



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Irapuato

**“Función y transmisión horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S  
hospedados por *Rhizopus microsporus*”**

Tesis que presenta:

**IBT. Gonzalo Córdova López**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de:

**Biología Integrativa**

Directores de tesis:

**Dra. Laila Pamela Partida Martínez**

**Dr. Cei Abreu Goodger**

Irapuato, Guanajuato

Agosto, 2020

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, en el Laboratorio de Interacciones Microbianas del Departamento de Ingeniería Genética bajo la dirección de la Dra. Laila Pamela Partida Martínez. Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de los Proyectos Fronteras de la Ciencia FOINS-2015-01-006 y la beca 896786.

Este trabajo fue realizado de Marzo de 2018 a Marzo de 2020.

Miembros del Comité de Asesores:

Dr. Alfredo Herrera Estrella

Dr. Alexander de Luna Fors

**Fecha de examen de grado:** 27 de agosto de 2020

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), por la infraestructura proporcionada, la cual me permitió realizar mi proyecto de maestría.

Al programa de Biología Integrativa.

A la Dra. Laila Pamela Partida Martínez por su dedicación constante en la formación de nuevos estudiantes en la vida científica. Gracias por el apoyo brindado desde mis estudios de licenciatura. ¡Gracias!

Al Dr. Cei Abreu Goodger por la confianza que me brindó durante la realización de mi proyecto. Gracias por el gran apoyo brindado en el análisis de mis datos. ¡Gracias!

A los miembros de mi comité tutorial formado por los doctores Alfredo Herrera Estrella y Alexander de Luna Fors. Gracias por su valiosa retroalimentación para la correcta conclusión de este proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Interacciones Microbianas: Nelly, Silvana, Paco, Raúl, David, Astrid, Dani, Víctor, Liz y Valeria.

Especialmente gracias Silvana por tu gran apoyo emocional. Por tus enseñanzas científicas. Por ser mi guía personal desde mi arribo al laboratorio y a Irapuato.

Gracias Raúl por abrirme las puertas de tu casa y por agregarme a tu familia. Gracias por apoyarme durante estos años. Gracias por ser un gran amigo y mucho más. Gracias.

A los integrantes del Laboratorio de Genómica Computacional del ARN: Macros, Beto, Atenea, Mayra, Issac, Carlos y Erica.

Por su amistad y valiosa ayuda en estos años, muchas gracias.

Gracias al laboratorio que me adoptó como uno más de sus miembros: Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental. Especialmente gracias Abi, Jos, Nancy, Sandra y Hector. Además, a los miembros no oficiales: Vivi, Toño, Jey y Jonas, muchas gracias por su amistad.

Gracias a mis amigos tabasqueños: Denis, Karla, Valeria y Arlet. Gracias por siempre ser un refugio en mis tiempos de crisis.

## Dedicatoria

A mis padres Gonzalo y Ady, por el gran apoyo y amor que me otorgan diariamente. Gracias mis hermanos Jessica, Eddy y Karo. Gracias familia por ser un pilar fundamental en mi vida.

## Índice general

Índice general .....	4
Índice de tablas.....	7
Índice de Figuras .....	8
Abstract .....	9
Resumen.....	11
1 Introducción y marco teórico .....	13
1.1 La simbiosis en la evolución: El holobionte como una unidad de organización biológica .....	13
1.2 Los hongos también se consideran holobiontes .....	13
1.3 <i>Rhizopus microsporus</i> : el holobionte fúngico por excelencia.....	14
1.4 La alianza <i>Rhizopus</i> - <i>Mycetohabitans</i> spp. ....	17
1.5 Dos nuevos jugadores en el holobionte <i>Rhizopus microsporus</i> .....	18
1.6 Virus que infectan hongos: micovirus .....	20
1.7 La familia <i>Narnaviridae</i> : los virus más sencillos .....	21
1.7.1 Mitovirus .....	21
1.7.2 <i>Narnavirus</i> .....	22
1.8 Herramientas para el estudio de micovirus .....	22
1.9 El holobionte <i>R. microsporus</i> como modelo de estudio de <i>Narnavirus</i> y de las simbiosis hongo-bacteria-virus .....	23
2 Preguntas Biológicas .....	26
2.1 Pregunta Biológica 1 .....	26
2.2 Pregunta Biológica 2 .....	26
3 Hipótesis.....	26
3.1 Hipótesis 1.....	26
3.2 Hipótesis 2.....	26
4 Objetivos .....	26
4.1 Objetivo general .....	26
4.2 Objetivos específicos .....	26

5	Estrategia experimental.....	27
5.1	Cepas microbianas y condiciones de crecimiento.....	27
5.2	Secuencias cebadoras y detección de narnavirus .....	32
5.3	Ensayos de producción de biomasa .....	33
5.3.1	Inoculación e incubación.....	34
5.3.2	Colecta y conteo de esporangioesporas .....	34
5.4	Ensayos de transferencia horizontal de <i>Narnavirus</i> .....	34
5.4.1	Estrategia 1.....	35
5.4.2	Estrategia 2.....	36
5.5	Ensayos de multi-cultivo .....	38
5.5.1	Observaciones microscópicas .....	38
5.6	Análisis de datos .....	38
6	Resultados .....	40
6.1	Evaluar el efecto de los narnaviruses RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo y crecimiento de <i>R. microsporus</i> . .....	40
6.1.1	Efecto de los simbioses virales en la producción de biomasa de <i>R. microsporus</i> .....	40
6.1.2	Efecto de los <i>Narnavirus</i> en la reproducción asexual y sexual de <i>R. microsporus</i> .....	44
6.1	Investigar si los <i>Narnavirus</i> RmNV-20S y RmNV-23S pueden ser transmitidos horizontalmente a otros hongos. ....	48
6.1.1	Exploración de la fusión hifal en la especie <i>R. microsporus</i> como mediadora de la transmisión de los <i>Narnavirus</i> .....	49
6.1.2	La transmisión de los <i>Narnavirus</i> se lleva a cabo indistintamente de la compatibilidad sexual entre las cepas de la especie <i>R. microsporus</i> .....	53
6.1.3	Los <i>Narnavirus</i> también se pueden transferir a hongos no relacionados con <i>R. microsporus</i> .....	58
7	Discusión .....	61
7.1	Efecto de los <i>Narnavirus</i> RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo y crecimiento de <i>R. microsporus</i> . ....	61
7.2	Transmisión horizontal de los <i>Narnavirus</i> RmNV-20S y RmNV-23S a otros hongos .....	73

8	Conclusiones.....	82
9	Perspectivas.....	84
10	Referencias Bibliográficas.....	86

## Índice de tablas

Tabla 1.- Familias de micovirus descritas por Ghabrial <i>et al.</i> , (2015).....	20
Tabla 2.- Identificación y origen de las cepas fúngicas usadas en este estudio. ....	26
Tabla 3. Cebadores moleculares usados en este estudio. ....	31
Tabla 3.- Cepas usadas en los ensayos de transferencia horizontal. ....	33
Tabla 4.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de biomasa (Lote 1). ....	39
Tabla 5.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de biomasa (Lote2). ....	41
Tabla 6.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de esporangioesporas (Lote 1 y 2).....	43
Tabla 7.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de zigoesporas (Lote 2). ....	45

## Índice de Figuras

Figura 1.- Ciclo de vida de <i>R. microsporus</i> .....	15
Figura 2.- Descubrimiento de <i>Narnavirus</i> en <i>R. microsporus</i> .....	18
Figura 3.- Cuantificación de RmNV-20S y RmNV-23S a lo largo del desarrollo y reproducción de <i>R. microsporus</i> .....	23
Figura 4.- Arreglo en caja Petri del ensayo de multi-cultivo.....	36
Figura 5.- Producción de biomasa de la cepa 814 wt y sus variantes (primer lote). .	38
Fig 6.- Producción de biomasa de la cepa 814 wt y sus variantes (segundo lote). ....	40
Figura 7.- Efecto de la presencia de los <i>Narnavirus</i> en la producción de esporangioesporas durante el desarrollo asexual de <i>R. microsporus</i> .....	42
Figura 8.- Efecto de los <i>Narnavirus</i> en la producción de zigosporas durante el desarrollo sexual de <i>R. microsporus</i> (lote 2). .....	44
Figura 9.- Interacción en el co-cultivo entre la cepa 559 y la variante nv+ b-. .....	48
Figura 10.- Interacciones hifales exhibidas durante el multi-cultivo. ....	49
Figura 11.- Esquematación de la transferencia de los <i>Narnavirus</i> regida por la compatibilidad sexual. ....	51
Figura 12.- Evaluación de la transmisión de <i>Narnavirus</i> en los co-cultivos entre nv+ b y cepas silvestres de <i>R. microsporus</i> .....	53
Figura 13.- Evaluación de la transmisión de <i>Narnavirus</i> en los co-cultivos entre nv+ b y cepas silvestres de <i>R. microsporus</i> .....	54
Figura 14.- Evaluación de la transmisión de <i>Narnavirus</i> en los co-cultivos entre nv+ b y cepas fúngicas distintas a <i>R. microsporus</i> . ....	56
Figura 15. Propuesta de interacción biológica entre <i>R.microsporus</i> , <i>Mycetohabitans</i> spp., y los <i>Narnavirus</i> RmNV-20S y RmNV-23S. ....	67
Figura 16.- Propuesta del mecanismo de transmisión de los <i>Narnavirus</i> entre diferentes especies fúngicas.....	75



## Abstract

Macro and microorganisms set cooperative and/or competition relationships: symbiosis. Among them, the holobiont: the most intimate symbiotic outcome; where host and its microbiota there are no considered as individual entities and whose interaction determines its genetics and morphological features.

The holobiont definition has been widely used on animals and plants, but recently it has been expanded into the fungal kingdom, where the mutualistic association *Rhizopus microsporus*-*Mycetohabitans* spp., is bringing about the understanding of the fungal-bacterial interactions.

The fungus *R. microsporus* has been described in diverse ecological niches, being important at the ecological, economical (agriculture, food industry) and healthcare area. Pathogenic strains of the *R. microsporus* specie host an intracellular bacterium from the *Mycetohabitans* genus (*Burkholderia sensu lato*) which is vertically transmitted, responsible from rhizoxin production (a powerful antimetabolic agent), and has total control of the fungal asexual reproduction, therefore impacting its sexual reproduction. Recently, our working group unveiled the existence of two new players of viral origin in the intracellular environment of *R. microsporus*: the *Narnaviruses* RmNV-20S and RmNV-23S.

Virus infecting fungi (mycovirus) have been described in diverse fungal lineages, where their presence is generally associated with the virulence reduction of the host (hypovirulence). Until now, however, it has not been related any phenotype to virus from the *Narnavirus* genus. Thus, this study focused on evaluating the possible effect of the *Narnaviruses* RmNV-20S and RmNV-23S on the *R. microsporus* holobiont.

Mycovirus do not have an extracellular cycle, but they can be transferred to other fungi through vertical (reproduction structures) and/or horizontal transmission (hyphal fusion or “anastomosis”), displaying similar phenotypical effects to the original host. Hence, and since the *R. microsporus* specie is naturally widely distributed; this work also had as objective the evaluation of the possible horizontal transmission of the *Narnaviruses* RmNV-20S and RmNV-23S among fungi.

By means of fungal lines cured of the *Narnaviruses* and/or *Mycetohabitans* spp. In *R. microsporus*, we were able of determining that the *Narnaviruses* influence the asexual and sexual reproduction process of *R. microsporus*. on one hand, the presence of the viruses reduces the sporangiospores production. On the other hand, the interaction of the *Narnaviruses* together with *Mycetohabitans* is required to ensure the sexual reproduction of the fungal host. Without both symbionts the zygospores production is partially or totally diminished.

In addition, by means of the implementation and molecular analyses of co-cultures among the not sporulating donor strain of *R. microsporus* and strains of *R. microsporus*, *Trichoderma atroviride* and *Mucor circinelloides*, all of them naturally free of *Narnaviruses* (receiver), we revealed that the viruses are transferred to other fungi. Notwithstanding, in the *R. microsporus* specie we did not detected hyphal fusion structures, which suggest a horizontal transmission mechanism distinct to the anastomosis. In *T. atroviride* we also detected the presence of the viruses, however, the interaction among the donor strain and *T. atroviride* was mycoparasitic.

In summary, our results revealed, for the first time, the implication of viruses from the *Narnavirus* genus in the fitness of its host. Moreover, we were able of proving the horizontal transmission of the *Narnaviruses* RmNV-20S and RmNV-23S among strains of the *R. microsporus* specie. Aiming to a possible transmission mechanism not described in the fungal kingdom, further expanded by the mycoparasitism as a transmission process.

## Resumen

Macro y microorganismos establecen relaciones de cooperación y/o competencia: simbiosis. Dentro de ellas, el holobionte: resultado más íntimo de la simbiosis; donde el hospedero y su microbiota no se consideran entidades individuales y cuya interacción determina sus características genéticas y morfológicas.

El término holobionte ha sido ampliamente usado en animales y plantas, pero recientemente se ha expandido al reino fúngico, donde la asociación mutualista *Rhizopus microsporus*-*Mycetohabitans* spp., está contribuyendo al entendimiento de las interacciones fúngicas-bacterianas.

El hongo *R. microsporus* ha sido descrito en diversos nichos ecológicos, siendo importante a nivel ecológico, económico (agricultura, industria alimentaria) y en el sector de salud pública. Las cepas patógenas de la especie *R. microsporus* hospedan a una bacteria intracelular del género *Mycetohabitans* (*Burkholderia sensu lato*) la cual se transfiere verticalmente, es responsable de la producción del rhizoxin (un potente agente antimetabólico), y tiene total control de la reproducción asexual del hongo, impactando además su reproducción sexual. Recientemente, nuestro grupo de trabajo reveló la presencia de dos nuevos jugadores de origen viral en el espacio intracelular de *R. microsporus*: los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S.

Los virus que infectan hongos (micovirus) han sido descritos en diversos linajes fúngicos donde su presencia ha sido asociada generalmente con una reducción en la virulencia del hospedero (hipovirulencia). Sin embargo, actualmente no se ha asociado fenotipo alguno a los virus del género *Narnavirus*. Por ello, este estudio se centró en evaluar el posible efecto de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en el holobionte *R. microsporus*.

Los micovirus no poseen un ciclo extracelular, pero pueden ser transferidos a otros hongos mediante transmisión vertical (estructuras de reproducción) y/u horizontal (fusión hifal o “anastomosis”), exhibiendo efectos fenotípicos similares al del hospedero original. Por ello y desde que la especie *R. microsporus* se encuentra naturalmente con una amplia distribución; este trabajo también tuvo como objetivo evaluar la posible transmisión horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S entre hongos.

