lecturas de una longitud de 100 pares de bases.

Se analizó la calidad de las lecturas generadas usando el software FastQC. Este análisis se ejecutó como parte de una tubería programada en *perl*. Posteriormente estas secuencias fueron

mapeadas en los transcritos predichos en el genoma de *T. atroviride* v2 de la página de JGI (<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html>) usando el software Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012). La información de mapeo fue guardada en formato BAM, se contaron las lecturas que pertenecían a cada transcrito y dentro del ambiente del paquete estadístico R se construyó una tabla de secuencias por transcrito de cada tratamiento por cada réplica.

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el paquete edgeR de Bioconductor (Robinson y *et al.*, 2010), usando transcritos que al menos tuviesen tres cuentas por millón en alguna biblioteca y que, el sumar las lecturas en todas las bibliotecas, tuvieran al menos 5 cuentas por millón. Las librerías fueron normalizadas por el método de trimmed mean of M-values (TMM) (Robinson y Oshlack, 2010) y posteriormente se realizó el cálculo de la dispersión común usando el método estadístico “Cox-Reid prole-adjusted likelihood” (CR). Se determinó la expresión diferencial entre los genes de las distintas condiciones usando el método “Generalized linear model (GLM) likelihood ratio test” (McCarthy *et al.*, 2012). Un FDR ≤ 0.01 fue considerado como estadísticamente significativo en este análisis.

Anotación y análisis de enriquecimientos de los genes diferencialmente expresados

Las secuencias de las proteínas en formato FASTA del genoma de *T. atroviride* v2.0 se obtuvieron del *Frozen Gene Catalog* (<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.download.ftp.html>), estas secuencias se compararon mediante BLASTP (E-value $\leq 1 \times 10^{-3}$) contra la base de datos no-redundante (nr) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el programa Blast2GO versión 2.6.0 (<https://www.blast2go.com>). Se asignaron las categorías funcionales GO usando una puntuación de anotación de ≤ 40 y un E-value $\leq 1 \times 10^{-3}$ (Götz *et al.*, 2008). Para aumentar la anotación se realizó una comparación de dominios de proteínas, usando la base de datos InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>). Este proceso se enriqueció con la anotación, usando la opción de ANNEX integrada en Blast2GO (Myhre *et al.*, 2006). También se usó el paquete GO.db 2.10.1 de Bioconductor para obtener los ancestros de cada GO. Una vez obtenida la anotación del genoma completo, ésta se heredó a los genes con expresión diferencial del análisis transcriptómico.

Usando una función de GSeq, que se basa en la distribución hipergeométrica no central de Wallenius (Oshlack and Wakefield, 2009), se evaluó si existía un sesgo en los genes diferenciales debido al tamaño del gen y se observó que este sesgo no era significativo. Con el paquete GSeq (Young *et al.*, 2010) se realizó un análisis de enriquecimientos de términos de ontologías génicas (GO), pertenecientes a la ontología general del proceso biológico con el método de distribución hipergeométrica. Los términos GO con un $FDR \leq 0.2$ fueron considerados enriquecidos significativamente en cada comparación realizada. Para no representar categorías muy generales únicamente se hizo el análisis con GOs que contenían hasta 300 genes. Los datos se representaron en un “heatmap” con clusterización, la intensidad del color representa el porcentaje de genes que fueron expresados diferencialmente en el análisis del total de genes de cada término de GO. El análisis bioinformático del transcriptoma fue llevado a cabo por el M.C Villalobos-Escobedo J.M.

VIII. RESULTADOS

Las mutantes *nox1* y *noxR* son incapaces de antagonizar hongos fitopatógenos

Para conocer el comportamiento de cepas mutantes en los genes *nox* de *T. atroviride* se llevaron a cabo ensayos de confrontación con hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Observamos que la cepa silvestre fue capaz de detener el crecimiento de *S. rolfsii* y sobrecrecer a *R. solani* AG2, y *A. solani*; también fue capaz de controlar a *B. cinerea*, pero no fue capaz de controlar y sobrecrecer a *R. solani* AG5 y *F. oxysporum*. Sin embargo, las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ fallaron en controlar a los hongos fitopatógenos, y en $\Delta nox2$ se observó un comportamiento más parecido al de la silvestre (Ilustración 2). Este comportamiento se aprecia mejor en los ensayos por compuestos antibióticos (Ilustración 3).

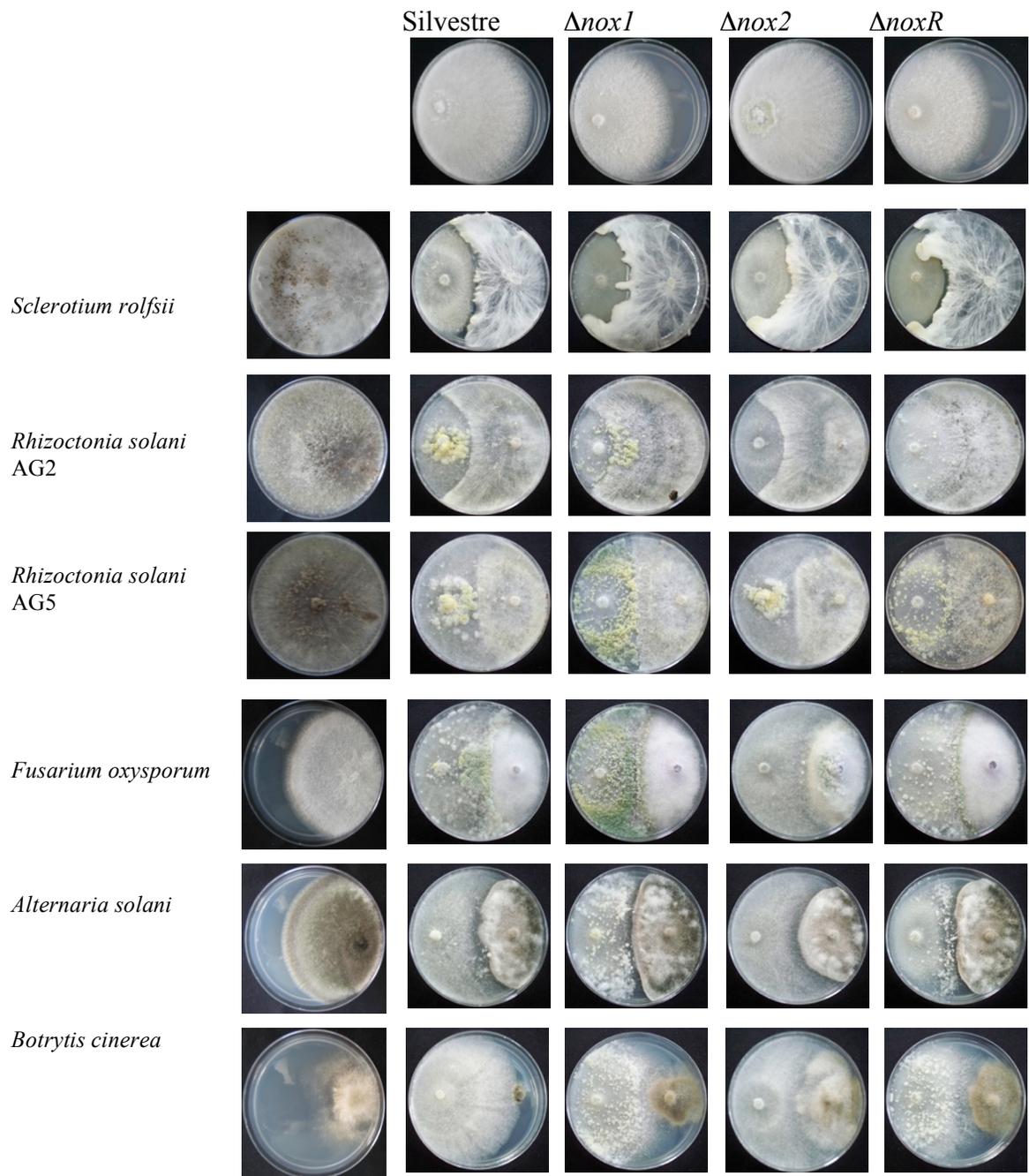


Ilustración 2. Ensayos de confrontación *T. atroviride*- fitopatógenos. Del lado izquierdo se ubican las cepas de *Trichoderma*, mientras del lado derecho se localizan los fitopatógenos.

Los compuestos antibióticos volátiles y no-volátiles de *nox1* y *noxR* no inhiben a hongos fitopatógenos

Para determinar si los metabolitos producidos por las mutantes *nox* tienen algún efecto antimicrobiano diferente a los de la cepa silvestre, se realizaron ensayos de limitación de crecimiento por compuestos antibióticos, como se describe en los métodos. En estos ensayos se observó que las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ no inhiben el crecimiento de los fitopatógenos en el medio de cultivo para los cuales tanto la cepa silvestre como la mutante $\Delta nox2$ sí lo hacen. Esto podría explicarse desde que Atanasova *et al.*, (2013) encontraron que la estrategia que sigue *T. atroviride* involucra principalmente la antibiosis así como la acción de enzimas hidrolíticas, sus resultados mostraron la sobrerregulación principalmente de β -1,3/1,4-D glucanasas de la familia GH16 y de dos genes PKS (clado1) para producción de metabolitos secundarios y también toxinas killer tipo-KP4.

Los ensayos para compuestos volátiles se llevaron a cabo solamente con *R. solani* AG2 y AG5 con resultados similares a los observados en la interacción antagónica directa y por compuestos antibióticos no-volátiles, donde las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ fueron incapaces de inhibir y controlar a *R. solani* AG2 (Ilustración 4).

Hasta este punto el efecto observado en $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ podría deberse a la falta o insuficiencia en la síntesis de compuestos metabólicos secundarios de capacidad antibiótica.

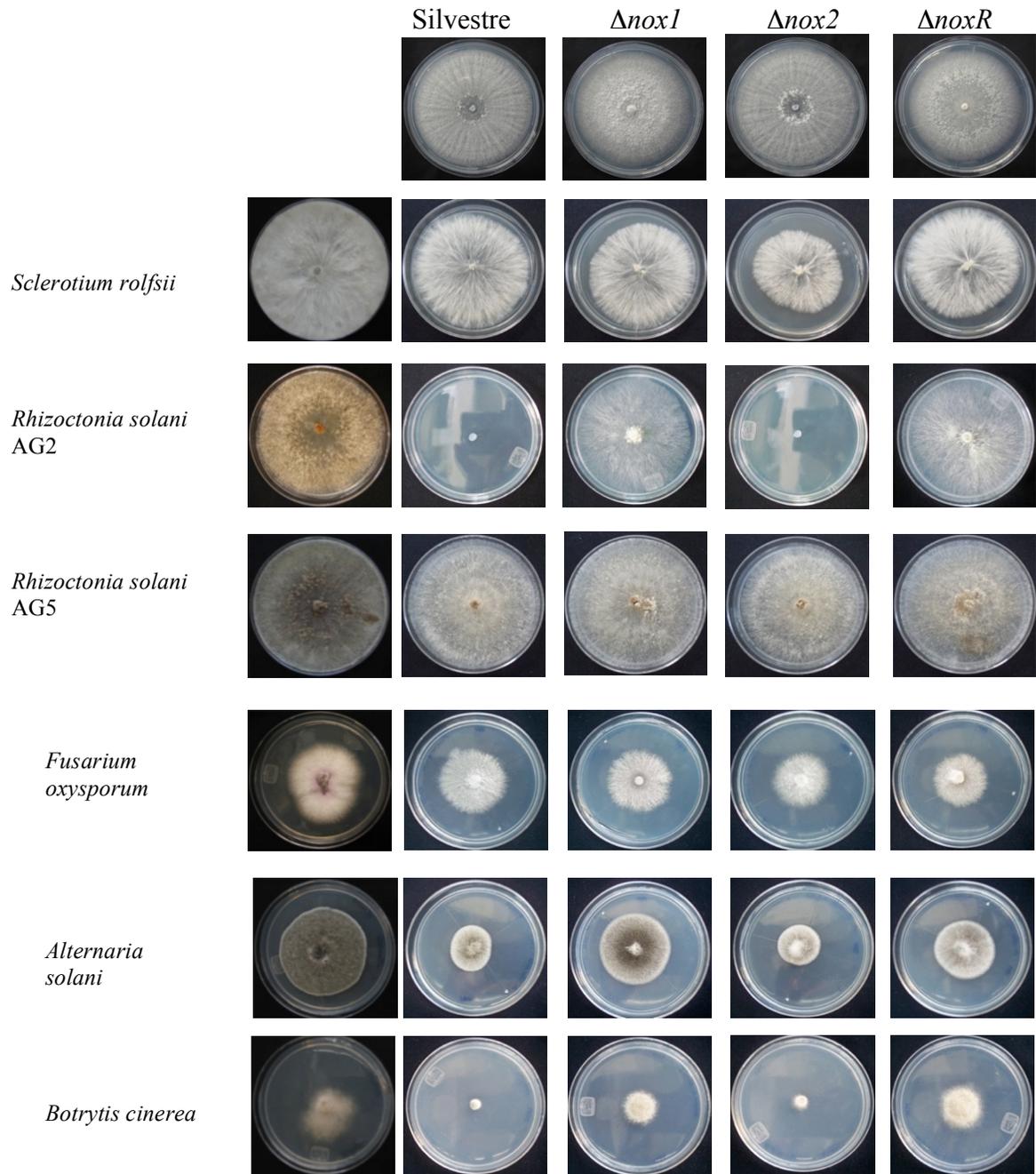


Ilustración 3. Efecto de compuestos antibióticos. Los metabolitos producidos por mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ fallan al inhibir el crecimiento de fitopatógenos que son inhibidos por la cepa silvestre de *T. atroviride*

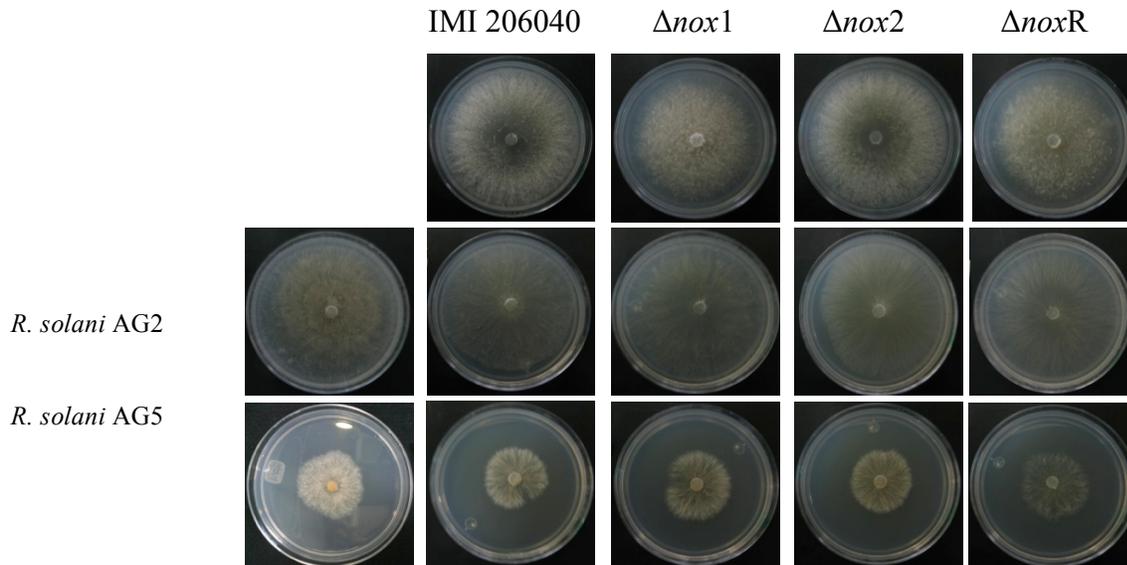


Ilustración 4. Efecto de los compuestos volátiles de las mutantes de los genes *nox*. Los compuestos volátiles producidos por las mutantes son incapaces de inhibir el crecimiento de *R. solani*.