Mediante la generación de líneas fúngicas libres de los *Narnavirus* y/o de *Mycetohabitans* spp. en *R. microsporus*, fuimos capaces de determinar que los *Narnavirus* influyen en los procesos de reproducción asexual y sexual de *R. microsporus*. Por una parte, la presencia de los virus reduce la producción de esporangioesporas. Y, por otro lado, la interacción de los *Narnavirus* junto con

*Mycetohabitans* es requerida para asegurar el proceso de reproducción sexual de su hospedero fúngico. Sin ambos simbioses la producción de zigoesporas se compromete parcial o totalmente.

Además, a través de la implementación y análisis molecular de co-cultivos entre la cepa no esporulante de *R. microsporus* donadora de los *Narnavirus* (814 nv+ b-) y cepas de *R. microsporus*, *Trichoderma atroviride* y *Mucor circinelloides*, todas ellas naturalmente libre de *Narnavirus* (receptoras), revelamos que los virus son transferidos a otros hongos. No obstante, en la especie *R. microsporus* no detectamos estructuras de fusión hifal, lo que sugiere un mecanismo de transmisión horizontal distinto a la anastomosis. En *T. atroviride* también detectamos la presencia de los virus, sin embargo, la interacción entre la cepa donadora y *T. atroviride* fue micoparasítica.

En resumen, nuestros resultados revelan por primera vez la implicación de virus del género *Narnavirus* en la adaptación de su hospedero. Además, fuimos capaces de probar la transferencia horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S entre cepas de la especie *R. microsporus*. Apuntando a un posible mecanismo de transmisión no descrito en el reino fúngico, ampliado además por el micoparasitismo como proceso de transmisión.

# 1 Introducción y marco teórico

## 1.1 La simbiosis en la evolución: El holobionte como una unidad de organización biológica

En la naturaleza los organismos no se encuentran aislados, en cambio habitan e interactúan con una gran diversidad de individuos. La asociación entre dos o más organismos de diferentes especies se conoce como simbiosis, término acuñado por primera vez en 1879 por Anton de Bary. La simbiosis puede dividirse en: comensalismo, uno de los “socios” incrementa su adecuación sin dañar al otro socio; parasitismo, uno de los socios incrementa su adecuación reduciendo la adecuación del otro; y mutualismo, cuando ambos socios se benefician de la interacción al incrementar su adecuación. En términos de su localización, la simbiosis puede clasificarse como ecto- o endosimbiosis si el simbiote vive fuera o dentro del hospedero, respectivamente, y por su grado de dependencia puede ser simbiosis obligada o facultativa (Gil & Latorre, 2019).

La simbiosis ha sido una de las principales fuerzas evolutivas que ha guiado la vida en la tierra, siendo distribuidos actualmente muchos ejemplos a través del árbol de la vida. Como resultado, nuevas estructuras celulares y/o capacidades metabólicas son producidas, favoreciendo el mantenimiento de la asociación (Moya *et al.*, 2008). Este es mayormente el caso de las simbiosis mutualistas (Gil & Latorre, 2019) donde el hospedero más su microbiota no son consideradas como entidades individuales, sino un holobionte.

El término holobionte se refiere a una unidad de organización biológica (hospedero más simbiotes microbianos) con un hologenoma (hospedero + organelos + genomas microbianos) sobre los que procesos evolutivos actúan (Partida-Martínez, 2017; Bordenstein & Theis, 2015). Existen tres principios fundamentales en la teoría del holobionte: primero, los organismos multicelulares contienen una microbiota abundante y diversa; segundo, el genoma del hospedero y su microbiota pueden ser transmitidos a través de las generaciones; y tercero, la interacción del hospedero y su microbiota tiene un efecto en la adecuación del holobionte (Partida-Martínez, 2017).

## 1.2 Los hongos también se consideran holobiontes

La definición de holobionte ha sido ampliamente usada en animales y plantas. Probablemente en animales el sistema simbiótico mejor estudiado es el humano, donde el impacto que el consorcio microbiano ejerce sobre el hospedero le ha adjudicado el término de “órgano ignorado” (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Se estima que el número de microorganismos habitando un humano superan las células somáticas y germinales en aproximadamente 10 veces (Turnbaugh et al., 2013) y sus funciones implican la estimulación del sistema inmune, la síntesis de vitaminas, el almacenamiento de grasa, etc., (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

El microbioma asociado a plantas también juega un papel crucial en la biodisponibilidad de nutrientes, protección diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos, etc. Dichas funciones se encuentran delimitadas de acuerdo al compartimento de la planta (endósfera, filósfera y rizósfera) (Lee *et al.*, 2019; Rossmann *et al.*, 2017; Coleman-Derr et al., 2016; Fonseca-García et al., 2016), de los que el rizosférico ha sido ampliamente estudiado con un enfoque especial en micorrizas, las cuales colonizan un 85% de plantas terrestres (entre vasculares y no vasculares) (Strullu-Derrien *et al.*, 2018).

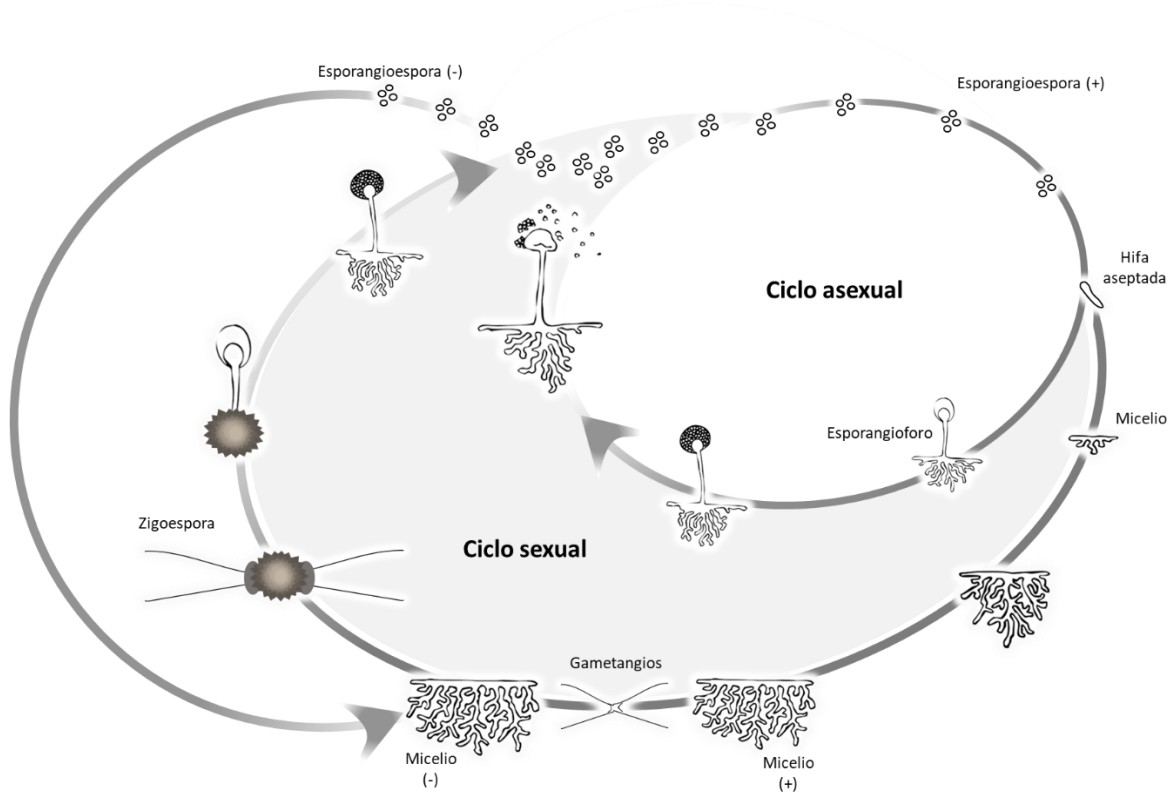
Dos décadas de estudio han revelado un factor muy importante en el establecimiento de las micorrizas: bacterias. Las nombradas “bacterias auxiliares micorrícicas”, BAM, han demostrado desplegar características funcionales significativas como la germinación de esporas, crecimiento micelial, reducción de estreses abióticos, estimulación de la nodulación y a su vez de la colonización de las raíces, entre otras. Un gran número de BAMs actúan de forma extracelular, pero existen otras que lo hacen como endosimbiontes fúngicos. Este es el caso para el hongo *Gigaspora margarita* y su endobacteria asociada *Candidatus Glomeribacter gigasporarum*. Para este hongo, la ausencia de su endobacteria compromete el desarrollo y el establecimiento presimbótico con la planta (Lumini et al., 2007).

A la fecha existen pocos ejemplos fúngicos que como en *G. margarita* y la asociación con su endobacteria las funciones de los participantes hayan podido revelarse, a pesar de que la investigación en este tipo de asociaciones se encuentre en aumento (Partida-Martínez, 2017). Esto se debe principalmente a que en la mayoría de las interacciones no se pueden separar los integrantes y por ello discernir las funciones individuales es complicado.

### 1.3 *Rhizopus microsporus*: el holobionte fúngico por excelencia

Las especies pertenecientes al género *Rhizopus* se encuentran ampliamente distribuidas en diversos nichos ecológicos, donde su oportunismo ha sido descrito en diversos sectores económicos y del sector salud. Sin embargo, existen también algunas especies que se utilizan para la preparación de alimentos y la producción de compuestos industriales de importancia.

Los hongos del género *Rhizopus* han sido clasificados como malezas microbianas y por ello su ciclo de vida transcurre en poco tiempo (Dolatabadi et al., 2014). Este proceso (Fig. 1) comprende la generación de micelio aseptado hialino, formación de esporangios anamórficos y la dispersión de las esporangioesporas en el caso de la reproducción asexual. Y por su naturaleza heterotálica expande el ciclo a la reproducción sexual, para el que un “compañero sexual” compatible es necesario con el objeto de formar la zigospora o espora sexual (Hoffmann et al., 2013).



**Figura 1.- Ciclo de vida de *R. microsporus*.** El ciclo de reproducción asexual se describe alrededor del ovalo blanco. El ciclo de reproducción sexual se describe alrededor del ovalo gris claro. La notación (+) y (-) describe el tipo de locus sexual en el hongo.

El género *Rhizopus*, es un grupo monofilético perteneciente al phylum Mucoromycota específicamente al subphylum *Mucoromycotina*, orden Mucorales y alberga 4 especies principales: *microsporus*, *stolonifer*, *arrhizus* y *delemar*; siendo *microsporus* la especie basal (Gryganskyi et al., 2018). Comparada con otros hongos, los miembros de la especie *R. microsporus* producen pocos metabolitos secundarios, pero interesantemente una droga anticancerígena: rhizoxin y varios de sus derivados se han aislado de diversas cepas (Jennessen et al., 2005; Partida-Martínez & Hertweck,

2005). La aplicación de esta droga es de gran importancia médica además de ser la causante principal de la pudrición blanda de las raíces de arroz.

En la búsqueda de los genes relacionados a la producción del rhizoxin, se encontró que el microorganismo productor no era *R. microsporus* sino una bacteria perteneciente al género *Burkholderia* (posteriormente nombrada como *B. rhizoxinica*) que lo habita intracelularmente (Partida-Martínez & Hertweck, 2005; Partida-Martínez *et al.*, 2007).

**Nota.** Previos estudios basados en características morfológicas, bioquímicas, el gen 16S rRNA y la hibridación del DNA sugirieron que los simbioses de *R. microsporus*, *B. rhizoxinica* y *B. endofungorum*, pertenecían al género *Burkholderia* (Partida-Martínez *et al.*, 2007). Recientemente y gracias al aumento de recursos genómicos, hoy ambas especies se encuentran clasificadas dentro de un nuevo género, *Mycetohabitans* gen. nov. (Santos *et al.*, 2018), por lo que desde este punto me referiré a las endobacterias del género *Rhizopus* como *Mycetohabitans* spp.

En un estudio posterior se encontró también que una bacteria intracelular del mismo género, *M. endofungorum*, es la real productora de los ciclopéptidos rizonin A y B previamente adjudicados a *R. microsporus* (Jennessen *et al.*, 2005; Partida-Martínez *et al.*, 2007). Gracias a estos descubrimientos, en el que el hongo fue curado de su endobacteria y reinfestado para corroborar la producción del compuesto por parte de la bacteria, pudo observarse que es también la bacteria quien controla el sistema de reproducción asexual del hongo (Partida-Martínez *et al.*, 2007; Partida-Martínez & Hertweck, 2007; Partida-Martínez *et al.*, 2007).

Dentro del phylum Mucoromycota, los subphyla *Glomeromycotina* y *Mortierellomycotina* presentan endosimbiosis con bacterias relacionadas a *Burkholderia* (Bonfante & Desirò, 2017). Pero es la asociación *Rhizopus-Mycetohabitans* spp., la cual ha sido encontrada en diversas zonas geográficas y nichos ecológicos (Lackner *et al.*, 2009). La capacidad de probar los postulados de Koch (con la capacidad de poder transformar genéticamente a la endobacteria) (Partida-Martínez & Hertweck, 2005; Partida-Martínez & Hertweck, 2007). Y la existencia de miembros de la especie *R. microsporus* naturalmente asimbioses, los que hacen de la asociación *R. microsporus-Mycetohabitans* spp., un excelente holobionte fúngico para entender la evolución e implicaciones de las simbiosis endofúngicas.



#### 1.4 La alianza *Rhizopus-Mycetohabitans spp.*

La producción del rhizoxin por parte de la bacteria abrió la ventana para el estudio de esta alianza. Hoy sabemos que su síntesis se lleva a cabo por un complejo multi enzimático híbrido de un policétido sintasa tipo I unido a un péptido sintetasa no ribosomal (NRPS-PKS) ubicado en un locus genético de 81 kb (Partida-Martínez & Hertweck, 2007).

El rhizoxin exhibe sus efectos inhibiendo la polimerización de la  $\beta$ -tubulina al unirse al aminoácido 100 (Asparagina) del extremo N terminal. Sin embargo, en Mucorales este residuo se encuentra ocupado por Alanina o Serina, confiriendo insensibilidad al antimetabólico. Bajo este enfoque, un estudio realizado por Schmitt *et al.*, en 2008, sugiere que esta resistencia pudo estar asociada a un contacto constante de la bacteria y el hongo que posteriormente dio paso a la endosimbiosis.

¿Qué procesos regulan la endosimbiosis? Es una de las preguntas principales en la búsqueda de los procesos que dieron origen y mantienen la simbiosis *R. microsporus-Mycetohabitans*. A la fecha, el escenario más plausible que dio paso a la simbiosis *Rhizopus-Mycetohabitans spp.*, implica un cambio de interacción antagonista a mutualista (Lackner, Moebius, & Hertweck, 2010; Schmitt *et al.*, 2008). En este contexto, la interacción de la bacteria con el hongo promueve en este último una serie de cambios lipídicos que derivan en la asociación simbiótica (Lastovetsky *et al.*, 2016). Para completar el proceso un sistema de secreción tipo 2 (T2SS) se encuentra implicado en la colonización endofúngica mediante un mecanismo de montaje e infección llevado a cabo por enzimas quitinolíticas (Moebius *et al.*, 2014). Además, un sistema de secreción funcional tipo III (T3SS), capaz de entregar efectores al citoplasma del hongo, es necesario para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis (Lackner *et al.*, 2010). Así mismo, durante el desarrollo sexual, la ausencia de los simbiosis bacterianos en ambos parentales reduce o nulifica la formación de zigoesporas. Bajo esta condición, varios genes potencialmente relacionados con la reproducción sexual muestran cambios significativos en su expresión, en especial el gen *ras2*, el cual codifica para una GTPasa central en el desarrollo reproductivo fúngico (Mondo *et al.*, 2017).

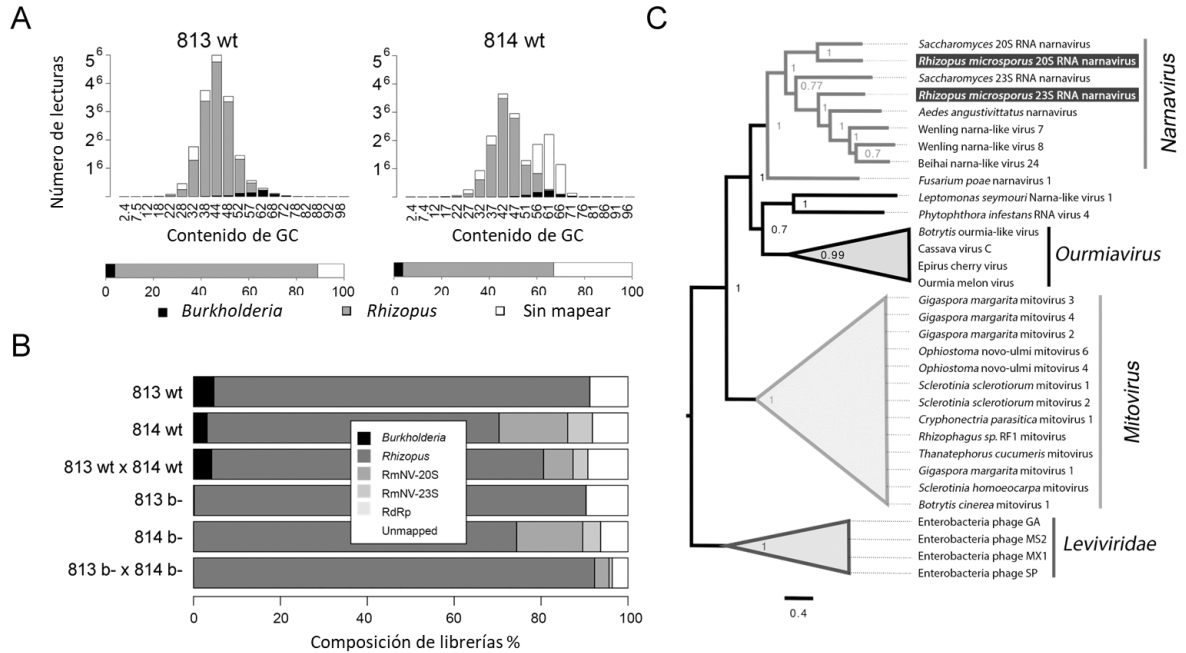
Aspectos inherentes a la adaptación de los integrantes durante la simbiosis también han sido estudiados. Mediante un enfoque genómico fue posible elucidar que el genoma bacteriano se encuentra en transición, es decir, se encuentra en una etapa temprana de adaptación intracelular. En este sentido, la bacteria posee un genoma

reducido, constando de un cromosoma y dos plásmidos. A pesar de esta reducción, aproximadamente el 30% de los genes identificados son únicos a la especie/género, lo que sugiere que podrían estar involucrados en la adaptación a la vida fúngica. En este contexto, *Mycetohabitans spp.*, posee todas las vías biosintéticas de producción de aminoácidos proteínogénicos, que pueden ser secretados, y además, tiene un potencial biosintético considerable en la producción de metabolitos secundarios que podrían participar en la comunicación entre bacterias o entre bacteria y hongo (Lackner *et al.*, 2011).

### 1.5 Dos nuevos jugadores en el holobionte *Rhizopus microsporus*

Aspectos genómicos de *Mycetohabitans spp.*, la secuenciación de los genomas de cepas de *R. microsporus*, así como la nueva clasificación de las bacterias endofúngicas dentro del género *Mycetohabitans* gen. nov., son buenos ejemplos del impacto de las “ciencias ómicas” en el estudio de sistemas biológicos. Gracias a estos avances fue posible aplicar un análisis transcripcional con el fin de estudiar los mecanismos moleculares que rigen la estabilidad de las simbiosis *Rhizopus-Mycetohabitans spp.* Dicho análisis se realizó con dos cepas de referencia de la especie *R. microsporus* (que junto a otras cepas de la especie con/sin *Mycetohabitans spp.*, sus genomas se encuentran disponibles), hospedantes de la endobacteria *M. rhizoxinica*, y compatibles sexualmente: ATCC52814 (814) sexo negativo (-) y ATCC52813 (813) sexo positivo (+); contemplando la evaluación de las cepas en su forma wt y curadas de su endobacteria (Bermúdez Barrientos *et al.*, tesis de maestría 2016).

Durante el análisis se establecieron un total de 6 librerías las cuales se dividieron en con y sin *M. rhizoxinica* (wt y b- respectivamente). Estas librerías contemplaron evaluar 2 condiciones principales: 1, el perfil transcripcional de las cepas wt contra curadas de *M. rhizoxinica* durante el desarrollo asexual; y 2, el perfil transcripcional de las cruces sexuales entre las cepas 814 y 813 en su condición wt contra curadas de *M. rhizoxinica*.



**Figura 2.- Descubrimiento de Narnavirus en *R. microsporus*.** **A)** Distribución de lecturas de RNA-Seq en las librerías de las cepas 813 wt y 814 wt por contenido de GC. **B)** Porcentaje de lecturas que mapean a *Burkholderia* sensu lato, *Rhizopus*, *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S, RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp), y lecturas sin mapear a través de todas las librerías. **C)** Árbol filogenético de proteínas seleccionadas de RdRp virales. *Modificado de Espino-Vázquez et al., (2020).*

A manera de un análisis de rutina, y aprovechando los recursos disponibles (genomas de *R. microsporus* y *M. rhizoxinica* B1), se evaluó la distribución del contenido de GC en las lecturas, en el cual un contenido diferente a *R. microsporus* (37%) y *M. rhizoxinica* (59%) fue observado (60.27%) (Fig. 2A) en, y solamente en, las librerías que involucraban a la cepa 814. Estas lecturas conformaron 4.0-21.5% de la totalidad de las librerías y un ensamble *de-novo* reveló que dos contigs de un único marco de lectura abierta (ORF) de origen viral que codifica para una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) contienen la vasta mayoría de estas lecturas, las cuales representan 6.8 veces más que las de *M. rhizoxinica* en la cepa 814 (Fig. 2B). Un análisis filogenético de proteínas de estas RdRps mostró que pertenecen al género *Narnavirus*, familia *Narnaviridae* (Fig. 2C). Con uno de ellos teniendo mayor relación con el virus *Saccharomyces* 20S RNA *Narnavirus* y el segundo con el virus *Saccharomyces* 23S RNA *narnavirus*. Por ello los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus* fueron nombrados *R. microsporus* 20S RNA *Narnavirus* (RmNV-20S) y *R. microsporus* 23S RNA *Narnavirus* (RmNV-23S) (Espino-Vázquez et al., 2020; Bermúdez Barrientos, 2016).

## 1.6 Virus que infectan hongos: micovirus

Los virus que infectan hongos son conocidos como micovirus, y al igual que los virus que infectan plantas y animales, necesitan de las células vivas de otro organismo para poder replicarse (Son *et al.*, 2015). Aunque el estudio de los micovirus comenzó hace aproximadamente cinco décadas, se cree que su incidencia en hongos es muy antigua (Ghabrial *et al.*, 2015). Los micovirus están distribuidos en todos los phyla fúngicos: Chytridiomycota, Ascomycota, Deuteromycota, Basidiomycota, Mucoromycota y Zoopagomycota (Son *et al.*, 2015).

Se estima que los micovirus infectan de un 30 a un 80% de la totalidad de especies fúngicas existentes. A pesar de su amplia gama de hospederos, no se conocen vectores de transmisión (artrópodos o anélidos). Además, no poseen proteínas de movimiento y por ello no tienen un ciclo extracelular; lo que los hace totalmente dependientes de los procesos de transmisión vertical (reproducción asexual y sexual) y horizontal (anastomosis) del hospedero para poderse diseminar (Ghabrial *et al.*, 2015).

La mayoría consisten de un genoma de doble cadena de RNA (dsRNA) mientras que un 30% se compone de una única cadena de RNA positiva (+ssRNA) y solamente se conoce un micovirus de DNA lineal (ssDNA). Los micovirus se encuentran clasificados en siete familias, de genoma dsRNA y cinco familias de +ssRNA (Son *et al.*, 2015), de acuerdo a sus características genéticas y sus relaciones filogenéticas (Tabla 1).

**Tabla 1.- Familias de micovirus descritas por Ghabrial *et al.*, (2015).**

Familia	Géneros	Genoma	Tamaño (kb)
<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i> <i>Victorivirus</i>	dsRNA	4.6-7
<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphapartivirus</i> <i>Betapartivirus</i> <i>Gammapartivirus</i>	dsRNA	1.4-2.4
<i>Megabirnaviridae</i>	<i>Megabirnavirus</i>	dsRNA	~7
<i>Chrysoviridae</i>	<i>Chrysovirus</i>	dsRNA	2.4-3.6
<i>Quadriviridae</i>	<i>Quadrivirus</i>	dsRNA	3.7-4.9
<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus</i>	dsRNA	0.7-4.1
<i>Endornaviridae</i>	<i>Endornavirus</i>	dsRNA	14-17
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Botrexvirus</i>	+ssRNA	~7

	<i>Sclerodarnavirus</i>		
<i>Barnaviridae</i>	<i>Barnavirus</i>	+ssRNA	~4
<i>Gammaflexiviridae</i>	<i>Mycoflexiviru</i>	+ssRNA	~6.8
<i>Hypoviridae</i>	<i>Hypovirus</i>	+ssRNA	9-13
<i>Narnaviridae</i>	<i>Mitovirus</i> <i>Narnavirus</i>	+ssRNA	2.3-3.6

Los micovirus son conocidos por su capacidad de producir cambios dramáticos en sus hospederos como son: crecimiento irregular, pigmentación anormal y la alteración de la reproducción sexual (Son *et al.*, 2015). Y sin duda, una característica muy atractiva desde el punto de vista antropogénico es la capacidad de conferir hipovirulencia en hongos patógenos, es decir, de decrementar la capacidad del hongo de infectar, colonizar y matar (Nuss, 2005).

Si bien, la hipovirulencia es el fenotipo más contrastante adjudicado a la presencia de los micovirus, es también sabido que gran parte de ellos se mantienen asintomáticos (Ghabrial *et al.*, 2015), y existen además algunos ejemplos en los que su presencia potencia la adecuación de su hospedero. Este es el caso para el micovirus *Saccharomyces cerevisiae* L-A del género *Totivirus* que codifica toxinas asesinas que le proveen a su hospedero mayores capacidades competitivas (King *et al.*, 2012). De igual forma se encuentra el caso de un micovirus del hongo endófito *Curvularia protuberata* el cual confiere termotolerancia a su hospedero fúngico, y a su vez el hongo a la planta hospedante, *Dichanthelium lanuginosum* (Márquez *et al.*, 2007).

### 1.7 La familia *Narnaviridae*: los virus más sencillos

Los miembros de la familia *Narnaviridae* se diferencian de otros micovirus por su sencillez genómica. Estos virus consisten de una molécula no encapsidada de ssRNA (+) de entre 2.3 y 2.9 kb, la cual codifica únicamente para una RdRp de entre 80 y 104 KDa que le ayuda a dirigir su propia replicación. Como se mencionó anteriormente, la familia *Narnaviridae* hospeda dos grupos: *Mitovirus* y *Narnavirus* (Hillman & Cai, 2013).

#### 1.7.1 Mitovirus

Los miembros de este género se encuentran distribuidos entre los hongos filamentosos de los phyla Ascomycota y Basidiomycota. Son los únicos virus que se sabe infectan mitocondrias dentro de los organismos eucariotas (Milgroom & Hillman,

2011), y dentro de sus ejemplares algunos producen hipovirulencia. Como en la mayoría de los micovirus, los *Mitovirus* son transmitidos vía vertical y por transmisión horizontal.

### 1.7.2 *Narnavirus*

Contrario a los miembros de los *Mitovirus*, los virus del género *Narnavirus* no se encuentran limitados al reino fungal (Fig. 2C). Se encuentran confinados al citoplasma del hospedero y no exhiben un fenotipo relevante asociado a su presencia en *S. cerevisiae*, el único sistema biológico en el que se ha estudiado. Es gracias al estudio en *S. cerevisiae* que se conoce que: forman un complejo riboproteico 1:1, se replican de forma estable durante el desarrollo y aumentan bajo condiciones de estrés como la escasez de nitrógeno (hasta 100, 000 copias/célula). Los *Narnavirus* se pueden transferir vertical (a través de mitosis y meiosis) y horizontalmente (durante la citoducción usando mutantes cariogamicas) (Esteban & Fujimura, 2003; King et al., 2012; Solórzano et al., 2000).

## 1.8 Herramientas para el estudio de micovirus

Debido a que los micovirus no tienen una ruta de transmisión extracelular probar los postulados de Koch es un reto. Dada esta problemática, una serie de metodologías han sido desarrolladas, entre ellas destacan: la transmisión horizontal, la cual consiste en infectar un organismo fúngico libre de virus con el mismo fondo genético que el organismo infectado. Este método aprovecha la compatibilidad vegetativa entre cepas que induce la fusión de hifas y la posterior transmisión del contenido citoplasmático de ambos organismos (García-Pedrajas et al., 2019). Dicho mecanismo parece ser viable, pero cabe la posibilidad que el efecto final observado no sea dado únicamente por el micovirus, sino por una serie de recursos genéticos y moleculares que ya se encuentren afectados (Milgroom & Hillman, 2011).

Aprovechando que la mayoría de los micovirus poseen cápside, existe otra metodología que implica aislar estas partículas para posteriormente infectar protoplastos de organismos fúngicos libres de virus. Esta parece ser una de las técnicas más viables, no obstante, este proceso no se puede utilizar con micovirus que no poseen cápside como los de las familias *Hipoviridae* y *Narnaviridae*. Para estos casos, la generación de clonas infecciosas de cDNA resultan muy útiles para infectar protoplastos, pero también resultan inviables en el caso de micovirus multi segmentados (García-Pedrajas et al., 2019). Por esta razón múltiples metodologías para curar los organismos infectados también han sido desarrollados.