Las mutantes de los genes *nox* fallan en establecimiento de la simbiosis

Se ha descrito que las diferentes especies de *Trichoderma* promueven el incremento en biomasa de su huésped, así como el desarrollo de raíces adventicias que le permiten mayor área de contacto para la toma de minerales y nutrientes. Para evaluar la respuestas de plantas con las mutantes en los genes *nox* de *T. atroviride* durante el contacto físico, se llevaron a cabo bioensayos en los cuales se usó el ecotipo Columbia-0 de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas se germinaron y crecieron en placas Petri, a los 4 días de edad se inocularon a 5 cm de distancia con 1×10^6 esporas y el control con 1 gota de agua destilada estéril. Estos ensayos se realizaron por triplicado con resultados similares.

Se observó contacto físico del micelio con la raíz primaria a los 4 días después a la inoculación (dpi) en con la cepa silvestre y las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$, y a los 5 días para $\Delta nox2$, esto debido a que en medio MS, se observó que la mutante $\Delta nox2$ crece más lento en relación con las otras mutantes. Al día siguiente al contacto se observan síntomas de necrosis en las hojas de las plantas inoculadas con las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$, no así en las plantas en contacto con la mutante $\Delta nox2$ cuyos síntomas empiezan a ser evidentes hasta el séptimo día posterior a la

inoculación. Hasta este tiempo la cepa silvestre no parece afectar a *A. thaliana*, sin embargo al día 9 de cocultivo se observan algunas hojas con clorosis, después de 11-12 días de interacción las plantas se recuperan y son capaces de convivir con la cepa silvestre como lo demuestran las plantas que permanecieron en interacción por un mes bajo las condiciones antes descritas (Ilustración 5).



Ilustración 5. Cocultivo de *T.atroviride*-*A. thaliana*. En esta imagen las plantas tienen 31 días de edad y 27 dpi.

Lo anterior no ocurre con las plantas cocultivadas con las mutantes de los genes *nox*. Las plantas en cocultivo con $\Delta nox1$, a los 9 dpi, presentan síntomas de clorosis y necrosis además que la mutante las sobrecrece, y hacia los 10-11 dpi cuando las plantas no sobreviven. Así mismo las plantas en interacción con $\Delta noxR$ son las que se ven afectadas más pronto, los síntomas de clorosis y necrosis se evidencian rápidamente, su crecimiento se ve afectado y las plantas mueren a los 8 dpi y son totalmente sobrecrecidas por la mutante; lo mismo ocurre para la mutante $\Delta nox2$ en cuyo caso se observan los mismo síntomas pero con manifestaciones tardías, en éstas la muerte de las plantas se observó a los días 13 posteriores a la inoculación (Ilustración 6). Con estas evidencias, hasta este punto en ninguno de los casos es posible decir si la muerte de las plantas se deba a los compuestos liberados en el medio por las mutantes, a que las plantas están siendo parasitadas y/o utilizadas como fuente de carbono o a lo suma de todos. Lo que es evidente es que la ausencia de los genes *nox* conduce a la ruptura de asociación simbiótica.

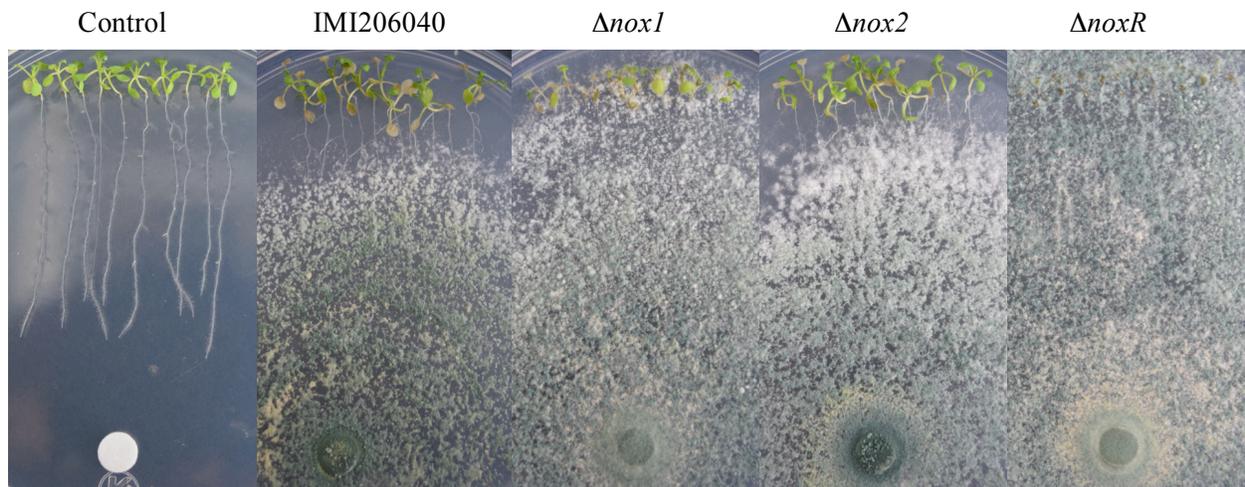


Ilustración 6. Efecto de la interacción de la cepa silvestre y los mutantes *nox* de *T. atroviride* con *A. thaliana* Col-0. Las semillas se desinfectaron y sembraron en medio MS 0.2x, después de 4 días a una distancia de 5 cm se inoculó con 1×10^6 esporas. Fotografías de *A. thaliana* con 13 días de edad y 9 días después de la inoculación.

Inducción de respuestas de defensa por las mutantes de los genes *nox*

La colonización de las raíces de *Arabidopsis* por *T. atroviride* induce la expresión retardada y la superposición de la expresión de genes relacionados de defensa de las vías ácido salicílico y ácido jasmónico/etileno (Hermosa *et al.*, 2012). Para examinar si la colonización de raíces por las mutantes de los genes *nox* de *T. atroviride* involucran respuestas alteradas de las AS y AJ, monitoreamos la expresión de genes marcadores que son regulados por el incremento de esas hormonas. Usamos las líneas marcadoras pLox2:*uidA* la cual es activada por la vía de defensa dependiente de AJ y pPR1a:*uidA* que se activa por AS. Los ensayos se realizaron en placas de medio MS 0.2X donde se sembraron semillas de las respectivas líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, después de 4 días se inocularon con 1×10^6 esporas de las respectivas cepas.

El análisis histoquímico con GUS en las líneas marcadoras pLox2 y pPR1a mostró que la presencia de las mutantes de las NADPH oxidasas activan las vías de respuesta relacionadas con ácido jasmónico y ácido salicílico. Las tinciones obtenidas con la línea pLox2 a los 4 dpi muestran tinción en los cotiledones y en los primordios foliares. Las tinciones obtenidas con la línea pPR1a a los 6 dpi mostró tinción en la nervadura principal y secundaria de los cotiledones y en los primordios foliares (Ilustración 7).

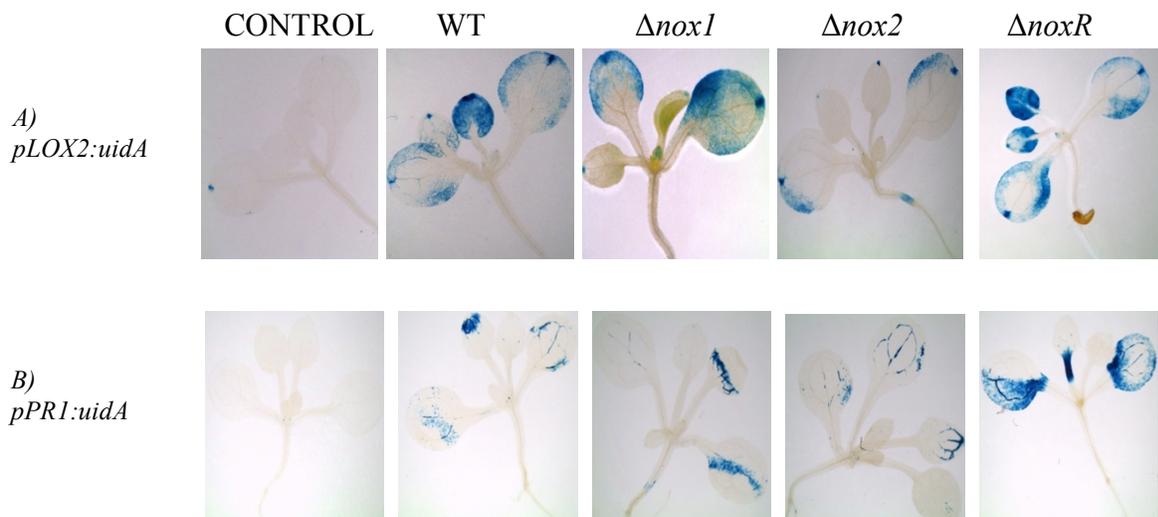


Ilustración 7. Tinción histoquímica de GUS. A) Tinción histoquímica de GUS en plántulas pLox2:uidA de *A. thaliana* en interacción con la cepa silvestre y las mutantes *nox* de *T. atroviride* después de 4 días de interacción. Plántulas con 8 días de edad. B) Tinción histoquímica de GUS en plántulas pPRI:uidA de *A. thaliana* en interacción con las cepas silvestre y las mutantes *nox* de *T. atroviride* después 6 días de interacción. Plántulas con 10 días de edad.

Inducción de respuesta de defensa por las mutantes *nox* en interacción indirecta

El ácido jasmónico y ácido salicílico son susceptibles de ser metilado (MeJA y MeSA) y llegan ser volátiles que son liberados en el aire pudiendo funcionar como señales a larga distancia e inductores de genes de protección en raíz y en la parte aérea de la planta (Contreras-Cornejo et al., 2014; Parker, 2009). Como en el ensayo anterior, para examinar si los compuestos volátiles producidos por mutantes de los genes *nox* de *T. atroviride* eran capaces de activar respuestas en la vía AJ/ET, monitoreamos la expresión de la línea marcadoras pLox2:uidA.

El análisis histoquímico con GUS de pLox2 mostró que los compuestos volátiles que son producidos por las mutantes de las NADPH oxidasas activan las vías de respuesta relacionadas con ácido jasmónico y etileno de forma más rápida e intensa que la silvestre (Ilustración 8). Las tinciones obtenidas muestran tinción en el ápice, los cotiledones y en los primordios foliares.

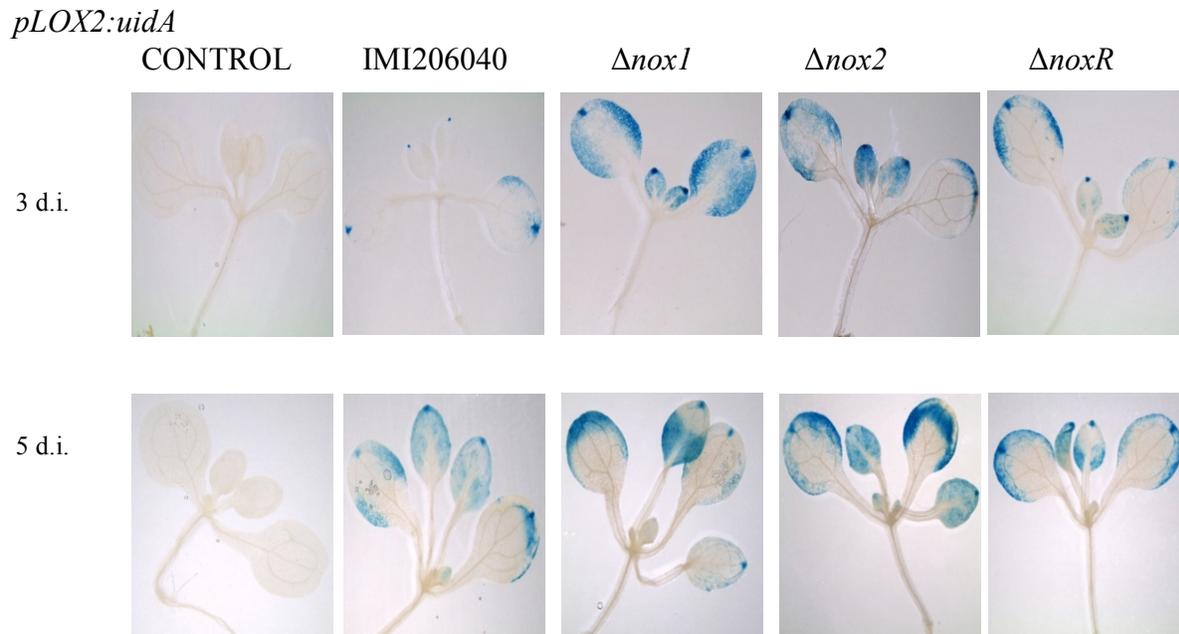


Ilustración 8. A) Tinción histoquímica de GUS en plántulas *pLox2:uidA* de *A. thaliana* en interacción con *T. atroviride* y las mutantes *nox* después de 3 y 5 días de interacción. Plántulas con 7 y 9 días de edad.

Estos datos sugieren que las mutantes de las NADPH oxidasas de *T. atroviride* pueden inducir respuestas mediadas por AS y AJ en *A. thaliana* de manera acelerada.

Las mutantes de los genes *nox* afectan la arquitectura de la raíz

Un patrón constante en la interacción de las mutantes de las NADPH oxidasas con *A. thaliana* fue que el meristemo de raíz en presencia de mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ tendía a curvarse en dirección opuesta al frente de crecimiento de las hifas de las mutantes y en sentido contrario al estímulo gravitacional, esto también se aprecia en menor medida en la mutante $\Delta nox2$. En vista de este comportamiento se cuantificaron las raíces que presentaban este comportamiento antes del contacto con las hifas, esto es a 3 días después de la inoculación, el control fueron raíces de *A. thaliana* cultivadas en ausencia *Trichoderma* (30 raíces por cada cepa, en dos réplicas biológicas). Como resultado el 4% de las raíces en interacción con la cepa silvestre tendían a curvarse; en $\Delta nox1$ el 77% tuvo este comportamiento; en $\Delta nox2$ el 60 % de las raíces tendió a curvarse pero fue en $\Delta noxR$ donde se observó que el 95% de las raíces tendían a curvarse (Ilustración 9).