Dichas técnicas se basan en la fragmentación micelial y subcultivos con el objeto de obtener líneas fúngicas libres de virus (Song *et al.*, 2016). Generalmente, estas metodologías hacen uso de tratamientos antivirales para asegurar la reducción de la carga viral. Los antivirales más usados son ribavirin, un análogo estructural de guanosina que inhibe la síntesis viral (Xu & Yamamoto, 2017); y cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas que bloquea la elongación de la traducción en organismos eucariotas (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). Aunque estas metodologías han demostrado ser efectivas, no todos los virus pueden ser curados (Cai, Myers, Fry, & Hillman, 2012; King *et al.*, 2012) sugiriéndose que pueden ser hospedero dependientes (Espino-Vázquez *et al.*, 2020).

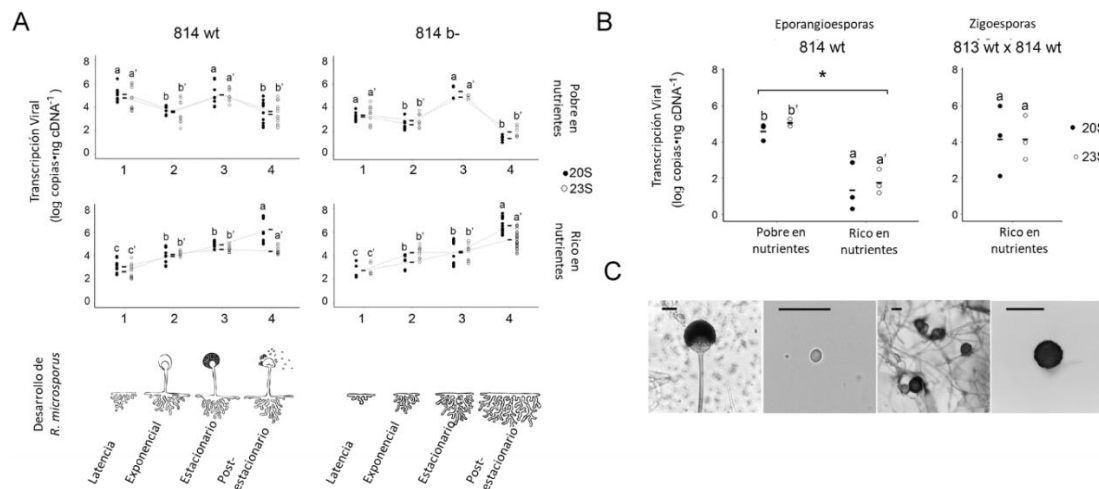
### 1.9 El holobionte *R. microsporus* como modelo de estudio de *Narnavirus* y de las simbiosis hongo-bacteria-virus

Como fue mencionado anteriormente, el holobionte fúngico *Rhizopus microsporus* hospeda un endosimbionte bacteriano y gracias a los esfuerzos de Bermúdez Barrientos (estudiante de maestría en el posgrado de Biología Integrativa, y miembro del Laboratorio de Interacciones Microbianas -LIM- del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Cinvestav, unidad Irapuato), se descubrió la presencia de dos virus miembros del género *Narnavirus*.

Este holobionte fúngico ha demostrado ser muy eficiente para revelar los misterios de las alianzas fúngicas-bacterianas, en las que la generación de cepas libres de *Mycetohabitans* spp. es posible con el uso de antibióticos (Partida-Martínez & Hertweck, 2005), y ahora con el descubrimiento de hospederos virales se pone una vez más a prueba. Para ello, La Dra. Astrid N. Espino Vázquez, miembro posdoctoral del LIM, logró por primera vez generar un organismo fúngico libre de virus del género *Narnavirus* (Espino-Vázquez *et al.*, 2020). Este gran avance fue logrado con la aplicación de tratamientos antivirales haciendo uso de ribavirin y cicloheximida. Ahora el escrutinio de las funciones genotípicas y fenotípicas dadas por la presencia de *Narnavirus* en el holobionte fúngico es posible.

Tomando ventaja de estos recursos biológicos y como un primer acercamiento se reveló que: los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S se transcriben de forma similar en medios bajo y enriquecido de nutrientes, pero el número de copias virales se ven afectadas por el estado de desarrollo, el sustrato y la presencia o ausencia de *Mycetohabitans* spp. Específicamente, la replicación viral es menor en el estado de desarrollo pos-estacionario en ausencia de la endobacteria (en medio pobre en

nutrientes). En el caso del medio rico, las copias virales solo fueron afectadas por el estado de desarrollo del hongo, durante el cual la carga viral aumentó de 1500 a 4.5 millones de copias virales por ng de cDNA (Fig. 3A). Además, fue también posible confirmar que la transmisión vertical se encuentra asegurada para los *Narnavirus*, ya que son detectables en esporangioesporas y zigoesporas (Fig. 3B, C), sin embargo la transmisión horizontal permanece sin resolver (Espino-Vázquez *et al.*, 2020).



**Figura 3.- Cuantificación de RmNV-20S y RmNV-23S a lo largo del desarrollo y reproducción de *R. microsporus*.** **A)** Cuantificación absoluta de RmNV-20S y RmNV-23S en las cepas 814 wt y 814 b- crecidas en los medios de acetato de potasio (pobre en nutrientes) y PDA a mitad de concentración (rico en nutrientes). En el eje x, desarrollo fúngico. Cada punto corresponde a una medición viral. Las barras indican la media aritmética, las líneas punteadas muestran la tendencia, las letras indican las diferencias estadísticas entre los estados de desarrollo entre RmNV-20S (20S) o RmNV-23S (23S), respectivamente. **B)** Transmisión vertical de los *Narnavirus* en esporas sexuales y asexuales. No se encontraron diferencias estadísticas entre los *Narnavirus* entre esporangioesporas y zigoesporas, pero si se encontraron diferencias en la carga viral de las esporangioesporas entre los medios pobres y ricos en nutrientes. **C)** Micrografías de las estructuras reproductivas fúngicas. De izquierda a derecha: esporangióforo, esporangioespora, zigoespora formada durante el desarrollo sexual, y zigoespora. Modificado de Espino-Vázquez *et al.*, (2020).

Los hongos del género *Rhizopus* son conocidos como organismos descomponedores, contaminantes de una amplia variedad de productos alimenticios y agrícolas; y como agentes infecciosos de humanos y animales, provocando mucormicosis (Dolatabadi *et al.*, 2014). Bajo este contexto, los virus han demostrado jugar un papel importante en el ciclo de carbono. Guiando además la evolución microbiana a través de la selección natural debido a su “infección”, y siendo también grandes factores de



transferencia horizontal de genes (Rohwer, Prangishvili, & Lindell, 2009). Por ello, y considerando que los micovirus se encuentran distribuidos en diversos linajes fúngicos (Son *et al.*, 2015) es necesario evaluar la posible transmisión horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S con miras en estudiar su rol ecológico en las interacciones entre *R. microsporus* y otros organismos.

## 2 Preguntas Biológicas

### 2.1 Pregunta Biológica 1

¿Los *Narnavirus* de *R. microsporus* tienen un efecto fenotípico en su hospedero?

### 2.2 Pregunta Biológica 2

¿Es posible la transmisión horizontal de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus* a otros hongos?

## 3 Hipótesis

### 3.1 Hipótesis 1

Los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S producen un fenotipo en *R. microsporus*.

### 3.2 Hipótesis 2

Los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S pueden ser transmitidos horizontalmente a otros hongos vía anastomosis (fusión hifal).

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los *Narnavirus* en *R. microsporus* e investigar su posible transmisión horizontal a otros hongos.

### 4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo y crecimiento de *R. microsporus*.

Investigar si los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S pueden ser transmitidos horizontalmente a otros hongos.

## 5 Estrategia experimental

### 5.1 Cepas microbianas y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron 33 cepas, incluyendo silvestres y generadas con tratamientos antibacterianos y antivirales (variantes), provenientes de diversas regiones y nichos ecológicos (Tabla 2). Cada una de las cepas fue cultivada en medio de Agar Dextrosa y Papa (PDA, BD211900, Bioxon) e incubadas a 30 °C para su conserva o posterior uso en los ensayos experimentales. Para mantener las conservas fue necesario realizar resiembras semanales-mensuales.

**Tabla 2.- Identificación y origen de las cepas fúngicas usadas en este estudio.**

ID	Designación de las cepas	Nombre y origen	Endobacteria	RmNV-20S	RmNV-23S	Sexo
Cepas silvestres (wt) usadas en este estudio						
813	ATCC 52813 CBS 699.68 VKM F-733	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem proveniente de suelo, Ucrania	<i>Mycetohabitans</i> sp. B4 <sup>(a,e)</sup>	No	No	+
814 o wt	ATCC 52814 CBS 700.68 VKM F-774	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem proveniente de suelo de bosque, República de Georgia	<i>Mycetohabitans</i> sp. B7 <sup>(e)</sup>	Si	Si	-
559	ATCC 11559 CBS 344.29	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem	No	No	No	+

	VKM F-1091 DSM 2195					
811	ATCC 52811 CBS 261.28 DSM 2193 VKM F-1361	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem No especificado, Estados Unidos de América	<i>Mycetohabitans</i> sp. B6 <sup>(e)</sup>	Si	No	-
417	ATCC 62417	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem ( <i>Rhizopus chinensis</i> Rh-2) Plantulas de arroz, Japón	<i>Mycetohabitans</i> sp. B1 <sup>(a,b,c,d,e)</sup>	No	No	+
010	ATCC 48010 CBS 339.62 NRRL 6203	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> Tempeh, Indonesia	No	No	No	?
959	ATCC22959 CBS 338.62 NRRL 2710 IMI 174457 CDBB-H-1389	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> Alimentos, tempeh, Indonesia	No	No	No	?
807	ATCC 52807 CBS 631.82 IMI 130842	<i>Rhizopus microsporus</i> van Tieghem* Pan, China	No	No	No	?
019	ATCC 56019	<i>Rhizopus microsporus</i>	<i>Mycetohabitans</i> sp.	No	No	-
499	No especificado	<i>Rhizopus microsporus</i> HP499	<i>Mycetohabitans</i> sp.	No	No	?

		Suelo, huertos de papaya en Oaxaca, Veracruz y Colima <sup>f</sup>				
286	CDBB-H-286	<i>Mucor circinelloides</i>	No	No	No	x
040	IMI 206040	<i>Trichoderma atroviride</i>	No	No	No	x
Cepas generadas por la Dra. Astrid N. Espino Vázquez						
<b>Lote 1 (Agosto 2018)</b>						
<b>ID</b>		<b>Descripción</b>	<b>Endobacteria</b>	<b>RmNV-20S</b>	<b>RmNV-23S</b>	<b>Sexo</b>
nv+	b-	Derivada de ATCC 52814 tratada con <b>ribavirin</b> hasta que los micoviruses fueran eliminados	Curada	Si	Si	-
nv-	b+	Derivada de 814 nv- <b>ribavirin</b> tratada con <b>ciprofloxacín</b> hasta que la bacteria fuera eliminada	<i>Mycetohabitans</i> sp. B7	No	No	-
	b-		Curada	No	No	-
<b>Lote 2 (Diciembre 2019)</b>						
<b>ID</b>		<b>Descripción</b>	<b>Endobacteria</b>	<b>RmNV-20S</b>	<b>RmNV-23S</b>	<b>Sexo</b>
nv +	b-	Derivada de ATCC52814 tratada con <b>ciprofloxacín</b> hasta que la bacteria fuera eliminada	Curada	Si	Si	-

	b*		Derivada de co-cultivo de la cepa 814 nv+b- <b>ciprofloxacín</b> y <i>Mycetohabitans</i> sp. B7	<i>Mycetohabitans</i> sp. B7			-
nv -	b+	R1 (regenerada 1)	Derivada de ATCC 52814 tratada con <b>ribavirin</b> hasta que los micovirus fueran eliminados	<i>Mycetohabitans</i> sp. B7	Curada	Curada	-
		R2 (regenerada 2)					-
		R3 (regenerada 3)					-
		C1 (regenerada 1)					-
	C2 (regenerada 2)	-					
		b-	R1	Derivada de 814 nv- <b>ribavirin</b> tratada con <b>ciprofloxacín</b> hasta que la bacteria fuera eliminada	Curada		
	R2		-				
R3	-						

		C1	Derivada de 814 nv- <b>cicloheximida</b>				-
		C2	tratada con <b>ciprofloxacín</b> hasta que la bacteria fuera eliminada				-
	b*	R1	Derivada de co-cultivo de la cepa 814 nv- b- <b>ribavirin/ciprofloxacín</b> y <i>Mycetohabitans</i> sp. B7	<i>Mycetohabitans</i> sp. B7			-
		R2					-
		R3					-
		C1	Derivada de co-cultivo de 814 nv-b- <b>cicloheximida/ciprofloxacín</b> y <i>Mycetohabitans</i> sp. B7				-
		C2					-

**ATCC:** Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, USA; **CBS:** Centro de Biodiversidad Fúngica, Utrecht, Países Bajos; **VKM:** Colección de Microorganismos de Toda Rusia, Moscú, Rusia; **DSM:** Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Braunschweig, Alemania; **NRRL:** Colección de Cultivos del Servicio de Investigación Agrícola, Peoria, IL, USA; **IMI:** Centro Internacional de Agricultura y Biociencias (CABI), Wallingford Oxfordshire, UK; **CDBB:** Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV), Ciudad de México, México.

- (a) Partida-Martínez & Hertweck, (2005)
- (b) Partida-Martínez, *et al.*, (2007)
- (c) Lackner *et al.*, (2011)
- (d) Lackner *et al.*, (2011)
- (e) Lackner *et al.*, (2009)
- (f) Cruz-Iachica *et al.*, (2018)

## 5.2 Secuencias cebadoras y detección de narnavirus

Para el análisis molecular se consideraron tres pares de primers, dos correspondientes a los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S y otro dirigido a amplificar la región ITS2 (Tabla 3).

**Tabla 3. Cebadores moleculares usados en este estudio.**

ID	Secuencia	%GC	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño de amplicón (pb)	Blanco molecular
Rm_20S_F <sup>a</sup>	TCTCACGTTGTCCGGAAGC	57.9	64.0	683	RmNV-20S
Rm_20S_R <sup>a</sup>	AGCCCAACCGTGAATCAGG	57.9	64.3		
Rm_23S_F <sup>a</sup>	TTGCCCGCACTAAAGAGGG	57.9	64.3	537	RmNV-23S
Rm_23S_R <sup>a</sup>	TTTAGGTCCTGGCTGCGG	57.9	64.2		
ITS9F <sup>b</sup>	GAACGCAGCRAAIIGYGA	44	57.7	300-400	Región ITS2 ( <i>Internal Transcriber Spacer</i> )
ITS4R <sup>b</sup>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	45	53		

(a) Espino-Vázquez *et al.*, (2020)

(b) Coleman-Derr *et al.*, (2016)

Para amplificar los blancos moleculares se consideró la siguientes mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): 5 µL de agua DEPC, 1 µL de Bft (Buffer (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (50mM), 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.125 µL DMSO, 0.5 µL de dnTPS (10 mM), 0.5 µL de cebadores F y R (10 mM) respectivamente, 25 ng de producto de cDNA y 0.125 µL de Taq DNA polimerasa (5 u/µL) (Thermo Scientific™).