Ilustración 9. Comportamiento del meristemo de raíz en presencia de las mutantes *nox*.

En vista de estos resultados se procedió a observar la arquitectura de la raíz, tiñendo con Ioduro de propidio y se observando en microscopio confocal. Observamos que las raíces en interacción con la mutante $\Delta noxR$ no fue posible apreciar la típica la arquitectura de la raíz en la zona del meristemo.

En *Arabidopsis*, las células madre mantienen la provisión de nuevas células para el crecimiento de la raíz. Ellas rodean un grupo de células que se dividen lentamente nombradas centro quiescente (quiescent center, QC), y juntas forman el nicho de células madre (stem cell niche, SCN). El QC actúa como el centro de señalización del SCN, reprimiendo la diferenciación de células madre en los alrededores y proporciona una reserva de células capaces de reemplazar las células madre dañadas. El mantenimiento de células madre depende del factor de transcripción WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN (WOX5), el cual es específicamente expresado en el QC (Forzani *et al.*, 2014). Con estos antecedentes y debido a los fenotipos observados se decidió estudiar la localización de WOX5 fusionada a GFP en las raíces de las plantas en interacción con las cepas mutantes *nox*.

Los fenotipos de curvatura de raíz en presencia de las mutantes se observó a los 3 dpi, por lo cual se decidió observar la expresión de WOX5:GFP a partir de los 2 dpi, a 3 dpi y finalmente a 4 dpi donde se esperaba que se diera el contacto (Ilustración 10). A 2 dpi, en raíces con la cepa silvestre y con la mutante $\Delta nox2$ se observa la señal de fluorescencia similar al control de las raíces creciendo solas, pero en $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ la fluorescencia disminuye con respecto al

control, y a los 3 dpi en las raíces con mutante $\Delta noxR$ la arquitectura de la raíz se ve severamente afectada y no es posible detectar la fluorescencia de WOX5:GFP, en $\Delta noxI$ la fluorescencia es menor con respecto al control. Y por último a los 4 días no es posible detectar la fluorescencia de WOX5:GFP, incluso en las raíces en interacción con la cepa silvestre; sin embargo, si se observan cambios drásticos en la arquitectura de la raíz. En las mutantes $\Delta noxI$ y $\Delta noxR$ se observan algunas hifas lo que indica que han tenido contacto con la raíz, pero principalmente en $\Delta noxR$ lo que se observa es la desintegración de la raíz.

En el caso de la mutante $\Delta noxR$, la pérdida de la arquitectura de la raíz y su desintegración ocurre antes del contacto con las hifas de $\Delta noxR$, los que nos indica que el daño generado es a consecuencia de los metabolitos liberados en el medio.

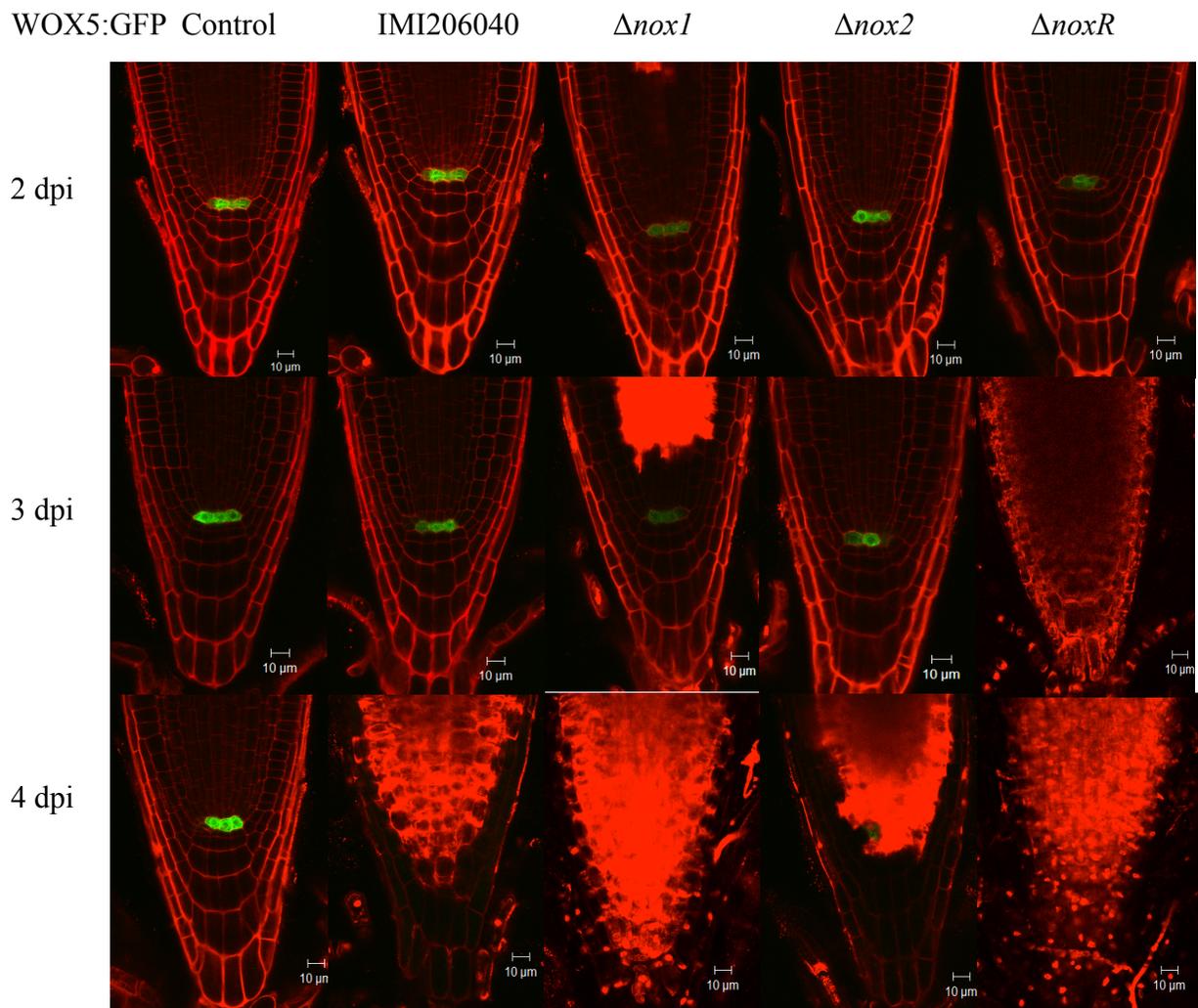


Ilustración 10. Micrografía confocal de la expresión de WOX5:GFP en interacción con *T. atroviride* y las mutantes de los genes *nox*.

EL mantenimiento del nicho de células madre de la raíz depende también de los factores de transcripción *PLT1* (PLETHORA1) y *PLT2* (PLETHORA2), *SCR* (SCARECROW) y *SHR* (SHORT ROOT) y del establecimiento de un gradiente de concentración de auxinas que culmina en el nicho de células madre (Jia *et al.*, 2015). La estabilidad de este gradiente depende de la distribución mediada por proteínas eflujo PIN y su síntesis local.

Como se mencionó en el mantenimiento del nicho de células madre, además de factores de transcripción, interviene un gradiente de auxinas, mediado por transportadores eflujo de auxinas. Pero también, en la estimulación debido a la gravedad se forma un gradiente de auxinas entre el lado superior en inferior de la raíz, el cual dirige la flexión de la raíz (Xi *et al.*, 2016). Se ha descrito que las plantas son capaces de percibir la gravedad para crecer en dirección apropiada, una respuesta llamada gravitropismo. El gravitropismo de raíz es importante porque permite establecer su sistema radicular, su regulación depende del transporte polar de auxinas mediado por transportadores de auxina PIN-FORMED (PIN) (Jenik *et al.*, 2007).

En vista de los resultados antes mencionados, analizamos si la interacción del las mutantes de los genes *nox* de *T. atroviride* con las raíces de *Arabidopsis* es capaz de causar cambios en el patrón de expresión del marcador de respuesta a auxina DR5:GFP, así como en los transportadores de auxinas PIN1, PIN2, PIN3 y PIN7 en el meristemo de raíz. Se examinó la respuesta a auxinas al igual como se realizó para WOX5:GFP y se usó IAA a 0.125µM como control adicional (Ilustración 11). A los 2 dpi la expresión de DR5:GFP se observó en la estela y columnela y fue similar en las raíces en interacción con la cepa silvestre y las mutantes. Esta señal no parece verse afectada a los 3dpi en la raíz en interacción con la cepa la silvestre, $\Delta nox1$ y $\Delta nox2$, pero en este tiempo en $\Delta noxR$ sólo se observa en la dos células de la columnela. A los 4 dpi la arquitectura típica se ha perdido en las raíces en interacción con las mutates $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$, mientras las hifas de éstas ya han alcanzado a la raíz; se aprecia fluorescencia en la columnela de las raíces en interacción con $\Delta nox2$. En las raíces en interacción con la cepa silvestre se observaron cambios en la arquitectura, que podrían explicarse por la presencia de calosa como lo mencionan Chacon *et al.*, (2007). Con respecto al control con IAA, la expresión de DR5:GFP se observa en la estela y columnela y no parece variar en el transcurso de tiempo en que se llevaron acabo estas observaciones.

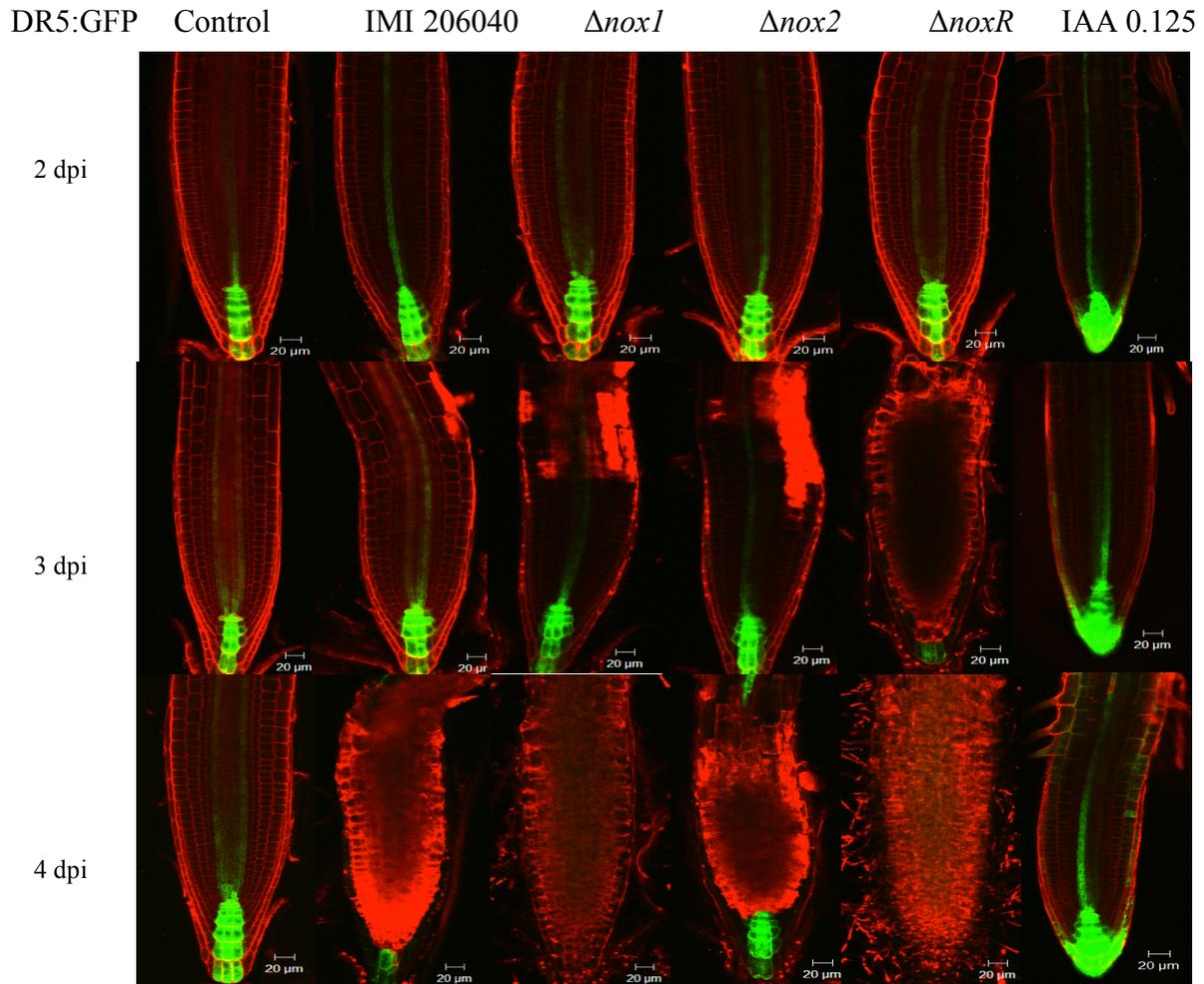


Ilustración 11. Micrografía confocal del marcador de respuesta a auxina DR5:GFP de raíces de *A. thaliana* en interacción con las mutantes de las NADPH oxidadas, a los 2, 3 y 4 días de interacción.

La curvatura en de la raíz a los 3 dpi en presencia de las mutantes *nox* podría explicarse en parte por la interrupción de gradiente o por la ausencia de auxinas. Sin embargo, en las raíces con $\Delta noxR$ la presencia de auxinas es casi imperceptible en el momento que esta curvatura es evidente. Para intentar esclarecer este comportamiento analizamos la presencia de GFP fusionada traduccionalmente con las proteínas PIN (pPIN1::PIN1:GFP, pPIN2::PIN2:GFP, pPIN3::PIN3:GFP y pPIN7::PIN7:GFP) en interacción con las mutantes de los genes *nox* a los 2, 3 y 4 días posteriores a la inoculación y antes del contacto (ANEXOS 2), cabe mencionar que esta curvatura fue visible en el tercer día posterior a la inoculación (Ilustración 12).