La reacción fue sometida a un protocolo optimizado de desnaturalización inicial por 2 min a 95 °C; 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s; alineamiento, 53 y 62 °C por 30 s para los blancos ITS y *Narnavirus* respectivamente; extensión, 72 °C por 1 min; y extensión final de 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron revelados en un gel de agarosa al 1.5% de concentración por 1.5 h a 85 V y 400 mAh.



### 5.3 Ensayos de producción de biomasa

Se tomó un disco de micelio de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de la periferia de un cultivo fúngico de dos días de crecimiento y fue puesto en el centro de una caja Petri previamente adicionada con 20 mL de medio de cultivo y una cobertura (membrana) de celofán estéril. Dicha membrana se preparó lavando 2 veces con agua destilada y agitación por 15 minutos. Posteriormente, cada membrana se colocó entre dos trozos de papel humedecido para finalizar con 15 minutos a 121 °C y 1.5 psi. Cada membrana se colocó sobre medio solidificado con ayuda de dos pinzas.

Se consideraron de 3 a 6 réplicas por cultivo fúngico.

Medios de cultivo usados en este estudio:

1- PDA a la mitad de la concentración (PDA 0.5X, 2 gL<sup>-1</sup> de extracto de papa 10 gL<sup>-1</sup> de dextrosa, y 15 g L<sup>-1</sup> de agar). En este medio se llevó a cabo el crecimiento de las cepas destinadas al estudio transcriptómico de Bermúdez Barrientos et al., (tesis de maestría 2016), Mondo et al., (2017) y Espino-Vázquez *et al.*, (2020).

2- VK (1% de fécula de maíz (MAIZENA®)), 0.5% de glicerol, 1% de extracto de levadura, 1% glucosa de maíz (Karo®) y 1% de CaCO<sub>3</sub>, pH 6.5). Medio destinado a la producción de toxinas como el rhizoxin (comúnmente llamado VK) (Partida-Martínez *et al.*, 2007).

3- KAc (2 gL<sup>-1</sup> de acetato de potasio, 15 gL<sup>-1</sup> de agar, pH 7.0). Medio limitado en fuentes de nitrógeno, donde la carga viral de los *Narnavirus* de *S. cerevisiae* aumentan (Matsumoto *et al.*, 1990).

4-YPAD (10 gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 20 gL<sup>-1</sup> de peptona, 40 mgL<sup>-1</sup> de adenina, 20 g L<sup>-1</sup> de dextrosa, y 20 g L<sup>-1</sup> de agar).

5- MEA (12.75 gL<sup>-1</sup> de maltosa, 2.75 gL<sup>-1</sup> de dextrosa, 0.78 gL<sup>-1</sup> de peptona, 2.25 gL<sup>-1</sup> de glicerol, y 15 gL<sup>-1</sup> de agar)

Para el medio KAc, los cultivos fúngicos se incubaron primero en YPAD por 2 días a 30 °C, y después fueron transferidos a este medio.

Después de su inoculación, las cajas Petri fueron selladas con 4 vueltas de envoltura plástica. Los cultivos se incubaron a 30°C por 6 días con la tapa hacia arriba. Subsecuentemente, el micelio fue removido y sometido a secado por 24 h a 60 °C y

posteriormente pesado en una balanza analítica OHAUS®, PA214; OHAUS Co., Parsippany, NJ, EUA.

### 5.3.1 Inoculación e incubación

Todos los cultivos fúngicos fueron inoculados e incubados como se describe arriba. Al finalizar, las cajas fueron deselladas e incubadas a 30 °C por 24 h más para inducir la producción de esporangioesporas.

### 5.3.2 Colecta y conteo de esporangioesporas

La colecta se realizó en dos pasos.

1- El micelio fue removido de las cajas Petri, cortándolo en 8 pedazos con ayuda de un bisturí, y sumergido en 10 mL de 0.01% de Triton X-100 en un tubo de 50 mL. El micelio fue sometido a agitación vigorosa.

2- La suspensión de esporangioesporas fue transferida a un tubo de 50 mL con una fibra de poliéster para eliminar fragmentos de micelio.

Del volumen total de suspensión de esporangioesporas, se tomó 1 mL, del cual 10 µL (2x), se destinó para realizar el conteo en una cámara de Neubauer.

Todos los pasos descritos, excluyendo el conteo, se realizaron en una cámara de flujo laminar.

## 5.4 Ensayos de transferencia horizontal de *Narnavirus*

Para la evaluación de la transferencia horizontal de *Narnavirus* se consideró como cepa donadora a la variante 814 nv+ b-, la cual no produce esporangioesporas. Por ello, al co-cultivarla con una cepa receptora que si las produce, las estructuras de reproducción colectadas al final de los ensayos serán de la cepa receptora. Se consideraron triplicados de co-cultivos. Se llevaron a cabo dos estrategias, de las que las cepas usadas en cada una de ellas se enlistan en la [Tabla 3](#). En el caso de la estrategia 2, se esperan en algunos casos, esporas sexuales y asexuales.

**Tabla 3.- Cepas usadas en los ensayos de transferencia horizontal.** \* La producción de estructuras de reproducción sexual, se refiere específicamente a la producción de zigoesporas en apareamientos compatibles (basado en datos de José Francisco Cabrera Rángel).

ID	Tipo de cepa	Estructuras de reproducción en el co-cultivo	
Estrategia 1			
814 nv+ b-	Donadora	No	
559	Receptora	Si	
Estrategia 2			
		Sexuales*	Asexuales
814 nv+ b-	Donadora	----	----
559	Receptora	Si	Si
807	Receptora	No	Si
813	Receptora	Si	Si
019	Receptora	No	Si
499	Receptora	No	Si
<i>M. circinelloides</i>	Receptora	No	Si
<i>T. atroviride</i>	Receptora	No	Si

#### 5.4.1 Estrategia 1

Los ensayos de co-cultivo se llevaron a cabo en PDA co-inoculando un disco de micelio de la cepa donadora de *Narnavirus* opuesto a un disco de la cepa receptora a una distancia de 5 cm. Las cajas Petri fueron selladas e incubadas de acuerdo con el punto 5.3 por 5 días. La inducción (día 5) y colecta de esporangioesporas (día 6) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en 5.4.1 y 5.4.2 respectivamente.

##### 5.4.1.1 Crecimiento de esporangioesporas

Después de coleccionar las esporangioesporas, 1 mL de suspensión fue inoculado en PDA 0.5X e incubado por 3 días de acuerdo con el punto 5.3. Se consideraron triplicados.

##### 5.4.1.2 Extracción de RNA total y detección de *Narnavirus*

El micelio producido de las esporas fue completamente removido de las placas petri, y macerado con ayuda de un mortero, pistilo y nitrógeno. Aproximadamente 100 mg de micelio ya macerado fue tomado y homogeneizado con 1 mL de Trizol (Thermo Scientific™) en un tubo eppendorf. *A partir de este punto, todos los pasos se realizan en frío.* Cada muestra fue incubada por 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 µL de cloroformo, seguido de 3 minutos de incubación y 15 minutos de centrifugación a

12, 000 g. Consecutivamente, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, agregando 500 µL de isopropanol, incubando por 10 min y centrifugando 10 min a 12, 000 g. Subsecuentemente, el sobrenadante fue retirado, la pastilla lavada con 1 mL de etanol al 75% de concentración y centrifugada 5 min a 7, 500 g. El sobrenadante fue descartado y la pastilla resuspendida en 50 µL de agua DEPC. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

La síntesis de cDNA fue llevada a cabo usando 1 µg de RNA previamente tratado con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) y homogeneizado en 9 µL de agua DEPC. A este volumen, se agregaron 1 µL de random primer (50 µM) y 1 µL de una mezcla de dNTP (10 mM cada uno), para ser incubado por 5 min a 65 °C; posteriormente se agregaron 2 µL de 10X RT Buffer, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de DTT (0.1 M), y 200 U de enzima Super Script III (Invitrogen). Esta reacción fue incubada por 10 min a 25 °C, seguida por 50 min a 50 °C y 5 min a 85 °C.

La detección por PCR punto final se realizó como se mencionó previamente [5.2](#) usando la reacción de cDNA final.

#### *5.4.1.3 Observaciones microscópicas*

Las observaciones se realizaron directamente del crecimiento de los co-cultivos en caja petri. Se usó un microscopio Leica DM750 con cámara (ICC50HB) enfocando con los objetivos 4 y 10X.

### **5.4.2 Estrategia 2**

#### *5.4.2.1 Inoculación e incubación*

Los ensayos de co-cultivo se llevaron a cabo en PDA co-inoculando un disco de micelio de la cepa donadora de *Narnavirus* opuesto a otro de la cepa receptora a una distancia de 5 mm. Las cajas Petri fueron selladas de acuerdo con el punto [5.3](#) e incubadas durante 8 días a 30 °C, de los cuales, los primero 4 días se mantuvo el sello y los 4 días siguientes sin sello.

#### *5.4.2.2 Colecta de esporangioesporas*

La colecta de esporangioesporas se llevó a cabo de acuerdo con el punto [5.4.2](#).

#### *5.4.2.3 Crecimiento de esporangioesporas*

1 mL de suspensión de esporas fue inoculado en 50 mL de YPAD líquido e incubado durante 3 días a 30 °C con 120 rpm de agitación constante. Se consideraron triplicados.

#### *5.4.2.4 Extracción de RNA total y detección de Narnavirus*

La biomasa producida fue colectada, liofilizada y posteriormente sometida a extracción de RNA total en frío, de acuerdo con el protocolo de Box *et al.*, (2011).

Para llevar a cabo la extracción, se agregaron 100 mg de material liofilizado a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 300 µL de buffer RE (0.1 M Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.5% SDS y 1% 2-mercaptoetanol) y 300 µL de fenol:cloroformo (pH 3). Posteriormente se agitó suavemente por 10 min y se centrifugó 15 min a 16, 100 g. Subsecuentemente, se colectó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo con 240 µL de isopropanol y 30 µL de acetato de sodio 3 M, pH 5.2. Se precipitó a -80 °C por 15 min y se centrifugó 15 min a 16, 100 g. Para finalizar, la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70 % de concentración y se centrifugó 5 min a 16, 100 g. El etanol fue descartado y la pastilla resuspendida en 50 µL de agua DEPC. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

La síntesis de cDNA se realizó de acuerdo con el punto [5.5.1.2](#) modificando únicamente la concentración de enzima SuperScript™ III, la cual fue ajustada a 40 U por cada 1000 ng de RNA.

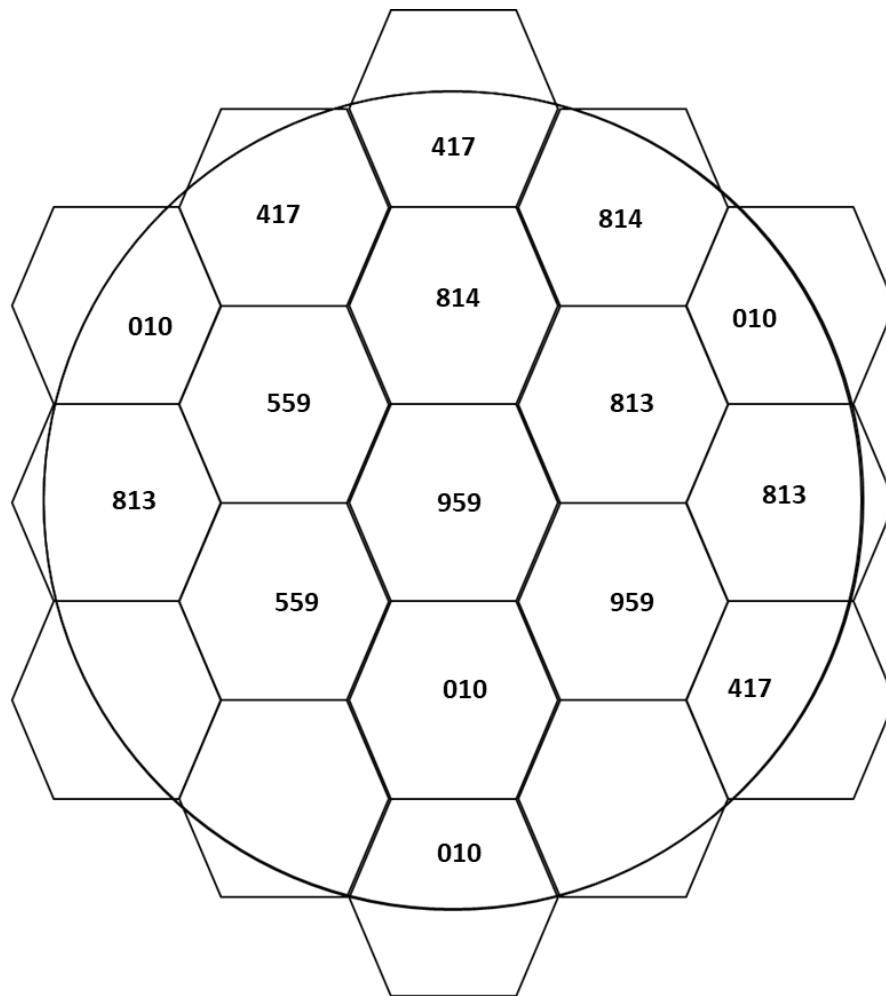
La detección por PCR punto final y visualización de los amplicones se llevó a cabo de acuerdo con el punto [5.2](#) usando la reacción final de cDNA.

#### *5.4.2.5 Observaciones microscópicas*

Se realizaron microcultivos en PDA sobre portaobjetos co-inoculando un fragmento de micelio de la cepa donadora opuesto a otro de la cepa receptora a una distancia de 5 mm. Se dejaron incubar por 2 días a 30 °C, de los cuales, el primer día se evitó la aireación. Las micrografías fueron tomadas con un microscopio Leica DM750 con cámara (ICC50HB) usando los objetivos 4-40X.

## 5.5 Ensayos de multi-cultivo

El ensayo de multi-cultivos se llevó a cabo de acuerdo con Burgess *et al.*, (2009). Para dicho ensayo, se co-inocularon discos de micelio de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> en cajas Petri con 20 mL de PDA/celofán de las cepas silvestres: 814, 813, 010, 417, 559 y 959; siguiendo el arreglo de la Fig. 4. Una vez que las cajas fueron inoculadas, se sellaron de acuerdo con el punto 5.3, y se dejaron incubar por 3 días a 30 °C.