3 dpi Control IMI 206040 $\Delta nox1$ $\Delta nox2$ $\Delta noxR$

pPIN1::PIN1:GFP

pPIN2::PIN2:GFP

pPIN3::PIN3:GFP

pPIN7::PIN7:GFP

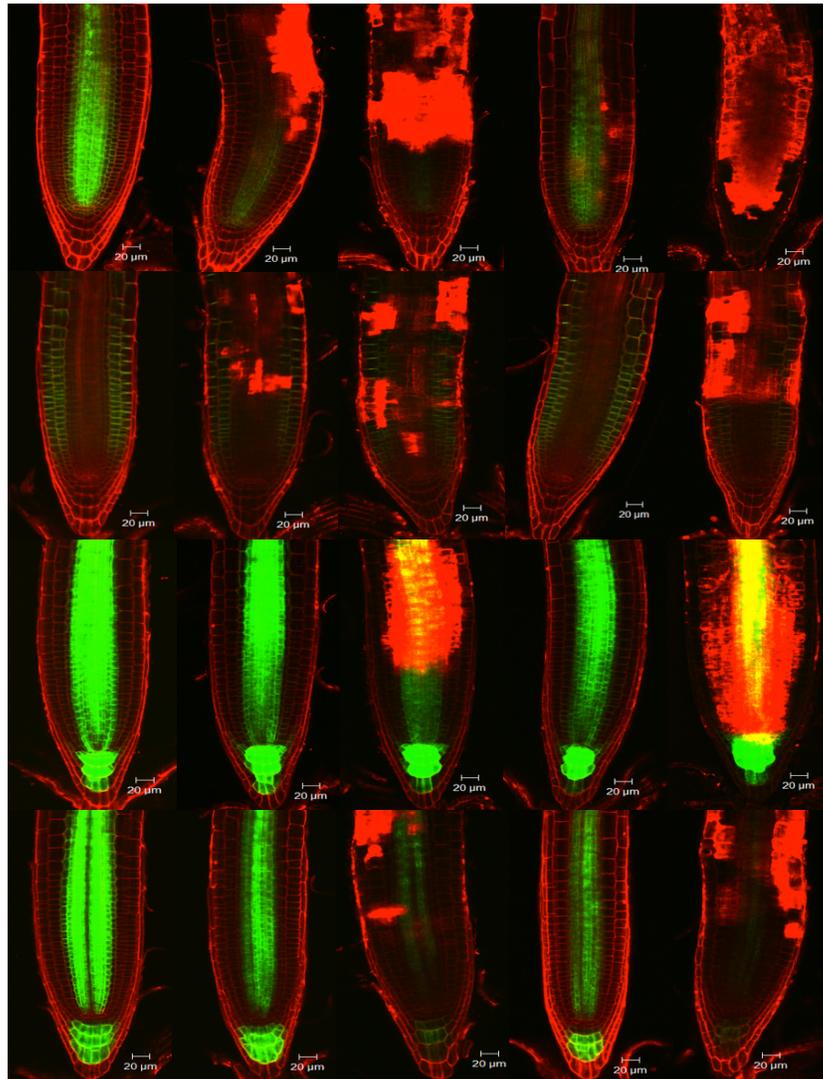


Ilustración 12. Micrografía confocal de las líneas pPIN1::PIN1:GFP, pPIN2::PIN2:GFP, pPIN3::PIN3:GFP y pPIN7::PIN7:GFP en interacción de las mutantes de los genes *nox* a 3 dpi.

En el fondo pPIN1::PIN1:GFP se observa su disminución de la señal en las raíces con la cepa silvestre, esta señal disminuye drásticamente en las raíces con $\Delta nox1$, mientras con $\Delta noxR$ se observa la pérdida completa de la fluorescencia. Para pPIN2::PIN2:GFP la fluorescencia es apenas perceptible en $\Delta noxR$, mientras disminuye en la silvestre y $\Delta nox1$. En pPIN3::PIN3:GFP la intensidad de la fluorescencia, tanto para la raíces expuestas a las mutantes *nox* como para la silvestre no se ve afectada. Y en pPIN7::PIN7:GFP ocurre algo similar a los otros marcadores ya

que la fluorescencia en $\Delta noxR$ es casi imperceptible y disminuye drásticamente en $\Delta noxI$, comparado con el control.

La apenas perceptible expresión de PIN1, PIN2 y PIN7 en interacción con la mutante $\Delta noxR$ nos indica que el papel de estas proteínas en el eflujo de auxinas no se está llevando a cabo, contrario a lo que ocurre con PIN3, el cual su expresión parece inalterada tanto en las mutantes como en la silvestre, lo que nos indica un elevado transporte de auxina, el cual previene la acumulación localizada de ésta. Sin embargo antecedentes de PIN3 indican que se posiciona simétricamente en el plasma de la membrana pero se traslada lateralmente por estímulo de la gravedad (Friml *et al.*, 2002). En el caso de las mutantes, se observó que las raíces tendían a curvarse en sentido opuesto al estímulo gravitacional lo que sugiere que PIN1, PIN2 y PIN7 pueden estar mediando preferentemente una respuesta a la interacción con las mutantes por sobre el estímulo gravitacional.

Las mutantes de los genes nox son incapaces de colonizar la raíz de *Arabidopsis thaliana*

En 2007, Chacon *et al.* reportaron la colonización de raíces de tomate por *T. harzianum* a nivel del epidermis y cortex, así como la presencia de depósitos calosa y celulosa a modo de barreras físicas. Para examinar si el daño observado en las raíces de *A. thaliana* es el resultado de los compuestos metabólicos liberados al medio o es causado por el crecimiento desmedido de las hifas de las cepas mutantes al interior de la raíz se procedió a inocular una dilución de ~ 5 esporas en 10 μ l en línea recta a una distancia de 5 cm de *A. thaliana*. Esto con la finalidad de poder observar hifas individuales en raíz. De entre 5-6 días posteriores a la inoculación se observó hifas sobre la raíz, en ese momento se procedió a colectar, teñir y observar.

Se observó que la cepa silvestre de *T. atroviride* fue capaz de colonizar el espacio intercelular de la raíz de *A. thaliana* mientras que las mutantes de las NADPH oxidasas fueron incapaces de penetrar el interior y sólo se observaron adheridas a la raíz (Ilustración 13).

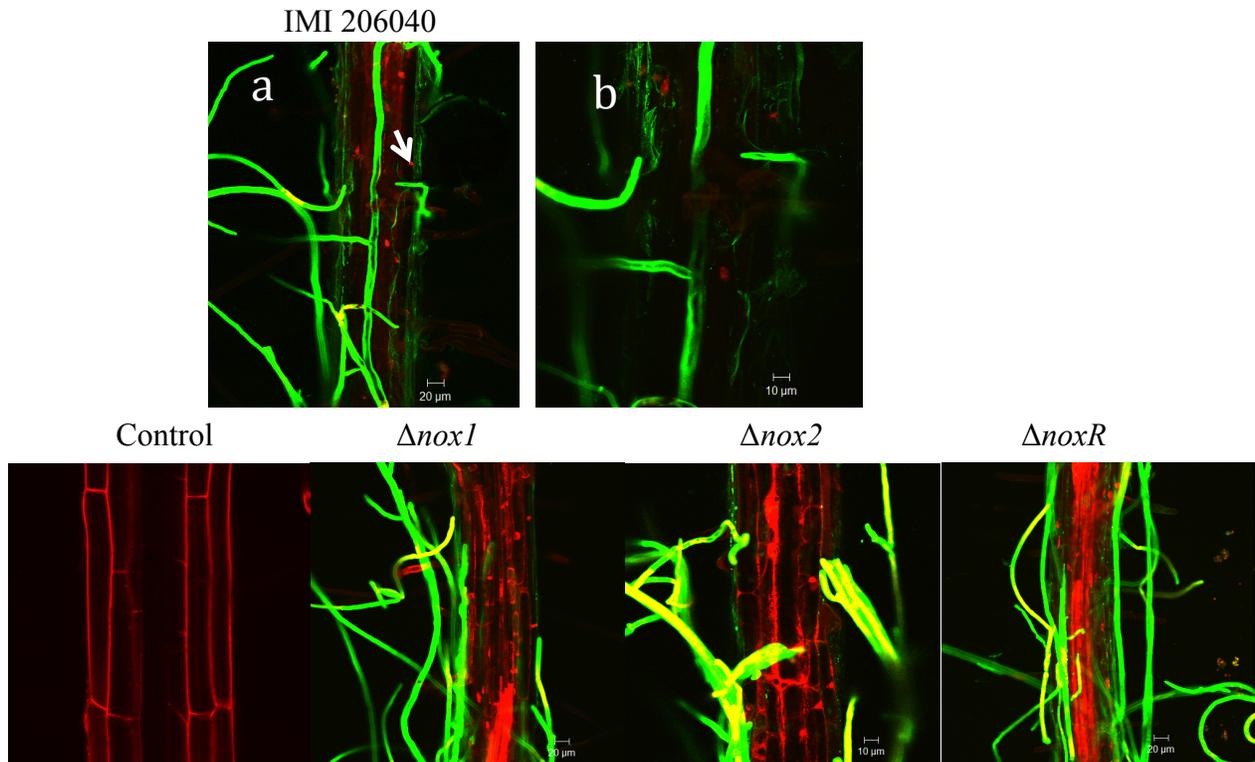


Ilustración 13. Micrografía confocal. a) La cepa silvestre penetra el espacio intercelular de la raíz de *A. thaliana*. b) Micrografía del sitio de penetración de la hifa de *T. atroviride*. En la parte inferior se observa el control de *A. thaliana* y las mutantes *nox* adheridas a la raíz.

Resultado del Análisis transcriptómico

En todos los experimentos realizados, el efecto sobre las raíces más drástico se observó en las interacciones con la cepa mutante $\Delta noxR$, por lo cual decidimos analizar el transcriptoma de la cepa silvestre (WT) y la mutante $\Delta noxR$ (NR) antes del contacto con la raíz (AC¹), es decir a los 3 dpi y en interacción (I), a los 5 dpi cuando el micelio sobrecrecía la raíz de *A. thaliana*, como controles se usaron a las cepas creciendo en ausencia de la planta.

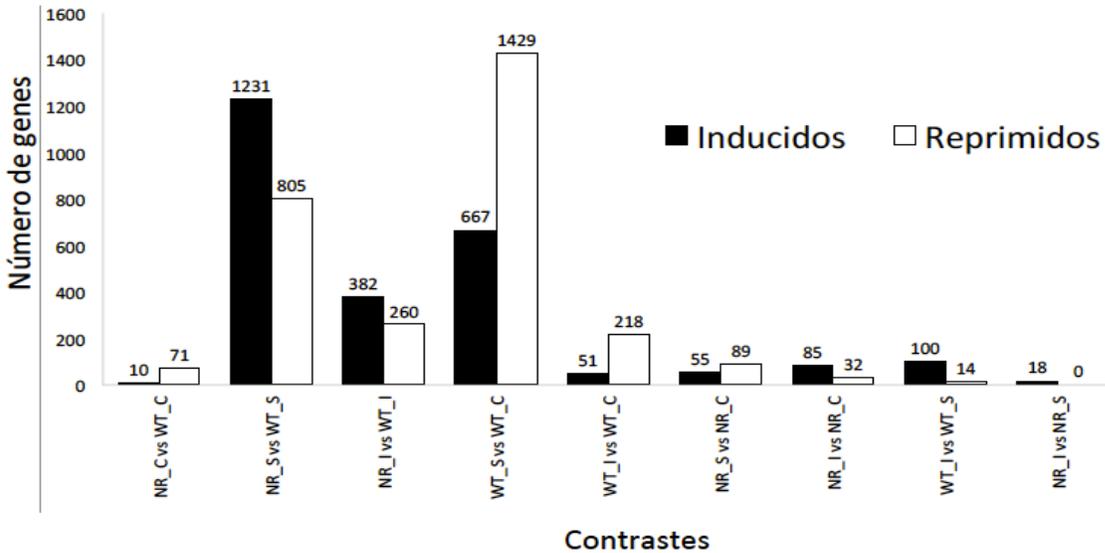
Cuando comparamos los genes de cepa silvestre WT_C (control) con las condiciones antes del contacto y en interacción (WT_S y WT_I), el patrón el general es la represión de un número importante de genes. Es decir, son más los genes que se reprimen que los que se inducen, lo que podría significar que, en respuesta a la presencia e interacción con la planta, *T. atroviride* reprime

¹ En los gráficos S equivale a antes del contacto (AC)

genes que generalmente se expresan constitutivamente. Mientras que al comparar los patrones de expresión en interacción y antes del contacto (WT_I vs WT_S) se observó que se inducen más genes (100) que los que se reprimen (14), y podrían ser éstos los genes que participan para el establecimiento de la interacción.

Un comportamiento interesante se observó cuando se compararon los genes de la mutante y la silvestre antes del contacto (NR_S vs WT_S) donde indujeron mas genes (1232) que los que se reprimieron (805), lo que sugiere un cambio muy importante en el comportamiento de la mutante *ΔnoxR* con respecto a la silvestre cuando están en presencia de un posible huésped, es decir la mutante noxR no reprime todos los genes que normalmente se reprimen en la WT. Por otra parte la comparación NR_C vs WT_C refleja que sus transcriptomas sin la planta son muy parecidos (81 genes diferenciales), mientras que en presencia de un huésped, aún sin contacto se aprecia un cambio importante entre las dos cepas; se observa que en la silvestre se induce un número importante de genes (WT_S vs WT_C) contrario a lo que ocurre en la mutante donde los genes diferenciales son apenas 144 (NR_S vs NR_C) lo que podría suponer que la mutante prácticamente no responde a la presencia del huésped. En relación a la mutante y silvestre en interacción (NR_I vs WT_I) el número de genes diferenciales (642) no es tan grande como en otras comparaciones pero es significativo que la respuesta a la presencia del huésped es diferente entre cada cepa (Ilustración 14).

Así mismo, en la comparación antes del contacto y en interacción de la mutante (NR_I vs NR_S), encontramos que sólo se inducen 18 genes, lo cual contrasta de manera importante con lo observado para la cepa silvestre donde se tienen 114 genes diferenciales (WT_I vs WT_S).



WT= cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*

NR= $\Delta noxR$

Ilustración 14. Contrastes realizados para el análisis de expresión diferencial. En la parte superior de cada barra se indica el número de genes reprimidos ó inducidos. Nota: en el gráfico S, equivale a antes

Análisis de categorías funcionales enriquecidas

Para conocer los procesos biológicos afectados en la mutante $\Delta noxR$, se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes inducidos y reprimidos en las distintas comparaciones (Ilustración 15). Los procesos afectados en la mutante son procesos de metabolismo de nucleótidos, de carbohidratos, metabolismo del compuesto glicosil, proteólisis, transporte transmembrana, transporte de un solo organismo, procesos de óxido-reducción y organización de componentes celulares. Este análisis mostró que los procesos biológicos afectados en la mutante $\Delta noxR$ en interacción con respecto a la WT en esta misma condición (NR_I vs WT_I) se reprimen procesos de metabolismo de nucleósidos y de manera más significativa procesos de transporte transmembrana y transporte de un solo organismo (single-organism transport). Así mismo se inducen genes relacionados a proteólisis, procesos de oxidación-reducción y procesos de metabolismo de carbohidratos.

Según nuestras observaciones los compuestos metabólicos liberados al medio por parte de $\Delta noxR$ ocasionaron de alguna forma el agotamiento de los meristemas de la raíz antes del contacto de

ésta con las hifas. Para conocer qué procesos están implicados en este comportamiento se comparó a la mutante y la silvestre en esta misma condición (NR_S vs WT_S). Los procesos biológicos de metabolismo de carbohidratos, proteólisis, transporte transmembrana y de un solo organismo también procesos de oxidación-reducción fueron los principalmente inducidos. Así mismo, los procesos biológicos que se indujeron significativamente son los de metabolismo de carbohidratos y oxido-reducción; estos mismos procesos aparecen reprimidos de manera importante cuando comparamos la silvestre en la condición sin interacción versus crecimiento vegetativo (WT_S vs WT_C). Lo que podría significar que es necesario mantener reprimidos genes relacionados a estos proceso para establecer la simbiosis *T. atroviride*- *A. thaliana*.

En la comparación los genes de la cepa silvestre en interacción con la condición control (WT_I vs WT_C) se observó que se reprimen procesos de oxidación-reducción, proteólisis y metabolismo de carbohidratos, éste último de manera significativa, quizá porque como resultado de la asociación sea *A. thaliana* quien le proporcione los carbohidratos que *T. atroviride* necesita para subsistir.

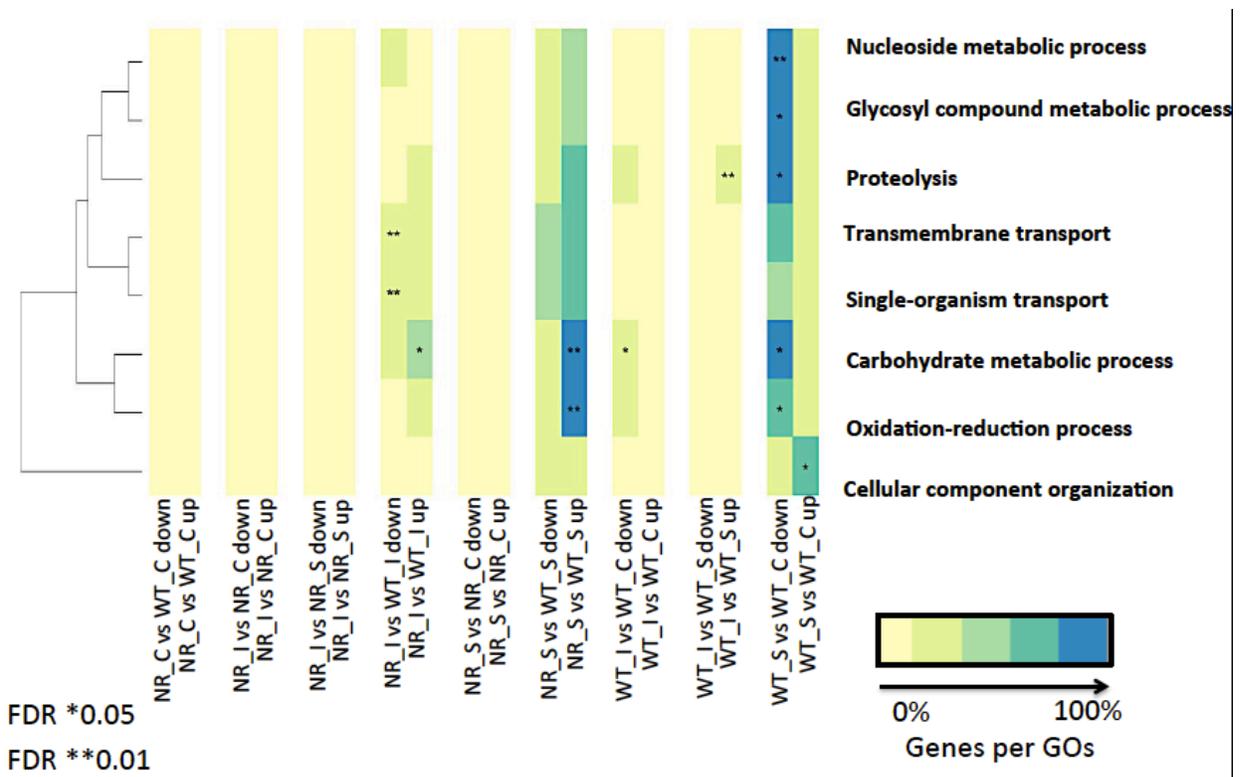


Ilustración 15. Heatmap de las categorías funcionales enriquecidas (* FDR <0.05; **FRD <0.001). La intensidad del color representa el porcentaje de genes inducidos o reprimidos del total que pertenecen a cada categoría.

Comportamiento de genes altamente contrastantes

Debido a que el fenotipo más drástico en la raíz de *A. thaliana* se observó antes del contacto de la mutante $\Delta noxR$, nos pareció necesario saber cuántos y cuáles genes eran compartidos en esta condición entre la cepa mutante y la silvestre, contrastando con la silvestre creciendo sola. De esta comparación se encontró que 6 genes son exclusivos de la condición antes del contacto, 13 genes son compartidos y 6 pertenecen al contraste de la cepa silvestre versus control de la misma (Ilustración 16).

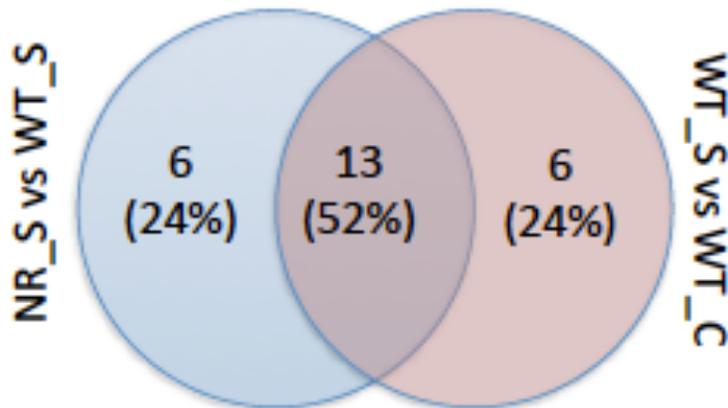


Ilustración 16. Diagrama de Venn muestra los genes más contrastantes en la comparación de $\Delta noxR$ y la silvestre antes del contacto vs la silvestre en esta misma condición pero comparada con el control WT sin planta.

Es interesante observar que, en el perfil transcripcional, el comportamiento de los genes es opuesto en la cepa silvestre y en la mutante. Mientras en la silvestre, antes del contacto, no se encuentran expresados, en la cepa silvestre creciendo sola (control), estos genes son altamente expresados. Sin embargo, en la condición en la interacción, aún antes del contacto, son reprimidos, mientras en $\Delta noxR$, el control observa un comportamiento similar al de la silvestre sin llegar a alcanzar su mismo nivel de expresión, y en la condición antes del contacto la mayoría de ellos se reprime, pero su expresión aumenta en interacción con la raíz, sin alcanzar el nivel de expresión del control de la cepa silvestre, lo que significa que estos genes en la mutante $\Delta noxR$ no son reprimidos. La mayoría de estos genes están involucrados en procesos de metabolismo (catabolismo), y el resto en procesos de oxido-reducción (Ilustración 15).

Dentro de estos genes tenemos dos proteasas. El primero, peptidasa G1/eqolisin, el comportamiento de este gen es opuesto en la mutante y en la silvestre. Este gen en la silvestre en crecimiento vegetativo se encuentra inducido, pero en interacción se ve reprimido, contrario a $\Delta noxR$, su actividad en la condición de interacción aumenta. Las Peptidasas G1/eqolisin son enzimas con actividad de proteólisis, y pueden contribuir a la nutrición del hongo (Merops.sanger.ac.uk, 2016). La segunda proteasa de igual forma en la silvestre se reprime de manera importante. Este gen es Crotonasa, cor /ClpP/crotonasa. La proteasa CLP, cataliza la hidrólisis de una unión amida en una proteína sustrato (Xiang *et al.*, 1999), en *E. coli* las

proteasas CLP están involucradas en la degradación selectiva de proteínas *in vivo* (Maurizi, *et al.*, 1990).

En la mutante $\Delta noxR$ de *T. atroviride* encontramos dos genes glucósido hidrolasas cuya actividad no se ve afectada en la condición en interacción, en cambio están reprimidos en la silvestre. La primera glucósido hidrolasa, es una quitinasa sitio activo. Se predice que la proteína, producto de este gen, posee actividad hidrolasa y participa en procesos relacionados al metabolismo de los carbohidratos. El segundo gen es el de una glucósido hidrolasa con dominio de unión a celulosa. La presencia de estas enzimas está ampliamente extendida entre los hongos saprófitos, que subsisten con polisacáridos de la pared celular vegetal, y juegan un rol en la conversión de celulosa a glucosa para la obtención de energía.

El gen que codifica para Acetil-CoA sintetasa-tipo/AMP-dependiente sintetasa/ligasa también está implicado en procesos de metabolismo. Éste no se vió reprimido en la mutante $\Delta noxR$ en la condición de interacción. Al igual que los anteriores ejemplos, el gen Piruvato descarboxilasa/indol piruvato descarboxilasa, en $\Delta noxR$ se observó que no era reprimido. IPDC (indolepyruvate decarboxylase) ha sido propuesta como una enzima clave en la biosíntesis de ácido indolacético (IAA), a partir del triptófano.

Por otra parte las reacciones de metilación pueden estar implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios por hongos que descomponen madera (Jeffers *et al.*, 1997). También se observó un gen que codifica para una O-metiltransferasa, COMT, que no se vio reprimido en la mutante $\Delta noxR$.

Adicionalmente se encontraron genes involucrados en procesos de oxidación y reducción que en la silvestre estaban reprimidos mientras que en la mutante no lo hacían. De ellos, tenemos el gen que codifica para una Alcohol deshidrogenasa GroES-like, que participa en procesos de óxido-reducción y también está involucrada en procesos de metabolismo con actividad catalítica. Los genes que codifican para NADH-flavin oxidoreductasa/NADH oxidasa, N-terminal, y Alfa/beta-hidrolasas están involucrados en procesos de oxido-reducción. Es establecido que NADH-flavin oxidoreductasa/NADH oxidasa, N-terminal están presentes en todos los microorganismos incluyendo bacterias marinas bioluminiscentes y también mamíferos y su principal actividad es la

de fungir como mediadores en la transferencia de electrones (Fontecave *et al.*, 1994 en Fieschi *et al.*, 1995). Este último gen en la mutante $\Delta noxR$ en el control y en la condición antes del contacto permaneció sin cambios, sin embargo en interacción fue inducido fuertemente lo que podría significar que el mantenimiento del balance redox es esencial para la función biológica que esté llevando a cabo.

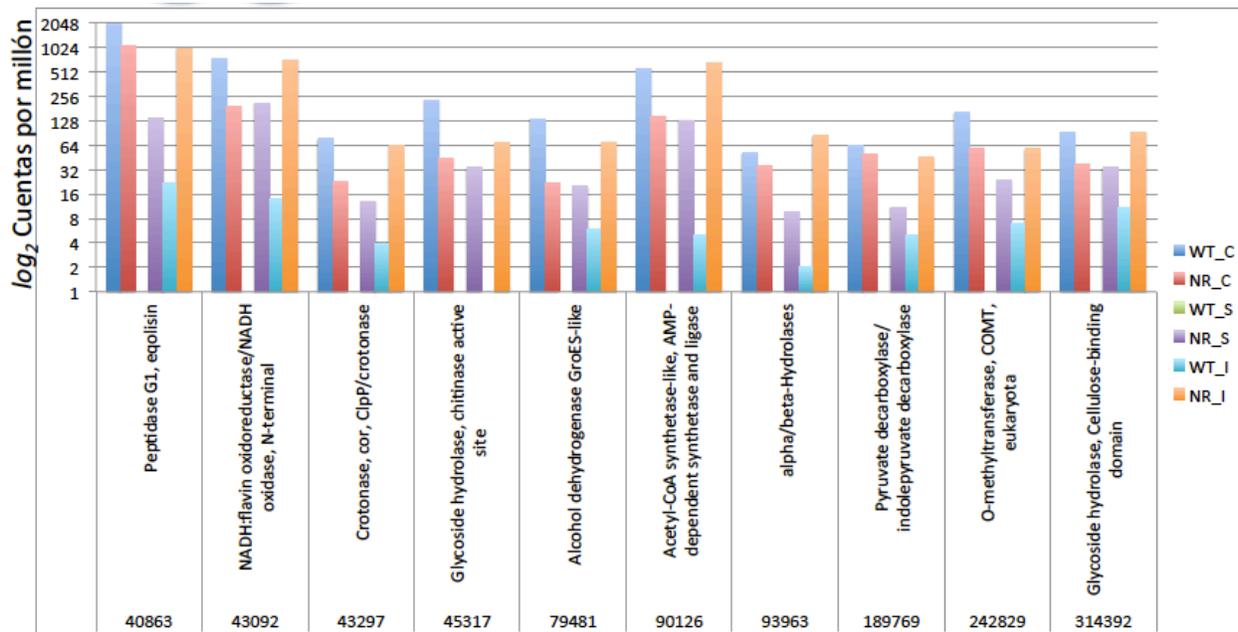


Ilustración 17. Perfil transcripcional de los 20 genes más contrastantes en cada comparación \log_2 FC superior a 10

IX. DISCUSION

En los últimos años el papel de las NADPH oxidasas de hongos fitopatógenos ha recibido gran atención, salvo en *E. festucae*, el papel que estas enzimas puedan estar desempeñando en asociaciones simbióticas es aún poco explorado. En el presente trabajo observamos que las funciones de $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ son relevantes, tanto en micoparasitismo como en interacción con *A. thaliana*, no así $\Delta nox2$, cuyo comportamiento en micoparasitismo parece más cercano al de la cepa silvestre. En *T. atroviride*, la pérdida de la capacidad antagónica ya había sido reportada debido a la ausencia de los genes *tgal* y *lae1* (Rocha-Ramírez et al., 2002 y Aghchegh et al., 2013). Los genes *lae1* y *vel1* son identificados como reguladores de antagonismo, a su vez, en *T. virens* el complejo VeL1/LAE1/VEL2 (VeA/LaeA/VeB) son reguladores globales de metabolismo y desarrollo.

La pérdida de la capacidad antagónica de *T. atroviride* por parte de las mutantes $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$ podría explicarse en el sentido de la alteración de vías metabólicas, relacionadas con la producción de metabolitos antifúngicos, llevando a su ausencia o a la interrupción de su biosíntesis. En *Trichoderma* se ha descrito que enzimas hidrolíticas como quitinasas, glucanasas y proteasas son parcialmente inducidas antes del contacto con el huésped (Hjeljord & Tronsmo, 1998 en Zeilinger, & Omann, 2007).

La participación de las isoformas de Nox en la producción de metabolitos también fue descrita en *Ganoderma lucidum*, en este hongo se encontró que las ERO generadas por Nox regulan positivamente la biosíntesis de ácido ganodérico (Mu et al., 2013). Sin embargo, en *T. atroviride*, en la mutante $\Delta nox2$ no se observó la pérdida de la capacidad antagónica, lo que podría significar que *nox1* es la responsable de la biosíntesis de compuestos antifúngicos, sin que la participación de *nox2* sea necesaria.