**Figura 4.- Arreglo en caja Petri del ensayo de multi-cultivo.**

### 5.5.1 Observaciones microscópicas

Las observaciones microscópicas se realizaron de acuerdo con el punto 5.5.1.3.

## 5.6 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó en el programa R versión 3.5.1 (2018-07-02), mediante ANOVA de una vía y análisis multifactorial o MANOVA y una prueba *post-hoc* (Tukey). Específicamente, se utilizó el ANOVA de una vía para encontrar diferencias en la

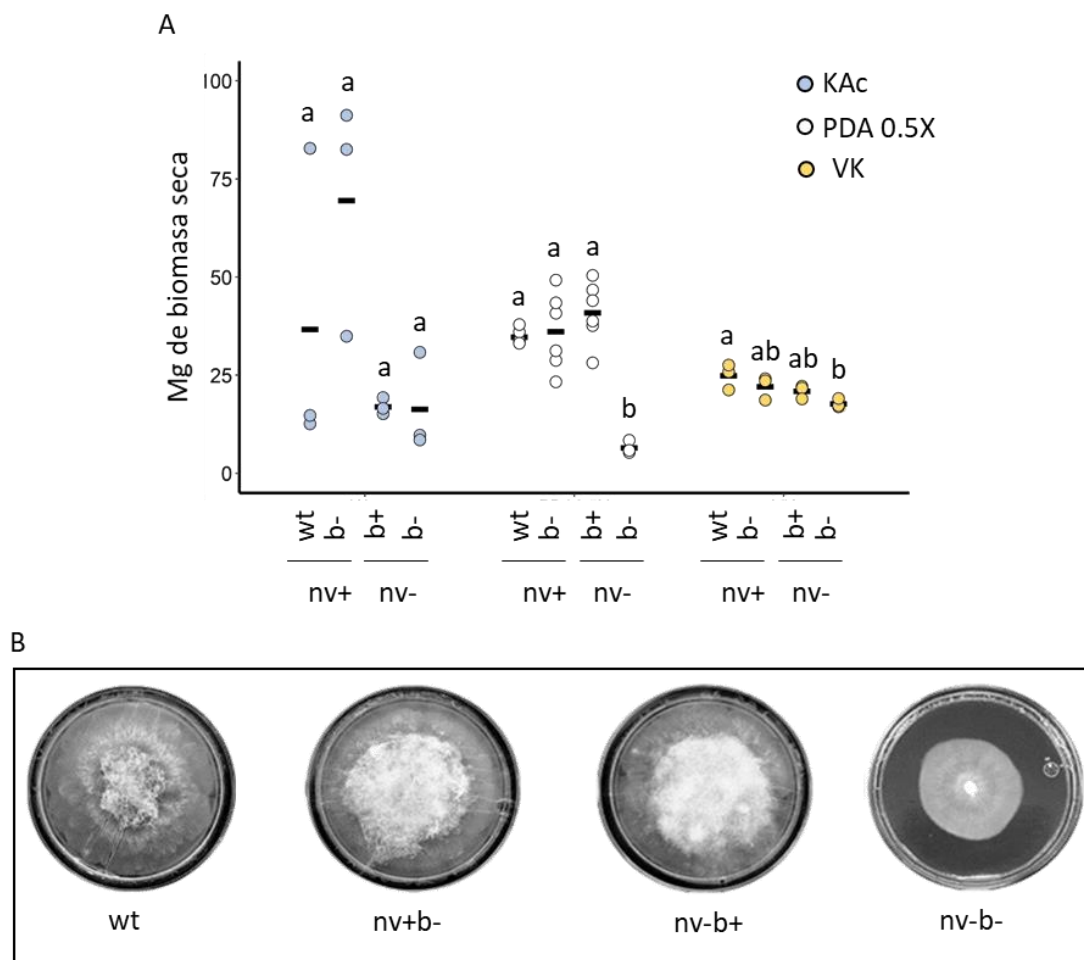
producción de biomasa y producción de esporangioesporas. El MANOVA se aplicó para concluir si existe un efecto significativo debido a los factores evaluados (medio, genotipo, tratamientos antibacterianos y antivirales). En todos los experimentos se utilizaron de 3 a 6 cultivos independientes para tomar la medida de biomasa de cada variante genética.

Los gráficos también se realizaron en R, versión 3.5.1 (2018-07-02), con el paquete ggplot2.

## 6 Resultados

### 6.1 Evaluar el efecto de los narnaviruses RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo y crecimiento de *R. microsporus*.

6.1.1 Efecto de los simbioses virales en la producción de biomasa de *R. microsporus*  
Con la finalidad de evaluar el efecto de la presencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en *R. microsporus*, en el LIM la Dra. Astrid N. Espino Vázquez estableció protocolos que permitieron la generación de cepas libres de virus. Las cuales se encuentran distribuidas en dos lotes de generación temporal discontinua (Lote 1: Agosto 2018 y Lote 2: Diciembre 2019) como se reporta en la [Tabla 2](#).



**Figura 5.- Producción de biomasa de la cepa 814 wt y sus variantes (primer lote). A)**

Análisis de producción de biomasa entre las líneas fúngicas por medio de cultivo. Cada punto representa una medición de biomasa. Las barras indican la media aritmética. Las letras muestran diferencias estadísticas significativas, por ANOVA de una vía



seguida de una prueba TUKEY,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$  a  $6$ . **B)** Crecimiento micelial de las líneas fúngicas, 6 días de crecimiento en PDA 0.5X/celofán.

Como primer acercamiento para revelar el rol funcional de los *Narnavirus* en la biología de *R. microsporus*, decidimos evaluar la producción de biomasa de las variantes del primer lote en diferentes medios nutricionales, donde la replicación de los *Narnavirus* aumenta (KAc (Matsumoto *et al.*, 1990)) y donde *R. microsporus* en asociación con *Mycetohabitans* han sido probados (PDA 0.5X, Bermúdez Barrientos *et al.*, (tesis de maestría 2016), Mondo *et al.*, (2017) y Espino-Vázquez *et al.*, (2020); y VK (Partida-Martínez *et al.*, 2007).

Gracias a esto, pudimos apreciar que los simbioses virales, bacterianos y su interacción impactan el crecimiento de *R. microsporus*, en el que la producción de biomasa se ve comprometida en ausencia de ambos simbioses (variante 814 nv- b-) y no por efecto del sustrato (Fig. 5A).

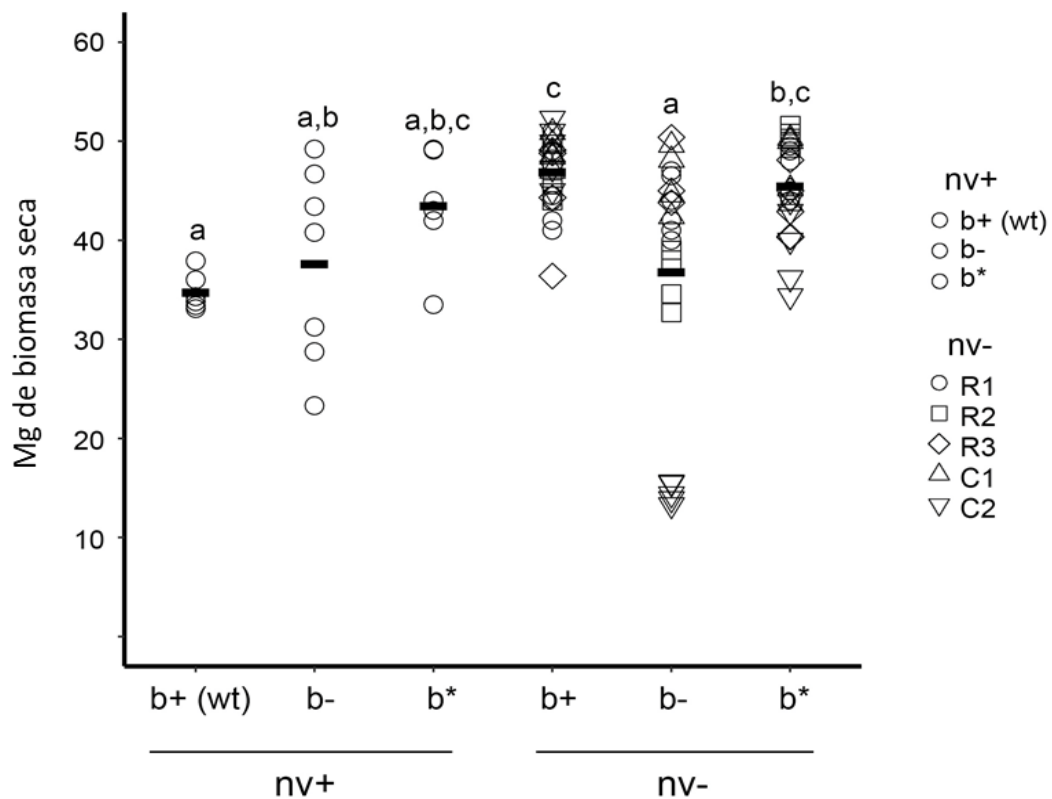
Partiendo de datos normalizados ( $\log_{10}$ ) y a través de un análisis multifactorial (Tabla 4), confirmamos que los efectos estadísticos significativos (sobre los datos de producción de biomasa) más importantes los presentan los *Narnavirus* y la interacción *Mycetohabitans-Narnavirus* (Tabla 4). Y cuyas diferencias se aprecian mejor en el medio PDA 0.5X ( $p < 0.005$ ) comparado con KAc y VK ( $p=0.109$ ,  $p=0.042$ ; respectivamente) (Fig. 5A). Respecto al sustrato, encontramos que su influencia por sí sola no es determinante en la producción de biomasa observada entre los diferentes fondos genéticos (Fig. 5A, Tabla 4). Sin embargo, la interacción de *Mycetohabitans* y/o los *Narnavirus* con el medio si reflejan diferencias estadísticas significativas, siendo mayor el efecto observado en la interacción de *Mycetohabitans* con el medio (Tabla 4).

**Tabla 4.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de biomasa (Lote 1).**

Factor	Df	Sum sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Bacteria	1	0.1293	0.1293	4.889	0.034065 *
Virus	1	0.6642	0.6642	25.116	1.78e-05 ***
Medio	2	0.0805	0.0403	1.523	0.232999
Bacteria:Virus	1	0.5816	0.5816	21.994	4.59e-05 ***
Bacteria:Medio	2	0.5358	0.2679	10.130	0.000371 ***
Virus:Medio	2	0.1780	0.0890	3.366	0.046751 *
Bacteria:Virus:Medio	2	0.2832	0.1416	5.355	0.009683 **
<b>Residuals</b>	<b>33</b>	<b>0.8727</b>	<b>0.0264</b>		

Considerando que en los resultados anteriores las diferencias de producción de biomasa fueron más significativas en PDA 0.5X y debido a que es en este medio donde la replicación de los *Narnavirus* aumenta (Espino-Vázquez *et al.*, 2020), decidimos continuar los experimentos en PDA 0.5X.

Con el fin de descartar efectos indeseados y no controlados del ribavirin en las variantes libres de virus generadas para el escrutinio del primer lote, en el lote 2 se compararon 5 variantes (nuevamente generadas) de cada línea provenientes de tratamientos independientes con 2 antivirales distintos (Tabla 2), incluyendo las variantes en las que *Mycetohabitans* fue reintroducida (b\*). Este set de cepas nos permitió indagar, de forma más robusta, el efecto de los simbiosites virales, en presencia, ausencia y re-infección de *Mycetohabitans*.



**Fig 6.- Producción de biomasa de la cepa 814 wt y sus variantes (segundo lote).** En el eje de las x se encuentran las líneas fúngicas. Cada punto representa una medición de biomasa. Las barras indican la media aritmética. Las letras muestran diferencias estadísticas significativas, por ANOVA de una vía seguida de una prueba TUKEY,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$  a  $6$ . *Modificado de Espino-Vázquez et al.*, (2020).

Contrario al efecto observado en la producción de biomasa diferencial entre las cepas del primer lote, no pudimos observar el decremento en producción de biomasa por efecto de la ausencia de los simbioses, salvo en la variante C2 (Fig. 6). No obstante, partiendo de datos normalizados (Johnson) y a través de un análisis multifactorial (Tabla 5), encontramos que los factores que determinan la producción de biomasa son los simbioses (tal como en el análisis multifactorial del primer lote).

**Tabla 5.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de biomasa (Lote2).**

Factor	Df	Sum sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Bacteria	1	15.51	15.508	20.358	2.07e-05 ***
Virus	1	6.88	6.882	9.034	0.00349 **
Ribavirin	1	0.80	0.797	1.047	0.30918
Cicloheximida	1	0.80	0.797	1.047	0.30918
Ciprofloxacina	1	0.00	0.002	0.002	0.96205
Bacteria:Virus	1	3.69	3.685	4.838	0.03059 *
Bacteria:Ribavirin	1	3.20	3.197	4.197	0.04361 *
Bacteria:Cicloheximida	1	3.20	3.197	4.197	0.04361 *
Virus:Ciprofloxacina	1	4.28	4.280	5.618	0.02007 *
Ribavirin:Ciprofloxacina	1	5.89	5.892	7.735	0.00669 **
Cicloheximida:Ciprofloxacina	1	5.89	5.892	7.735	0.00669 **
<b>Residuals</b>	84	63.99	0.762		

Además, pudimos encontrar que la presencia de los antivirales y el antibacteriano (por si solos) no afectaron drásticamente la producción de biomasa de *R. microsporus*. No así con su interacción, la cual podría ser responsable del efecto fenotípico observado (Tabla 5). Sin embargo, al buscar variabilidad en la producción de biomasa en este nuevo lote de variantes genéticas (lote 2), no pudimos encontrar diferencias estadísticas significativas,  $p=0.182$ , (Fig. 6), fortaleciendo la noción de que los tratamientos antivirales y antibacterianos no afectaron el crecimiento de *R. microsporus*.

A pesar de que en este segundo lote no pudimos encontrar diferencias en la producción de biomasa por efecto de la ausencia de los simbioses, nuestra experiencia nos dice que el tiempo puede ser factor determinante en la aparición de este fenotipo.

En este tenor, durante la caracterización fenotípica de las variantes del lote 1 generadas en agosto de 2018, comenzamos a observar la reducción de biomasa de la

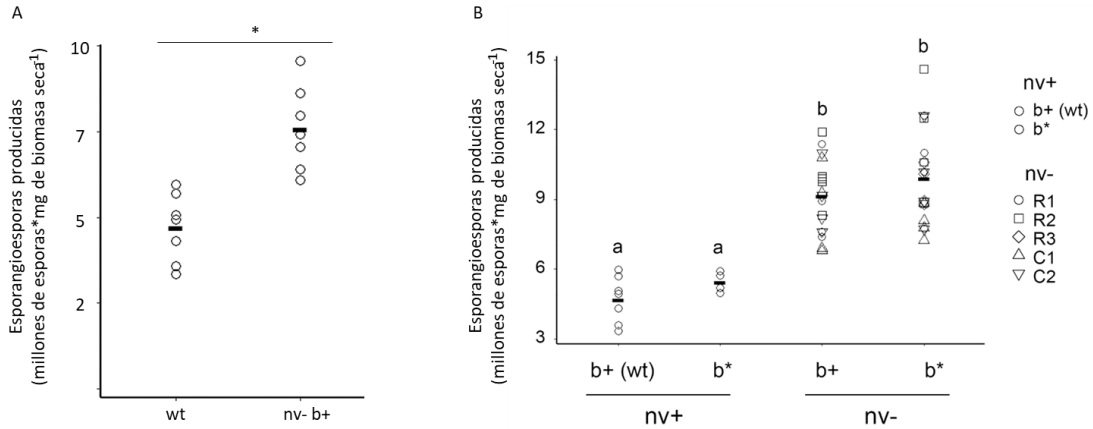
variante 814 nv- b-reportada en la [figura 6](#); hasta después de aproximadamente seis meses de haberse generado.

Actualmente, comenzamos a notar un ligero decremento en el crecimiento de las variantes 814 nv- b- del lote 2 (generadas en diciembre de 2019) en el medio PDA 0.5X, lo que no sucede cuando el hongo pierde solo a UNO de los simbiontes.

En conjunto, nuestros resultados y experiencia nos impulsan a hipotetizar que: los *Narnavirus* actúan en sinergismo con *Mycetohabitans* para contribuir en la producción estable de biomasa de *R. microsporus*.

**6.1.2 Efecto de los *Narnavirus* en la reproducción asexual y sexual de *R. microsporus***  
Como parte del desarrollo de *R. microsporus*, evaluamos el efecto de los narnavirus en la reproducción asexual mediante el conteo de esporangioesporas por mg de biomasa seca del hongo. Este experimento lo realizamos únicamente con la cepa 814 wt y las variantes genéticas en asociación con *Mycetohabitans spp.*, debido a que *R. microsporus* es incapaz de producir esporangioesporas en ausencia de la endobacteria.

Comenzamos nuestra evaluación con las cepas del primer lote (generado en agosto de 2018), considerando a las dos únicas cepas hospedantes de *Mycetohabitans spp.*: cepa wt y 814 nv- b+. Al comparar ambas cepas, pudimos observar que la presencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S reduce la producción de esporangioesporas de *R. microsporus* ([Fig. 7A](#)). Y al realizar un ANOVA de una vía sobre los datos de cuantificación de esporangioesporas, pudimos encontrar diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), confirmando el efecto observado en la cantidad de esporangioesporas cuantificadas.



**Figura 7.- Efecto de la presencia de los *Narnavirus* en la producción de esporangioesporas durante el desarrollo asexual de *R. microsporus*. A) Esporangioesporas producidas por la asociación *R. microsporus*-*Mycetohabitans* spp. Variantes del lote 1. B) y 2. Cada punto representa una cuantificación de esporangioesporas. Las barras indican la media aritmética. \* y letras muestra diferencias estadísticas significativas, por ANOVA de una vía  $P < 0.05$  y una prueba TUKEY respectivamente,  $n = 3$  a 6.**

Una vez contando con las variantes genéticas del lote 2 (generado en diciembre de 2019), decidimos repetir el experimento con miras a confirmar el fenotipo observado. Esta evaluación nos dejó confirmar que la presencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S reduce considerablemente la producción de esporangioesporas en las cepas 814 wt y la variante nv+ b\*, apreciándose un aumento de aproximadamente dos millones de esporas en las variantes carentes de simbiosis virales (Fig. 7B). Lo cual se encuentra en acuerdo con el resultado del ANOVA de una vía sobre los datos de producción de esporangioesporas de dicho lote de variantes, gracias al cual encontramos diferencias estadísticas significativas de  $p < 0.0005$ , que al realizar una prueba *post-hoc*, genera dos grandes grupos: con y sin *Narnavirus*. Estos resultados reafirman la idea de que los *Narnavirus* decrecientan el número de esporangioesporas producidas, y que representan un costo durante el desarrollo asexual de *R. microsporus*.

Nuestro análisis también nos permitió fortalecer la noción de que los simbiosis virales reducen la producción de esporangioesporas, debido a que su efecto factorial es el que resulta estadísticamente más significativo con respecto a los otros factores evaluados (Tabla 6).

**Tabla 6.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de esporangioesporas (Lote 1 y 2).**

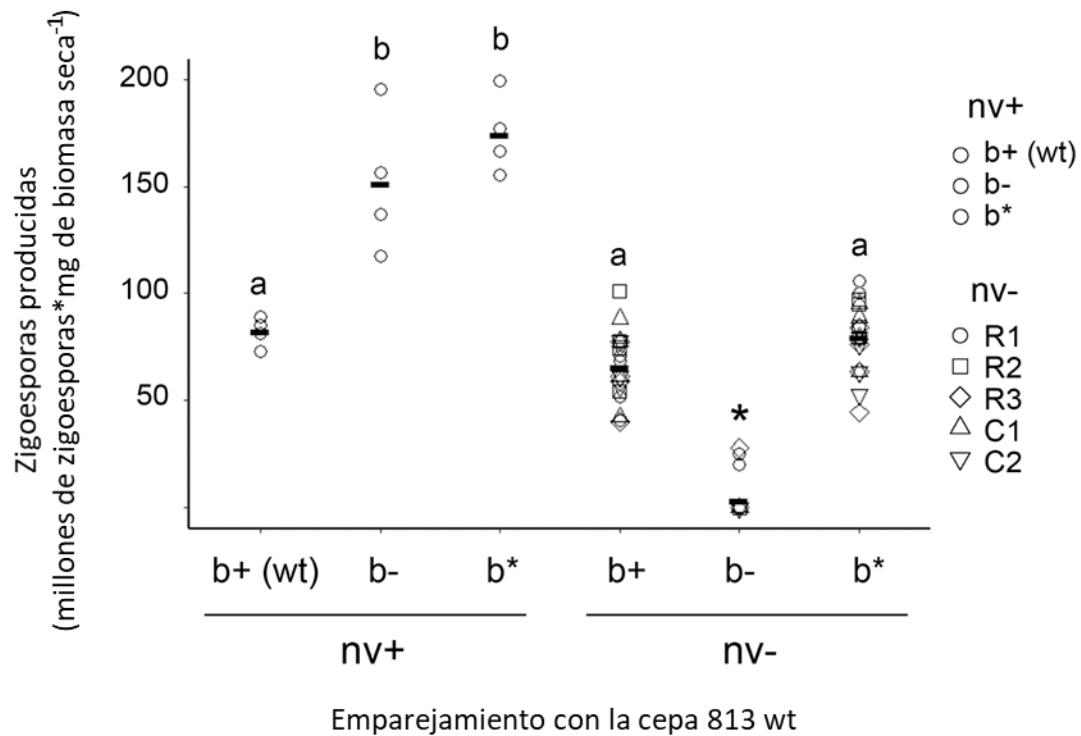
Factor	Df	Sum sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Bacteria	1	1.332e+12	1.332e+12	0.596	0.4435
Cicloheximida	1	1.443e+13	1.443e+13	6.454	0.0139 *
Ribavirin	1	1.443e+13	1.443e+13	6.454	0.0139 *
Virus	1	2.675e+14	2.675e+14	119.677	2.03e-15 ***
Ciprofloxacina	1	6.126e+12	6.126e+12	2.740	0.1035
Lote	1	2.056e+09	2.056e+09	0.001	0.9759
Virus:Ciprofloxacina	1	1.229e+10	1.229e+10	0.005	0.9412
Cicloheximida:Ciprofloxacina	1	1.508e+12	1.508e+12	0.674	0.4150
Ribavirin:Ciprofloxacina	1	1.508e+12	1.508e+12	0.674	0.4150
<b>Residuals</b>	55	1.230e+14	2.236e+12		

El ciclo de vida de *R. microsporus* comprende el desarrollo vegetativo, reproducción asexual y también el desarrollo sexual. Por ello, y debido a que los *Narnavirus* impactan el desarrollo asexual de *R. microsporus*, decidimos evaluar la potencial influencia de los simbiontes virales en la reproducción sexual.

Esta parte del estudio la llevamos a cabo únicamente con las variantes genéticas del lote 2 (generado en diciembre de 2019), debido principalmente a que este set de variantes contempla más combinaciones del hospedero fúngico con sus simbiontes.

En colaboración con el estudiante de maestría en Biología Integrativa, José Francisco Cabrera Rangel, miembro del LIM de Cinvestav-Irapuato; realizamos el escrutinio de la producción de zigosporas en el emparejamiento de la cepa de referencia 813 wt (sexo positivo) y las variantes genéticas de la cepa 814 wt (sexo negativo).

En este tenor, la caracterización que llevamos a cabo nos permitió también apreciar que la ausencia de los simbiontes virales mantiene el número de zigosporas de las variantes 814 nv- b+ y nv- b\*, con respecto a la cepa 814 wt. Sin embargo, la presencia de los *Narnavirus* en ausencia de *Mycetohabitans* spp., (variante 814 nv+ b-) aumenta el número de zigosporas producidas, comparada con las otras variantes genéticas. No obstante, y contrastantemente, la carencia de ambos simbiontes reduce total o parcialmente el número de zigosporas producidas de *R. microsporus* en los emparejamientos sexuales de las variantes 814 nv- b- con la cepa 813 wt (Fig. 8).



**Figura 8.- Efecto de los *Narnavirus* en la producción de zigosporas durante el desarrollo sexual de *R. microsporus* (lote 2).** Número de zigosporas producidas por el emparejamiento entre la cepa 813 wt y las variantes genéticas de la cepa 814. Cada punto representa una cuantificación de zigosporas. Las barras indican la media aritmética. Las letras muestran diferencias estadísticas significativas, por ANOVA de una vía seguida de una prueba TUKEY,  $P < 0.05$ ,  $n = 4$  a  $6$ . \* variantes nv- b- que no produjeron zigosporas *Modificado de Espino-Vázquez et al., (2020)*.

Al ejecutar un ANOVA de una vía sobre la cuantificación de zigosporas (normalizadas por mg de biomasa seca del apareamiento de las cepas positiva-negativa), pudimos encontrar diferencias estadísticas significativas de  $P < 0.05$  y al realizar una prueba *post-hoc*, pudimos apreciar tres agrupaciones principales, dentro las cuales, la ausencia de ambos simbiontes es evidente. Estos resultados nos guiaron a hipotetizar que *Mycetohabitans* y los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S son necesarios para el correcto funcionamiento sexual de *R. microsporus*.

Además, a través de un análisis multifactorial (Tabla 7), encontramos que: el uso de los antivirales aplicados en la generación de las líneas fúngicas libres de *Narnavirus* no son estadísticamente significativos. Sin embargo, el factor ciprofloxacina es relevante en los efectos observados. No obstante, la producción de zigosporas de la variante 814 nv- b+ y nv- b\* es equitativa, permitiéndonos descartar este efecto. Además, pudimos encontrar que los factores virus, bacteria y su interacción,

representan los efectos estadísticamente más significativos, lo cual se encuentra en acuerdo con la disminución de zigosporas en la línea fúngica 814 nv- b-.

**Tabla 7.- Resultados del análisis de varianza multifactorial de la producción de zigosporas (Lote 2).**

Factor	Df	Sum sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Bacteria	1	15.51	15.508	20.358	2.07e-05 ***
Virus	1	6.88	6.882	9.034	0.00349 **
Ribavirin	1	0.80	0.797	1.047	0.30918
Cicloheximida	1	0.80	0.797	1.047	0.30918
Ciprofloxacina	1	0.00	0.002	0.002	0.96205
Bacteria:Virus	1	3.69	3.685	4.838	0.03059 *
Bacteria:Ribavirin	1	3.20	3.197	4.197	0.04361 *
Bacteria:Cicloheximida	1	3.20	3.197	4.197	0.04361 *
Virus:Ciprofloxacina	1	4.28	4.280	5.618	0.02007 *
Ribavirin:Ciprofloxacina	1	5.89	5.892	7.735	0.00669 **
Cicloheximida:Ciprofloxacina	1	5.89	5.892	7.735	0.00669 **
<b>Residuals</b>	84	63.99	0.762		

Previamente, hipotetizamos que la acción del tiempo puede ser importante en la disminución de biomasa debido a la ausencia de los simbioses virales en *R. microsporus*. En nuestra caracterización de producción de zigosporas, notamos que la variante 814 nv+ b\* presentó una producción de zigosporas similar a la variante 814 nv+ b-. Por ello, sugerimos que los *Narnavirus* brindan a *R. microsporus* una mayor adecuación durante la reproducción sexual y que la re-infección con *Mycetohabitans* y el restablecimiento fenotípico (similar a la cepa 814 wt) podría depender del tiempo.

En resumen, nuestros resultados en conjunto fortalecen la hipótesis de que la interacción *Narnavirus-Mycetohabitans spp.*, es requerida durante el desarrollo sexual de *R. microsporus*, y que además la asociación de los *Narnavirus* es benéfica en este estadio de desarrollo.

### 6.1 Investigar si los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S pueden ser transmitidos horizontalmente a otros hongos.

Por primera vez, hemos sido capaces de asociar fenotipos a la presencia de virus del género *Narnavirus* en su hospedero. Ahora, continuamos con nuestra segunda pregunta ¿Los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S pueden ser transferidos horizontalmente a otros hongos?



### 6.1.1 Exploración de la fusión hifal en la especie *R. microsporus* como mediadora de la transmisión de los *Narnavirus*

El conocimiento generado hasta ahora alrededor de la presencia de los micovirus ha revelado la carencia de un ciclo extracelular, y por lo cual dependen totalmente de su hospedero para poder transmitirse a otros hongos. Dicha transmisión se da por dos vías: vertical, requiriendo la reproducción sexual o asexual de su hospedero fúngico; y horizontal, la cual se caracteriza por la fusión hifal (anastomosis) entre dos hongos vegetativamente compatibles. Los cuales son capaces de intercambiar su contenido citoplasmático formando así un individuo con el material genético de ambos (heterocarion) (Glass *et al.*, 2000).