Las diferencias en los fenotipos observados para $\Delta nox1$ y $\Delta nox2$, tanto en micoparasitismo como en interacción con *A. thaliana*, podrían explicarse proponiendo que las funciones específicas de las dos subunidades catalíticas podrían requerir diferentes mecanismos de regulación y diferentes activadores o proteínas que se asocien al complejo, tal como lo proponen Lacaze et al. (2014) y Siegmund et al., (2014). En adición a lo anterior Detry et al. (2013), indicaron que las

propiedades en la secuencia de los genes *nox* en hongos difieren de los de humanos y plantas, sugiriendo que las diferencias entre las isoformas aún no son del todo conocidas.

Aunque no se tiene evidencia de la interacción directa entre las proteínas Pls1 y Nox2, se plantea que Pls1 podría suplir el papel de la proteína adaptadora p22^{phox} en su asociación con Nox2/B en hongos (Lacaze *et al.*, 2014). En relación a esto, alineamientos de la secuencia de SmPro41 de *Sordaria macrospora*, un ortólogo de NoxD en *P. anserina*, y de PaPls1 mostró una identidad del 95.7 % y un 55% respectivamente, con el genoma de *T. atroviride* (datos no mostrados). Indicando que cabe la posibilidad de que en *T. atroviride* se encuentre alguna (s) proteína(s) funcional (es), que puedan asociarse al complejo Nox 1/2, lo que añadiría nuevos componentes en el complejo de las NADPH oxidasas de *T. atroviride*. Lo antes descrito podría explicar las funciones específicas observadas en Nox1 y Nox2 en hongos, aunque ambas subunidades catalíticas probablemente están dotadas con idéntica actividad enzimática (Lacaze *et al.*, 2014).

En relación a la interacción de las mutantes en los genes *nox* con *A. thaliana*, encontramos que las tres mutantes fallan en el establecimiento de la simbiosis, el fenotipo más drástico se observa en $\Delta noxR$, cuyo daño a las plantas se observó antes del contacto de las hifas con la raíz. Las raíces en interacción con $\Delta noxR$ presentaron pérdida en su arquitectura típica y también la pérdida de identidad del centro quiescente.

En raíz, la proteína PIN1 controla el eflujo de auxinas en la estela, pero también su localización correlaciona con la regulación del gravitropismo (Xi *et al.*, 2016), mientras PIN2 controla el flujo de auxina desde el córtex (Jia *et al.*, 2015); PIN3 se localiza en células de la columnela, en células vasculares y periciclo, su reubicación también ha sido descrita en respuesta al estímulo de la gravedad, (Friml *et al.*, 2002 en Benková *et al.*, 2003), por último PIN7 se expresa en la membrana basal y lateral de células vasculares y coincide con PIN3 en la columnela.

La disminución de los niveles de PIN1, PIN2 y PIN7 correlaciona con la reducción en la expresión del marcador de respuesta a auxina DR5:GFP en raíces en interacción con las mutantes. En $\Delta noxR$, se observa un efecto aditivo, mientras la presencia de *nox1* compensaría la ausencia de *nox2* y viceversa, la ausencia de *noxR* resulta en la inhibición en la presencia y/o transporte de auxinas en raíz.

Evidencias previas indican que en bacterias fitopatógenas, hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum*, así como en rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas, la aplicación exógena de auxinas producidas por el microorganismo, potencian la susceptibilidad de las plantas a los fitopatógenos, así como también la represión de la señalización de auxina es parte del sistema de defensa de las plantas contra bacterias fitopatógenas (Spaepen & Vanderleyden, 2010). De este modo, las auxinas funcionan como un efectores que desencadenan susceptibilidad e inmunidad mediada por PAMPs. Las plantas reconocen MAMPs o PAMPs dependiendo del si se trata de organismos biotróficos o necrotrofos. Como muchas bacterias fitopatógenas producen IAA, se ha especulado que es parte de su estrategia para eludir las defensas de las plantas, pero esto también podría aplicar a microorganismo promotores de crecimiento, sin embargo qué determina la dirección hacia fitopatogénesis o fitoestimulación es otra pregunta fascinante (Spaepen & Vanderleyden, 2010).

En $\Delta noxR$, el gen codificante para una Piruvato decarboxilasa/indolpiruvato decarboxilasa no se encontró reprimido como en la silvestre, lo que apoya la hipótesis de un aumento en la síntesis de IAA1d, cuya presencia podría ser la señal y cuyo efecto sería la represión o disminución de auxinas en *Arabidopsis*, y de este modo inducir su sistema defensa mediado por AJ/ET y AS. También se ha postulado que la presencia de IAA en heridas de planta puede servir como señal para levaduras y hongos para percibir y adaptarse al ambiente de la planta (Prusty *et al.*, 2004 en Spaepen & Vanderleyden, 2010) de ahí que quizá como medio de defensa *A. thaliana* inhiba la presencia de auxina que se observó en raíz.

Cabe resaltar que el papel de los transportadores PIN1, PIN2 y PIN7 no es del todo claro, ya que como se observó, éstos se ven alterados principalmente en $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$. La alteración en la expresión de PIN1, PIN2, y PIN7 puede indicar que estas proteínas estén mediando una respuesta al estímulo provocado por $\Delta noxR$, más que al eflujo de auxina y al gravitropismo.

También se observó que, en presencia de $\Delta nox1$ y $\Delta noxR$, la arquitectura de la raíz era severamente afectada, y en presencia de $\Delta noxR$ se perdía la identidad del QC en la raíz principal. Parte de la explicación al fenotipo observado lo podemos encontrar en lo reportado por Zhang *et al.*, (2015), donde mostraron que la proteína ROW1 (REPRESOR OF WUSCHEL1) es

requerida para mantener la identidad del QC y el desarrollo del nicho de células madre. En las mutantes *row-1-3* observaron defectos severos en la arquitectura de la raíz y la pérdida de respuesta al gravitropismo y, esta pérdida de gravitropismo fue independiente de la señalización de auxinas. Así mismo, la pérdida de la arquitectura típica de la raíz también fue reportada *Arabidopsis* en condiciones limitantes de P, donde la disminución de la actividad mitótica en el meristemo de raíz primaria se correlaciona con la disminución en la respuesta a auxinas y el subsecuente agotamiento del meristemo (Sánchez-Calderón, 2016). Probablemente los metabolitos producidos por $\Delta noxR$ se encuentren participando en alguna vía de señalización de auxinas ya sea inhibiendo su biosíntesis y/o reprimiendo genes inducibles por auxinas.

El análisis transcriptómico mostró que, cuando comparamos la silvestre creciendo en ausencia del huésped (WT_C) con las condiciones antes de contacto e interacción (WT_S y WT_I), encontramos más genes que se reprimen que inducidos. Esto podría tener sentido desde que se ha descrito que *T. atroviride* es capaz de percibir la presencia de su huésped desde la distancia (Seidl *et al.*, 2009) y podría reprimir una serie de genes que se expresan constitutivamente en crecimiento vegetativo, mismos que a su vez codifican para la biosíntesis de metabolitos secundarios y enzimas líticas, iniciando de este modo un proceso de comunicación que lleve al establecimiento de la simbiosis.

En este sentido, observamos que en las condiciones en interacción vs antes del contacto de la silvestre (WT_I vs WT_S), se inducen genes relacionados a proteólisis, quizá esto se debe a una forma de defensa contra los metabolitos liberados por *A. thaliana*, pero de igual forma, los péptidos generados por la actividad proteolítica, podrían funcionar como señales que puedan mediar un diálogo molecular *T. atroviride* – *A. thaliana*. Así mismo, en la condición $\Delta noxR$ antes del contacto vs control (NR_S vs NR_C) se reprimen más genes (89) comparado con los que se inducen (55), quizá se reprimen genes que se expresan constitutivamente en la mutante, pero en $\Delta noxR$ en interacción se observan más genes inducidos con respecto al control y a la condición sin interacción, lo que podría significar que $\Delta noxR$ es capaz de percibir la presencia de *A. thaliana*. Sin embargo el número de genes que responden en la cepa silvestre es mucho mayor que en la mutante, lo cual podría indicar que $\Delta noxR$ prácticamente no puede responder a la presencia de la planta, si bien la percibe.

En base a los transcriptomas se sugiere que los procesos biológicos afectados en la mutante son los relacionados a transporte transmembrana y de un solo organismo, organización de componentes celulares y principalmente procesos de metabolismo, de entre ellos encontramos metabolismo de carbohidratos, proteólisis, oxido-reducción y metabolismo del compuesto glicosil. Los genes relacionados a estas categorías, en su mayoría se encontraban reprimidos en la silvestre, no así en $\Delta noxR$, donde se observó un comportamiento opuesto. Cambios metabólicos ya habían sido descritos antes en células tumorales, donde la función regulatoria de Nox1 en tumores hepáticos fue señalada por Bertram *et al.* (2015), donde se encontró que controla varias proteínas relevantes para la regulación del metabolismo de la glucosa, y también para la síntesis de lípidos y nucleótidos.

Genes que codifican para las proteasas, peptidasa G1/eqolisin y Crotonasa o enoil-CoA hidratasa podrían estar involucrados en la nutrición de la mutante $\Delta noxR$. También se ha descrito que las enzimas glucósido hidrolasas (GHs), liasas de polisacáridos (PLs) y carbohidrato esterasas (CEs) son, en su mayoría, enzimas secretadas, adaptadas a la exploración de la gran diversidad de carbohidratos presentes en el entorno exterior, como fuente de nutrientes (O'Connell *et al.*, 2012). Los genes Glucósido hidrolasa, y quitinasa participan en procesos de metabolismo de carbohidratos. Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de uniones de la beta-1,4-N-acetil-D-glucosamina (o N-acetilglucosamina) en los polímeros de quitina. (EMBL-EBI, 2016). La N-acetilglucosamina interviene en el reconocimiento celular, la adhesión celular y en la recepción de señales químicas. El segundo gen Glucósido hidrolasa, que posee dominio de unión a celulosa (CBD) en el módulo de unión a carbohidratos de la familia 1 (CBM1), tienen la función de conversión de celulosa a glucosa para la obtención de energía.

Interesantemente, Atanasova *et al.*, (2013) reportó que en eventos de micoparasitismo contra *R. solani*, *T. atroviride* reprime fuertemente genes de celulosas y hemicelulasas, parte de la interpretación que ellos le dieron a este comportamiento fue que *T. atroviride*, al detectar una presa potencial cambia la expresión de sus genes hacia un ataque, sin embargo en interacción con *A. thaliana*, la mutante $\Delta noxR$ no reprime estos dos genes que codifican para glucósido

hidrolasas, cuya función en hongos saprofitos es la conversión de celulosa a glucosa. Lo que sugiere que $\Delta noxR$ está utilizando a *A. thaliana* como una fuente para la obtención de glucosa.

Otro gen que participa en procesos de metabolismo es el que codifica para Acetil-CoA sintetasa-tipo/AMP-dependiente sintetasa/ligasa, el cual no se vio reprimido en la mutante $\Delta noxR$ en interacción con la planta. La función común de la sintetasa es producir acetil-CoA, que una vez formado, puede ser usado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en la respiración aerobia para producir energía, aunque también puede ser usado para la síntesis de ácidos grasos. También se observó un gen que codifica para una O-metiltransferasa, COMT. En plantas estas enzimas están involucradas en la biosíntesis de lignina, sin embargo en hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, se han descrito la presencia de dos O-metiltransferasas, una de ellas la 4-O-metiltransferase, se sugiere puede estar implicada en el catabolismo de productos de degradación de lignina (Coulter *et al.*, 1993) hacia componentes que puedan ser utilizados en su metabolismo, y la segunda, 3-O-metiltransferasa se sugiere tiene un papel en el metabolismo secundario. La lignina es el tercer componente principal de la pared celular en plantas, los otros dos son celulosa y hemicelulosa. La inducción de genes que degradan celulosa y lignina sugiere que $\Delta noxR$ está actuando utilizando estos polímeros como fuente para la obtención de glucosa partir de su degradación.

Genes que participan en procesos de oxidación y reducción como alcohol deshidrogenasa GroES like, no se vieron reprimidos en $\Delta noxR$. El piruvato, NADH y ATP son productos de la glicólisis. Bajo condiciones anaerobias, el piruvato experimenta fermentación para oxidar NADH a NAD⁺, para que la glicólisis pueda continuar. En la fermentación alcohólica, que ocurre en algunas levaduras, el primer paso involucra la enzima piruvato descarboxilasa. El piruvato es descarboxilado a acetaldehído. Este acetaldehído experimenta una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa para producir etanol, este es el paso en el cual el NAD⁺ es restaurado (Proteopedia.org, 2016). El NAD⁺ está implicado en procesos de óxido-reducción.

Por su parte la familia de proteínas alfa/beta hidrolasas ha llegado a ser rápidamente uno de los mayores grupos de enzimas estructuralmente relacionados con diversas funciones catalíticas. Estas enzimas poseen una triada catalítica Nucleofilo-His-Acido para operar en diferentes sustratos con

diferentes composiciones, propiedades fisicoquímicas en varios contextos biológicos (Holmquist, 2000) por lo que su función en la interacción aquí descrita no es del todo clara.

También es importante resaltar que la evidencia experimental ha establecido que el flujo de ERO y la regulación redox juegan un papel importante en muchos procesos biológicos (Finkel, 2011 en Mu et al., 2013) La actividad transferasa en leucocitos TNF activados se ve reducida por la inhibición de NOX. Esto sugiere un rol para la regulación redox de glicofomas de proteínas de membrana; la pérdida de glicofoma de proteína nativa puede ser activada directamente por daño oxidativo o por la vía de regulación redox en la síntesis de oligosacáridos, pero independientemente de la causa, la función proteica es usualmente afectada por la alteración de la glicofoma (Tarr *et al.*, 2012).

Recientemente, estudios realizados en tumores hepáticos por Bertram *et al.* (2015) identificaron 17 proteínas, las cuales fueron dependientes de los niveles de expresión de NOX1. Varias de ellas participan en el metabolismo de glucosa, glutamina, lípidos y ácidos nucleicos, lo que sugiere un posible rol de Nox1 en el remodelamiento metabólico, tal como se observó también en el presente trabajo.

Trichoderma atroviride y *T. virens* han sido descritos como microorganismos promotores de crecimiento en plantas (Contreras–Cornejo *et al.*, 2014), sin embargo un comportamiento opuesto fue observado en las tres mutantes de los genes *nox*, aunando a esto la incapacidad de las cepas mutantes de asociarse con la raíces de *A. thaliana* indican que se requiere de los tres genes para establecer y/o mantener el estatus de la simbiosis.

Es importante resaltar que el comportamiento de los genes compartidos indica que, mientras la cepa silvestre reprime estos genes según la condición, probablemente en beneficio de la simbiosis, esto no ocurre en la mutante $\Delta noxR$ en interacción con la planta, lo que podría indicar es capaz de percibir a *A. thaliana* pero no de responder a ésta, ya que como resultado se obtiene que la respuesta es opuesta a la simbiosis que exhibe la silvestre.

Los genes expresados en la mutante $\Delta noxR$ y que no se expresan en la cepa silvestre antes del contacto pertenecen en su mayoría a catabolismo, el papel de estos genes es en relación a la obtención de nutrientes por medio de proteasas, enzimas que degradan celulosa y lignina de la planta, similar al comportamiento observado en hongos fitopatógenos. Ejemplo de ello es que en *C. graminicola* dos genes que codifican para las enzimas alcohol deshidrogenasa tipo-GroES (GLRG_09714 y GLRG_05664) se encuentra fuertemente inducidos en la fase necrotrófica de la interacción. En *C. higginsianum* dos glucósido hidrolasas (CH063_13750 y GH063_10359) son fuertemente inducidas en la fase biotrófica. En *T. atroviride* se observó que genes que codifican glucósido hidrolasas y una alcohol deshidrogenasa en la silvestre se encontraban reprimidos, en la mutante $\Delta noxR$ no lo están, lo que en podría significar que el comportamiento en $\Delta noxR$ podría ser más cercano al de un hongo fitopatógeno.

En *T. atroviride* la mutante $\Delta noxR$ recapitula los fenotipos de $\Delta nox1$ y $\Delta nox2$, lo que significa que Nox1 y Nox2 no funcionan independientemente de NoxR. Así mismo, evidencia de la localización de NoxR durante la formación de la punta de la hifa y/o fusión de hifas en *P. anserina* resulta sumamente interesante, ya que sugiere que en este proceso NoxR podría actuar independientemente de Nox1; de igual forma la acumulación de PaNox1 en el retículo endoplasmático sugiere que podría tener un papel en este organelo independiente de PaNoxD y PaNoxR (Lacaze *et al.*, 2014).

Aún no se conoce cuál es el papel que tiene cada isoforma de Nox en la interacción *T. atroviride*-planta, pero en todos los hongos Nox1 y Nox 2 tienen claramente funciones distintas. De igual manera, aún es desconocido qué es lo que da especificidad en función a estas dos subunidades catalíticas (Lacaze *et al.*, 2014). NoxR funciona como switch que va de la interacción simbiótica a una antagonica. Algo similar a lo que se encontró en *E. festucae*, donde la ausencia de las NADPH oxidasas provoca la ruptura de la asociación mutualista.

En el presente trabajo no se analizó si las mutantes exhibían algún cambio en la ramificación y fusión de sus hifas. Sin embargo, se han reportado evidencias de que Nox regula la ramificación de las hifas en hongos como *E. festucae* y *S. sclerotium*, así como en el basidiomiceto *G. lucidum* donde las cepas silenciadas en *NoxA*, *NoxB*, *NoxAB* o *NoxR* mostraron un incremento en la

ramificación de las hifas (Mu *et al.*, 2013). En este sentido, en el fitopatógeno *M. oryzae* el trabajo de Ryder *et al.*, (2013) sugiere la existencia de una maquinaria especializada de penetración que involucra a Nox1 y Nox2, en un proceso de remodelación del citoesqueleto, el cual podría estar conservado en una amplia variedad de ascomicetos. Sin embargo, el papel que los genes *nox* pudieran estar desempeñando en la remodelación del citoesqueleto de *T. atroviride*, no fue explorado y sería interesante hacerlo.

Trichoderma produce compuestos que son reconocidos por las plantas como MAMPs (Hermosa *et al.*, 2012); sin embargo, los resultado aquí presentados sugieren que *T. atroviride* $\Delta noxR$ puede estar percibiendo a *A. thaliana* como un hospedero y una fuente de carbono. Así mismo, la inducción temprana de las vías de defensa mediados por AJ/ET y AS por las mutantes *nox*, sugiere un cambio de percepción por parte de la planta y el cambio de comportamiento de la mutante hacia la patogénesis. Sin embargo, aún queda por explorar la respuesta transcripcional de la planta a la mutante $\Delta noxR$.

También se ha hipotetizado que Nox, al ser una fuente de ERO probablemente puede funcionar como un sensor de oxígeno, regulando la expresión de genes dependientes de éste (Geiszt *et al.*, 2000). Una función de percepción que conduciría a la desregulación de vías de señalización dependientes de estrés oxidativo en las mutantes y en su incapacidad para inducir, activar, en incluso reprimir enzimas “scavenger” (Segmüller *et al.*, 2008).

X. CONCLUSIONES

- Los genes *nox1* y *noxR* son esenciales para el mantenimiento de la habilidad antagónica de *Trichoderma atroviride* contra hongos fitopatógenos.
- Los genes *nox* funcionan como un switch en el establecimiento de la interacción simbiótica hacia una antagónica en *T. atroviride*. La eliminación de estos genes provoca la ruptura de la asociación simbiótica.
- Las mutantes de los genes *nox* inducen respuestas de defensa tempranas en *A. thaliana*.
- Los cambios observados en la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*, así como la pérdida del centro quiescente, se deben principalmente a compuestos metabólicos producidos en consecuencia de la eliminación de los genes *nox1* y *noxR*.
- Las mutantes de los genes *nox* de *T. atroviride* son incapaces de colonizar la raíz de *A. thaliana*.
- Los procesos biológicos desregulados en la mutante $\Delta noxR$ están principalmente relacionados a transporte transmembrana y de un solo organismo, organización de componentes celulares y procesos de metabolismo de carbohidratos, proteólisis, oxido-reducción y metabolismo del compuesto glicosil.
- Genes involucrados en degradación de celulosa, lignina, proteólisis y de oxido-reducción son reprimidos en la silvestre, no así en $\Delta noxR$. Estos son necesarios para la obtención de nutrientes.

XI. PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en el presente trabajo ayudan a comprender en parte los mecanismos por los cuales *T. atroviride* establece su asociación con la planta y antagoniza otros hongos. Sin embargo, también plantea nuevos cuestionamientos. Durante la realización de este proyecto se observó que los genes *nox* son necesarios para el establecimiento de la simbiosis en *T. atroviride*, sin embargo, el papel biológico que cada isoforma desempeña aún no es identificado, por lo que es necesario llevar a cabo un escrutinio más detallado de su papel de la interacción.

El papel de cada uno de estos genes en el remodelamiento del citoesqueleto no fue explorado, por lo que conocer el comportamiento de actina y septina en desarrollo en las mutantes sería un análisis interesante.

La identificación de nuevos componentes del complejo Nox en otros hongos abre la posibilidad a explorar si éstos se conservan en *T. atroviride*. Para ello es necesario buscar e identificar ortólogos en el genoma de *T. atroviride* y generar las mutantes que permitan comparar los fenotipos con los de las mutantes *nox*.

Numerosos estudios en hongos sugieren un papel en metabolismos por parte de las isoformas Nox, sin embargo genes que actúan río arriba o río debajo de la vía de regulación de estos genes permanece sin resolver, por lo que encontrar genes candidatos que regulen la expresión de *nox*, no es una tarea sencilla. De igual forma identificar genes que se encuentren bajo el control de *nox*, permitiría esclarecimiento de las funciones biológicas de estos genes en *T. atroviride*.

El análisis transcriptómico nos permitió encontrar genes candidatos cuya expresión se ve afectada por la mutante $\Delta noxR$. Sin embargo, aún es necesario que sean validados, ya sea por RT-PCR o por medio de la generación de mutantes en *T. atroviride*.

Aún falta por conocer la respuesta de *A. thaliana* a la interacción con la mutante $\Delta noxR$, por lo que el análisis del transcriptoma podría ayudar a entender cómo es que está mediada esta respuesta y así entender mejor la percepción *Trichoderma*-planta.

XII. REFERENCIAS

Aghcheh, R., Druzhinina, I. and Kubicek, C. (2013). The Putative Protein Methyltransferase LAE1 of *Trichoderma atroviride* Is a Key Regulator of Asexual Development and Mycoparasitism. *PLoS ONE*, 8(6), p.e67144.

Aguirre A., Ríos-Momberg M., Hewitt D., Hansberg W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology* 13:111-118

Amorós Seller, B. (2008). RCY1: proteína nuclear relacionada con el estrés salino. [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/2501>

Atanasova, L., Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. and Druzhinina, I. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *BMC Genomics*, 14(1), p.121.

Bedard K., Krause K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87: 245–313.

Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. and Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 115(5), pp.591-602.

Bertram K, Valcu C-M, Weitnauer M, Linne U, Görlach A (2015). NOX1 Supports the Metabolic Remodeling of HepG2 Cells. *PLoS ONE* 10(3): e0122002. doi:10.1371/journal.pone.0122002

Bonfante P & Requena N (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14:451-457 doi 10.1016/j.pbi.2011.03.014

Borowicz VA (2001). Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant– pathogen relations? *Ecology* 82: 3057-3068. doi:10.2307/2679834.

Brotman Y, Landau U, Cuadros-Inostroza A´ , Takayuki T, Fernie AR, et al. (2013). *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. *PLoS Pathog* 9(3): e1003221. doi:10.1371/journal.ppat.1003221

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S., Lorito, M., Kubicek, C. and Mach, R. (2005). Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), pp.3959-3965.

Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W. and Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), pp.1352-1361.

Carsolio C., Gutiérrez A., Jiménez B., Van Montagu M., & Herrera-Estrella A. (1994). Characterization of ech-42, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 10903–10907.

Chacón, M. R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. & Delgado-Jarana, J. (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol* 10, 19–27.

Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.rec8247 Phosphate-buffered saline (PBS)

Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., Lopez-Bucio J.S., Lopez-Bucio J. (2014). Enhanced Plant Immunity Using *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, pp. 495-504.

Coulter, C., Kennedy, I. T., McRoberts, W. C. & Harper, D. B. (1993). Purification and properties of an S-adenosylmethionine 2,4-disubstituted phenol O-methyltransferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59, 706-711

Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol* 320:1-11.

Détry N., Choi J., Kuo H.-C., Asiegbu F. O. & Lee Y.-H. (2014). *In Silico* Sequence Analysis Reveals New Characteristics of Fungal NADPH Oxidase Genes. *Mycobiology*, 42(3), 241–248. doi:10.5941/MYCO.2014.42.3.241

Dirschnabel, D., Nowrousian, M., Cano-Dominguez, N., Aguirre, J., Teichert, I. and Kuck, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore Germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics*, 196(3), pp.729-744.

Dubey, M., Broberg, A., Jensen, D. and Karlsson, M. (2013). Role of the methylcitrate cycle in growth, antagonism and induction of systemic defence responses in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 159(Pt_12), pp.2492-2500. DOI 10.1099/mic.0.070466-0

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9, 749–759.

Eaton, C.J. (2009). Investigation of signalling involved in maintaining the mutually beneficial association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. Thesis of Doctor in Philosophy in Genetics. Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Egan M. J., Wang Z.Y., Jones M. A., Smirnoff N. and Talbot N. J. (2007) Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 104(28):11772-11777.

EMBL-EBI, I. (2016). *InterPro protein sequence analysis & classification < InterPro < EMBL-EBI*. [online] Ebi.ac.uk. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> [Accessed 12 Jul. 2016].

Fieschi, F., Niviere, V., Frier, C., Decout, J. and Fontecave, M. (1995). The Mechanism and Substrate Specificity of the NADPH:Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), pp.30392-30400.

Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415(6873), pp.806-809.

Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., & Murray, J. A. H. (2014). WOX5 Suppresses *CYCLIN D* Activity to Establish Quiescence at the Center of the Root Stem Cell Niche. *Current Biology*, 24(16), 1939–1944. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.019>

Gams, W. and Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In Ed.: C. Kubicek and G. Harman, ed., *Trichoderma and Gliocladium Volume 1 Basic biology, taxonomy and genetics*, 1st ed. USA, p.3.

Geiszt, M., Kopp, J., Varnai, P. and Leto, T. (2000). Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), pp.8010-8014.

Harman, G.E., 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377–393.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43–56.

Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. (2012) Plant- beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17-25.

Hermosa R., Cardoza R.E., Rubio M.B., Gutierrez S. Monte E. (2014) Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, pp. 125-137.

Holmquist, M. (2000). Alpha Beta-Hydrolase Fold Enzymes Structures, Functions and Mechanisms. *curr protein pept sci*, 1(2), pp.209-235.

Jeffers, M., McRoberts, W. and Harper, D. (1997). Identification of a phenolic 3-O-methyltransferase in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology*, 143(6), pp.1975-1981.

Jenik, P., Gillmor, C. and Lukowitz, W. (2007). Embryonic Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), pp.207-236.

Jia, Y., Tian, H., Li, H., Yu, Q., Wang, L., Friml, J. and Ding, Z. (2015). The *Arabidopsis thaliana* elongator complex subunit 2 epigenetically affects root development. *EXBOTJ*, 66(15), pp.4631-4642.

Kawahara, T., Quinn, M. T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 109. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-7-109>

Kayano, Y., Tanaka, A., Akano, F., Scott, B. and Takemoto, D. (2013). Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Genetics and Biology*, 56, pp.87-97.

Kim, H., Chen, C., Kabbage, M. and Dickman, M. (2011). Identification and Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH Oxidases. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), pp.7721-7729.

Lacaze I., Lalucque, H., Siegmund U., Silar P. and Brun S. (2014), Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22^{phox} NADPH oxidase subunit in fungi. *Molecular Microbiology*. doi: 10.1111/mmi.12876

Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 50: 1241–1255.

Lambeth, J.D. (2004). Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4, 181-189.

Lambou, K., Malagnac, F., Barbisan, C., Tharreau, D., Lebrun, M. and Silar, P. (2008). The Crucial Role of the Pls1 Tetraspanin during Ascospore Germination in *Podospira anserina* Provides an Example of the Convergent Evolution of Morphogenetic Processes in Fungal Plant Pathogens and Saprobies. *Eukaryotic Cell*, 7(10), pp.1809-1818.

Langmead, B., Salzberg, S. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9:357-359.

Malamy J.E., Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.

Maurizi, M.R., W.P. Clark, Y. Katayama, S. Rudikoff, J. Pumphrey, B. Bowers, S. Gottesman (1990). Sequence and structure of ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 265:12536-12545

McCarthy, D. J., Chen, Y., Smyth, G. K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucl Acids Res.* 40:4288-4297.

Merops.sanger.ac.uk. (2016). *MEROPS - the Peptidase Database*. [online] Available at: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=g1> [Accessed 17 Jul. 2016].

Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R., Gutierrez, S. and Monte, E. (2011). Functional Analysis of the *Trichoderma harzianum* nox1 Gene, Encoding an NADPH Oxidase, Relates Production of Reactive Oxygen Species to Specific Biocontrol Activity against *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), pp.3009-3016.

Mu, D., Li, C., Zhang, X., Li, X., Shi, L., Ren, A. and Zhao, M. (2013). Functions of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase family in *Ganoderma lucidum*: an essential role in ganoderic acid biosynthesis regulation, hyphal branching, fruiting body development, and oxidative-stress resistance. *Environ Microbiol*, 16(6), pp.1709-1728.

Nauseef W.M. (2013) Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.040>

Nauseef W.M. (2004) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4):277-291.

Nowrousian, M., Frank, S., Koers, S., Strauch, P., Weitner, T., Ringelberg, C., Dunlap, J., Loros, J. and Kück, U. (2007). The novel ER membrane protein PRO41 is essential for sexual development in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Molecular Microbiology*, 64(4), pp.923-937.

O'Connell, R., Thon, M., Hacquard, S., Amyotte, S., Kleemann, J., Torres, M., Damm, U., Buiate, E., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C., Becker, C., Birren, B., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J., Duvick, J., Farman, M., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A., Lebrun, M., Lee, Y., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J., Rounsley, S., Schardl, C., Schwartz, D., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U., Stüber, K., Sukno, S., Sweigard, J., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H., Voll, L., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M., Schulze-Lefert, P., Ver Loren van Themaat, E., Ma, L. and Vaillancourt, L. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9), pp.1060-1065.

Oshlack, A., Wakefield, M. J. (2009). Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biol Direct* 4:14.

Parker, J. (2009). The Quest for Long-Distance Signals in Plant Systemic Immunity. *Science Signaling*, 2(70), pp.pe31-pe31.

Proteopedia.org. (2016). *Pyruvate decarboxylase - Proteopedia, life in 3D*. [online] Available at: http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Pyruvate_decarboxylase [Accessed 31 Jul. 2016].

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140.

Robinson, M. D., Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* 11:R25.

Rocha-Ramirez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. and Herrera-Estrella, A. (2002). Trichoderma atroviride G-Protein α -Subunit Gene tga1 Is Involved in Mycoparasitic Coiling and Conidiation. *Eukaryotic Cell*, 1(4), pp.594-605.

Ryals, J. A., Urs, H. N., Williams, M. G, Molina, A., Steiner, H. Y., and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.

Ryder, L., Dagdas, Y., Mentlak, T., Kershaw, M., Thornton, C., Schuster, M., Chen, J., Wang, Z. and Talbot, N. (2013). NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), pp.3179-3184.

Sánchez Calderón, L. (2016). *Caracterización genética de las respuestas morfo-fisiológica del sistema radical de Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., a la deficiencia de fósforo*. M.C. (Tesis Doctoral). CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS, CAMPUS GUANAJUATO, UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA E INGENIERIA GENÉTICA.

Segmüller N., Kokkelink L., Giesbert S., Odinius D., van Kan J. and Tudzynski P. (2008) NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in Botrytis cinerea. *Molecular Plant– Microbe Interactions*. 21(6): 808-19.

Semighini, C.P., and Harris, S.D. (2008) Regulation of apical dominance in Aspergillus nidulans hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* 179: 1919–1932.

Scott, B., Takemoto, D. and Tanaka, A. (2007). Fungal Endophyte Production of Reactive Oxygen Species is Critical for Maintaining the Mutualistic Symbiotic Interaction Between Epichloë festucae and Perennial Ryegrass. *Plant Signaling & Behavior*, 2(3), pp.171-173.

Scott B., Eaton C.J. (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr Opin Microbiol*, 11:488-93.

Scott, B. (2015). Conservation of fungal and animal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complexes. *Molecular Microbiology*, 95(6), pp.910-913.

Schommer C., Palatnik J.F., Aggarwal P., Chételat A., Cubas P. (2008). Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLoS Biol* 6(9): e230. doi: 10.1371/journal.pbio.0060230

Shah J., Tsui F., Klessing D.F. (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 10: 69-78.

Seidl V, Song LF, Lindquist EA, Gruber S, Koptchinskiy A, Zeilinger S, Schmoll M, Martinez P, Sun J, Grigoriev I, Herrera-Estrella A, Baker SE, Kubicek CP (2009). Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the close presence of a fungal prey. *BMC Genomics*, 10:567.

Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. San Diego, California [etc.]: Academic Press. IX. p. 605

Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2010). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), pp.a001438-a001438.

Suh, Y-A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., Lambeth, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401, 79-82.

Sumimoto H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 275:3249-77.

Tanaka, A., Cartwright, G., Saikia, S., Kayano, Y., Takemoto, D., Kato, M., Tsuge, T. and Scott, B. (2013). ProA, a transcriptional regulator of fungal fruiting body development, regulates leaf hyphal network development in the *Epichloë festucae* - *Lolium perenne* symbiosis. *Molecular Microbiology*, 90(3), pp.551-568.

Tarr, J., Ding, N., Kaul, K., Antonell, A., Pérez-Jurado, L. and Chibber, R. (2012). Cellular crosstalk between TNF- α , NADPH oxidase, PKC β 2, and C2GNT in human leukocytes. *Cellular Signalling*, 24(4), pp.873-878.

Wang, L., Mogg, C., Walkowiak, S., Joshi, M. and Subramaniam, R. (2014). Characterization of NADPH oxidase genes NoxA and NoxB in *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36(1), pp.12-21.

Xi, W., Gong, X., Yang, Q., Yu, H. and Liou, Y. (2016). Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. *Nature Communications*, 7, p.10430.

Xiang, H., Luo, L., Taylor, K. and Dunaway-Mariano, D. (1999). Interchange of Catalytic Activity within the 2-Enoyl-Coenzyme A Hydratase/Isomerase Superfamily Based on a Common Active Site Template †. *Biochemistry*, 38(24), pp.7638-7652.

Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol* 11:R14

Yu J.H., Hamari Z., Han K.H., Seo J.A., Reyes-Dominguez Y., and Scazzocchio C. (2004) Double-Joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41(11):973-981

Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1, 227–234.

Zhang X, Krause K-H, Xenarios I, Soldati T, Boeckmann B (2013) Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional Diversification, and Signature Motifs. *PLoS ONE* 8(3): e58126. doi:10.1371/journal.pone.0058126

Zhang, Y., Jiao, Y., Liu, Z. and Zhu, Y. (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nature Communications*, 6, p.6003.

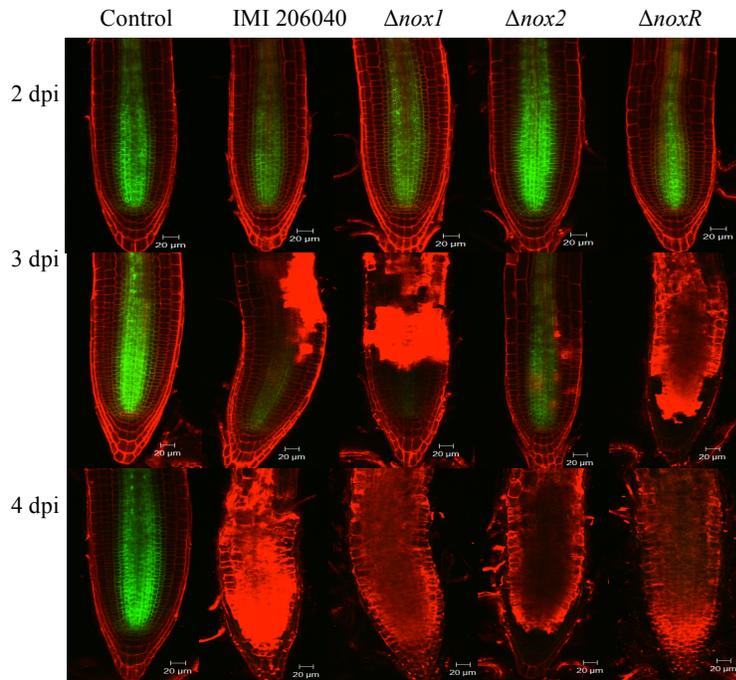
XIII. ANEXOS

ANEXO 1

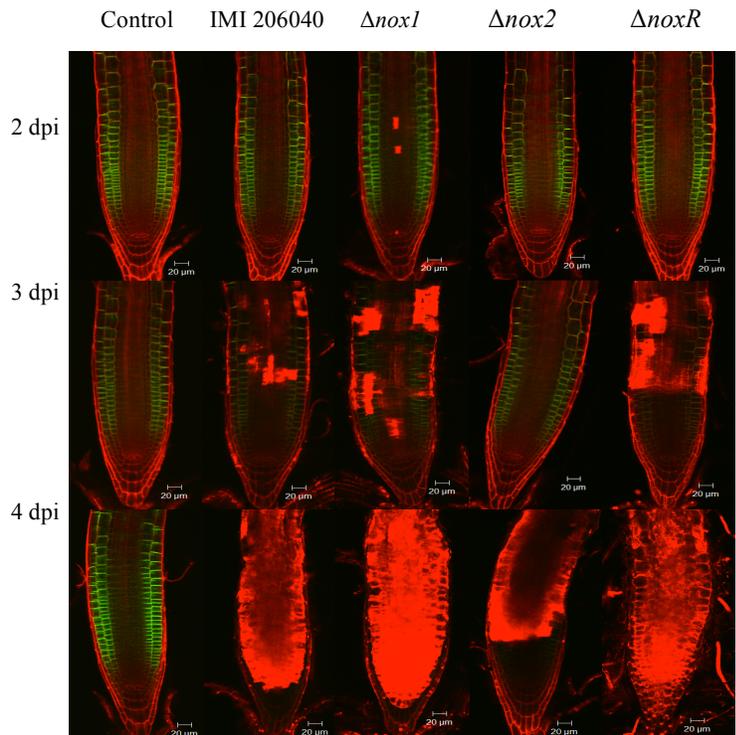
EXTRACCIÓN DE RNA TRIZOL

- 1.- Se tritura el tejido vegetal en nitrógeno líquido.
- 2.- Se añade 1 ml de TRIZOL por cada 100 mg de tejido, en este caso debido a la cantidad de muestra se usó solo 500µl.
- 3.- Se mezcla por inversión y se deja incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 4.- Se adiciona 1/5 de volumen total de Cloroformo (100 µl).
- 5.- Se agita en vortex bajo por 15 segundos, se incuba por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Se centrifuga a 4°C, 15 minutos a 12 000 rpm.
- 7.- Se transfiere la fase acuosa a un tubo de nuevo estéril y se adiciona un volumen de alcohol isopropílico para precipitar el RNA.
- 8.- Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se centrifuga a 4°C, 15 minutos a 12 000 rpm.
- 9.- Se elimina el sobrenadante, se adiciona 500 µl de etanol frío al 75% para lavar la pastilla.
- 10.- Se centrifuga a 4°C, 5 minutos, 7600 rpm. Se decanta el etanol.
- 11.- Se adiciona 500 µl de etanol frío al 70%, se centrifuga a 4°C, 5 minutos a 7600 rpm.
- 12.- Se desecha el sobrenadante y se deja secar las pastilla, para posteriormente disolverla con H₂O DEPC.

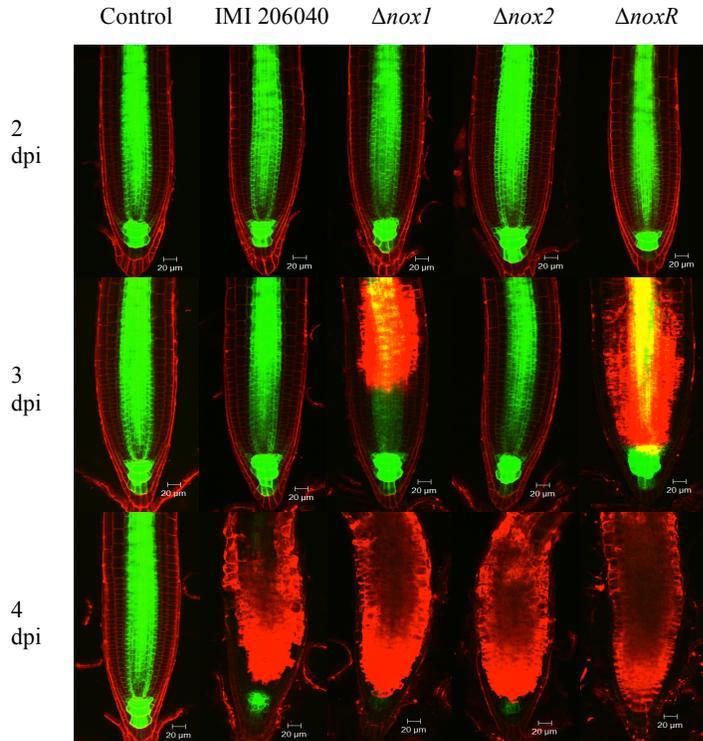
ANEXO 2



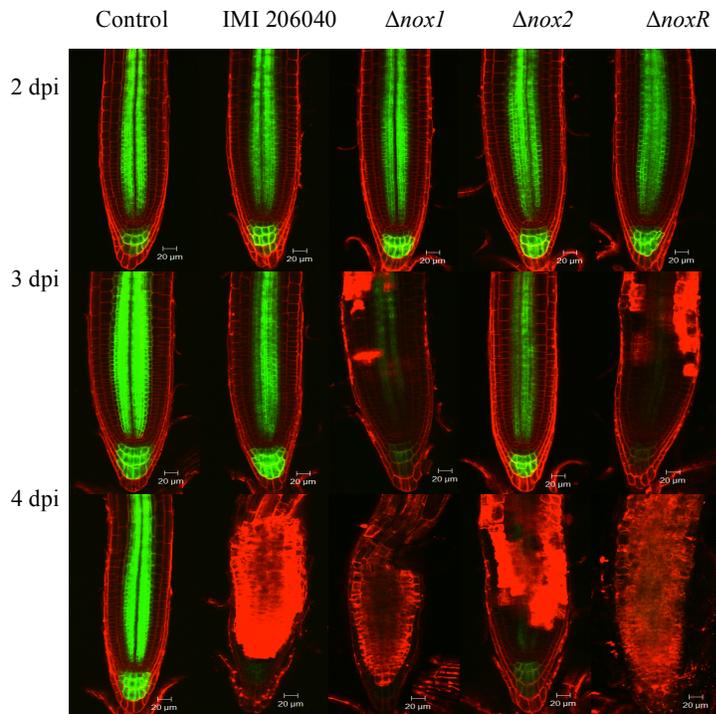
Micrografía confocal de la expresión de pPIN1::PIN1::GFP de *A. thaliana* en interacción con las mutantes de los genes *nox* a los 2, 3 y 4 dpi.



Micrografía confocal de la expresión de pPIN2::PIN2::GFP de *A. thaliana* en interacción con las mutantes de los genes *nox* a los 2, 3 y 4 dpi.



Micrografía confocal de la expresión de pPIN3::PIN3::GFP de *A. thaliana* en interacción con las mutantes de los genes *nox* a los 2, 3 y 4 dpi.



Micrografía confocal de la expresión de pPIN7::PIN7::GFP de *A. thaliana* en interacción con las mutantes de los genes *nox* a los 2, 3 y 4 dpi.