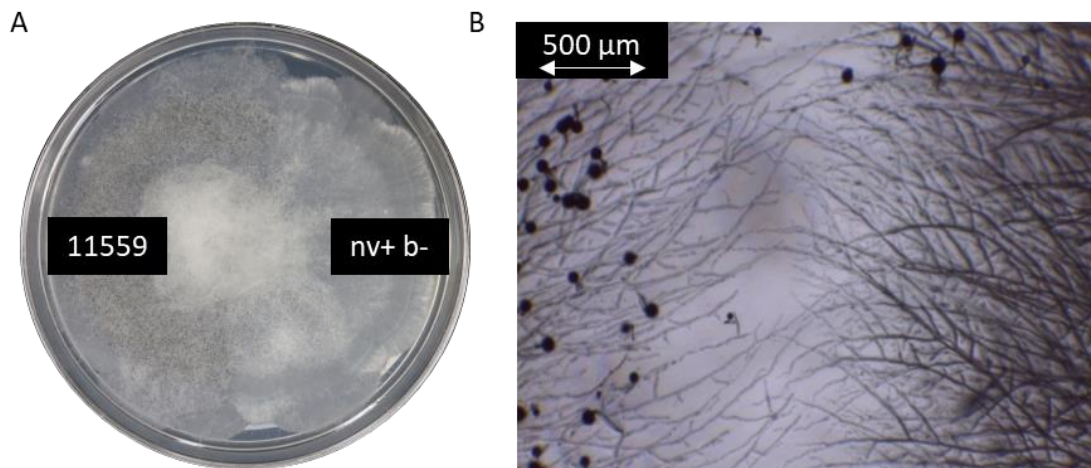
Los *Narnavirus* han demostrado poder ser transferidos verticalmente (mitosis y meiosis) y horizontalmente (mutantes cariogámicas -citoducción-) (Esteban & Fujimura, 2003; King *et al.*, 2012; Solórzano *et al.*, 2000). No obstante, actualmente han sido encontrados en organismos no fúngicos lo que sugiere su posible transferencia horizontal incluso entre reinos (Cai *et al.*, 2012; Lye *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016; Grybchuk *et al.*, 2017). Nuestro grupo de trabajo, probó la transferencia vertical de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus* (Espino-Vázquez *et al.*, 2020), sin embargo, aún no hemos explorado su potencial transferencia horizontal.

Previamente, se ha demostrado que *R. microsporus* es incapaz de producir esporangioesporas en ausencia de *Mycetohabitans spp.*, (Partida-Martínez *et al.*, 2007). Por lo que tomando ventaja de ello y de las variantes genéticas de la cepa 814 wt generadas por la Dra. Astrid N. Espino Vázquez, decidimos establecer un diseño de co-cultivo en el que colectáramos esporangioesporas de una cepa receptora (sobre las cuales detectar a los *Narnavirus*) y no de la cepa donadora, con el objeto de probar la transferencia horizontal de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus*.

Comenzamos aplicando la estrategia 1 de transferencia horizontal (punto 5.4.1), la cual contempla interacciones fúngicas “alejadas (5 cm de distancia)” y relativamente poco prolongadas (6 días).

Consideramos la variante fúngica curada de su simbionte bacteriano, 814 nv+ b- (lote 1, agosto 2018) y la cepa silvestre 559 libre de simbiontes virales y bacterianos. La cual fue previamente caracterizada por José Francisco Cabrera Rángel, y a la cual no pudo asignarle sexo en su evaluación wt con las cepas de referencia 813 y 814 wt, por lo que la consideramos incompatible sexualmente.

En la marcha, repetimos el experimento más de cuatro veces para obtener líneas fúngicas de la cepa 559 con *Narnavirus* pero todos ellos fueron negativos. Además, una vez concluido el tiempo de incubación de los co-cultivos (Fig. 9A), durante las observaciones microscópicas no pudimos encontrar un solo punto de fusión hifal. Contrario a lo esperado, observamos un espacio vacío entre el crecimiento de ambos hongos, sugiriendo cierta incompatibilidad entre las hifas (Fig. 9B).

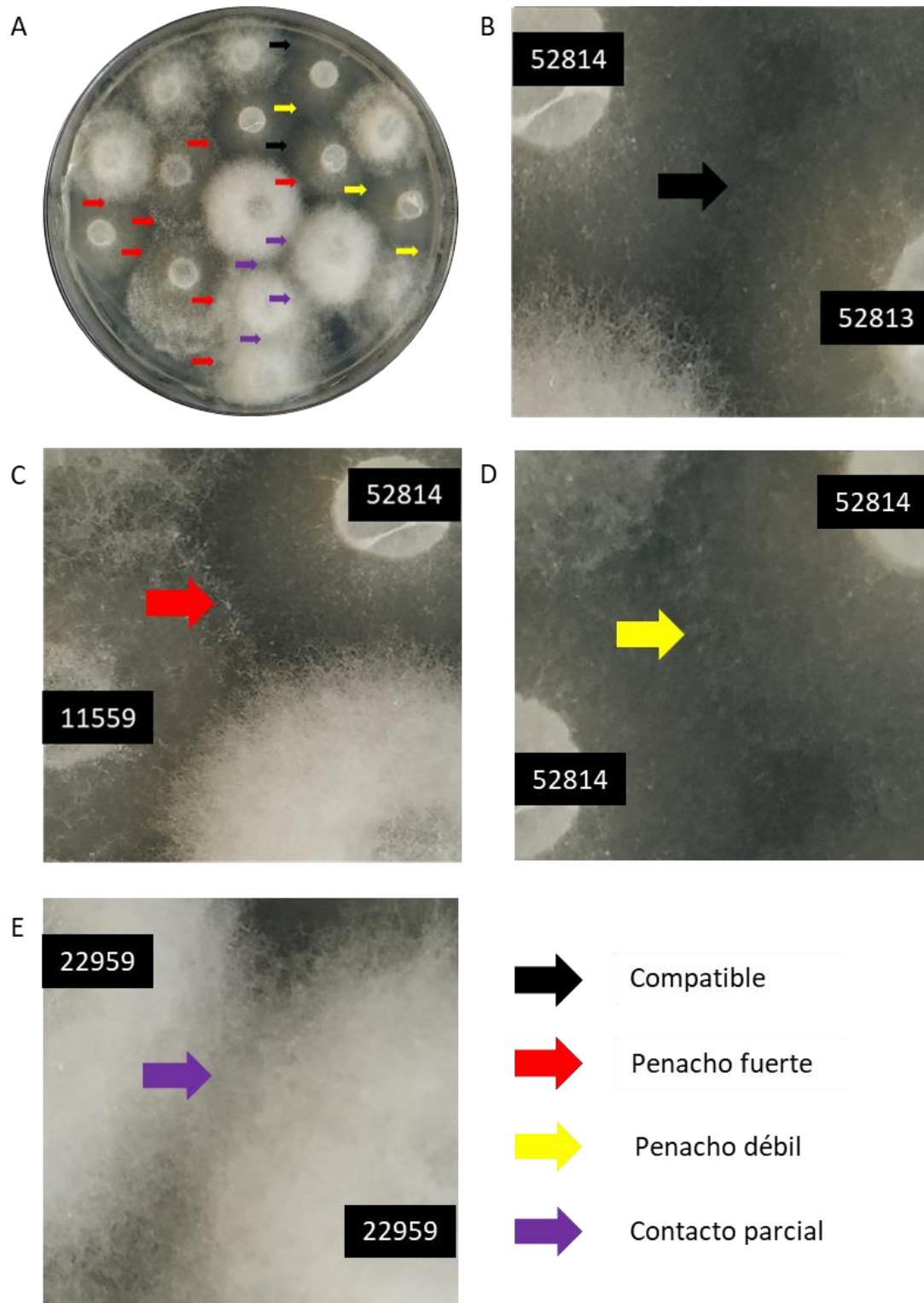


**Figura 9.- Interacción en el co-cultivo entre la cepa 559 y la variante nv+ b-.** A) Co-cultivo en placa Petri. B) Micrografía del co-cultivo en placa Petri (de izquierda a derecha: 559, 814 nv+ b-).

La incompatibilidad vegetativa ha sido ampliamente reportada, y actualmente existen métodos de detección de grupos fúngicos vegetativamente compatibles a nivel macroscópico. Cuyos rasgos, en la mayoría de los casos son fácilmente detectados, debido a que dentro de sus características destacan la acumulación de hifas en la zona de contacto entre dos individuos fúngicos (Burgess *et al.*, 2009). En *Rhizoctonia solani* esta morfología recibe el nombre de penacho, y dependiendo de la reacción, este puede ser considerado como: penacho fuerte, alta acumulación hifal; penacho débil, baja acumulación hifal; y compatibilidad vegetativa, no existe acumulación hifal (Ferrucho *et al.*, 2012).

Debido a que nuestras observaciones microscópicas revelaron indicios de incompatibilidad vegetativa, decidimos evaluar si este fenotipo se aprecia en la interacción de la variante 814 nv+ b- y otras cepas de *R. microsporus*. Para ello, escogimos al azar seis cepas silvestres de la colección de *R. microsporus* del LIM, y llevamos a cabo ensayos de multi-cultivos de acuerdo con el punto 5.5.

Una vez establecidas nuestras seis cepas nos percatamos que dentro de estos individuos fúngicos hubieron cepas compatibles e incompatibles sexualmente, además de cepas de sexo desconocido; las cuales habían sido sexualmente caracterizadas por José Francisco Cabrera Rángel con las cepas de referencia 813 y 814 wt. Por ello nuestro diseño, además de proveer información de la incompatibilidad vegetativa, también podría revelar si la compatibilidad sexual en *R. microsporus* es el único camino para transmitir a los *Narnavirus* entre dos cepas distintas.



**Figura 10.- Interacciones hifales exhibidas durante el multi-cultivo. A-D)** Muestran interacciones hifales. El color de las flechas indica el tipo de contacto hifal.

El multi-cultivo de las 6 cepas de *R. microsporus* nos permitió observar los contactos hifales previamente descritos en *R. solani*. Además, también pudimos apreciar otro tipo de contacto hifal, al cual decidimos nombrar como, contacto parcial, debido a que evade el contacto hifal.

Una vez terminado el tiempo de incubación (2 días) (Fig. 10A). Encontramos que: la compatibilidad vegetativa se asoció al contacto hifal de las cepas compatibles sexualmente (Fig. 10B); los penachos fuertes se formaron entre las cepas no compatibles sexualmente (Fig. 10C); y por último los penachos débiles y el contacto parcial se observaron entre el contacto de hifas provenientes de la misma cepa (Fig. 10D, E).

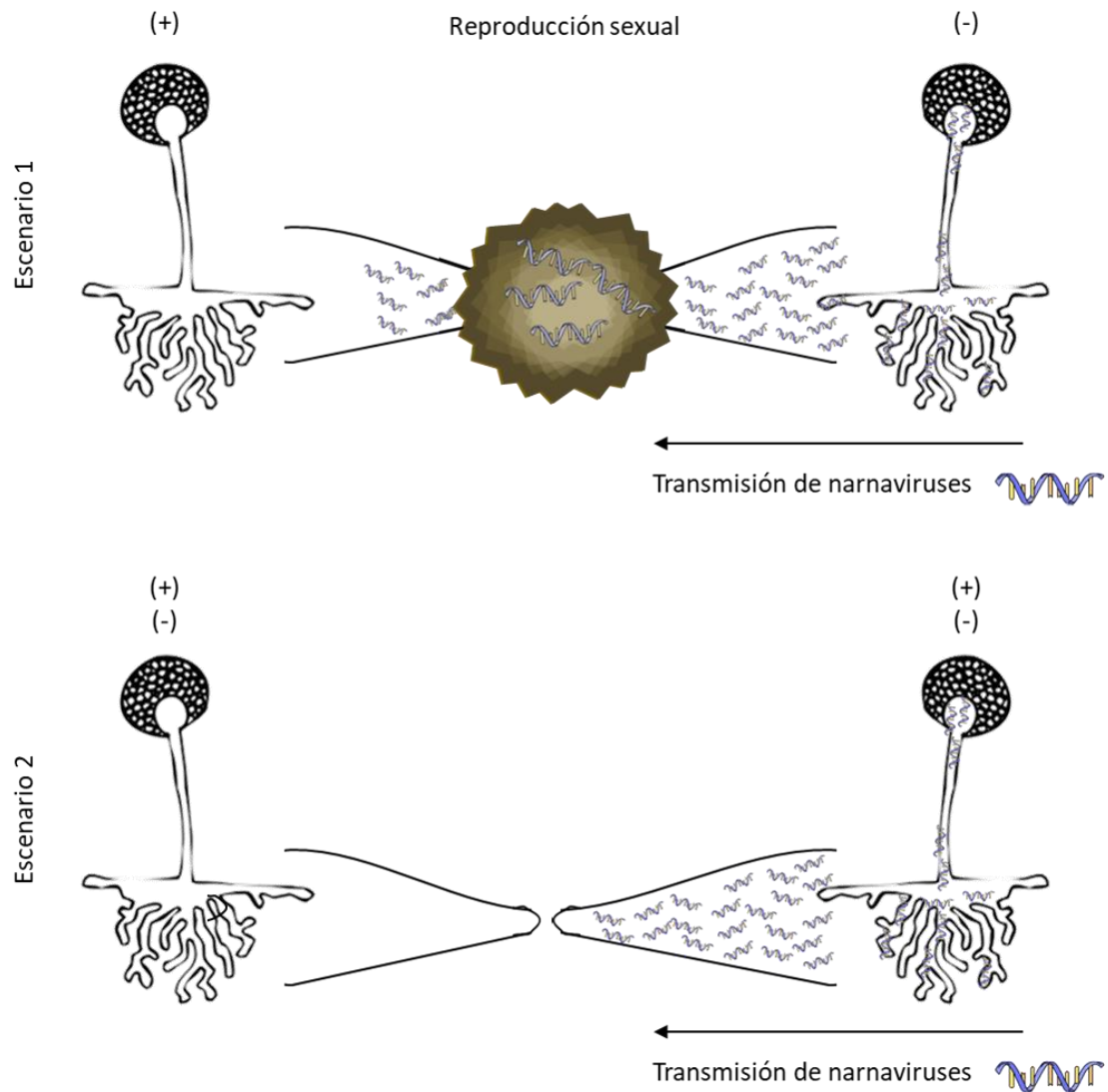
En este punto, nuestras observaciones morfológicas macro y microscópicas, sugieren la existencia de eventos de fusión hifal solamente entre las cepas compatibles sexualmente, y no en aquellas con el mismo sexo de la cepa 814, aquellas de sexo desconocido, ni entre la misma cepa.

#### 6.1.2 La transmisión de los *Narnavirus* se lleva a cabo indistintamente de la compatibilidad sexual entre las cepas de la especie *R. microsporus*

Debido a que nuestros resultados apuntan a eventos de fusión hifal únicamente en cepas compatibles sexualmente. Decidimos construir un diseño experimental para probar la reproducción sexual como único mediador de transmisión de los *Narnavirus*.

Para ello, en la Figura 11 esquematizo el proceso de transferencia de los *Narnavirus* vía reproducción sexual. En el escenario 1, las cepas compatibles sexualmente (+,-) inducen el intercambio citoplasmático por efecto de la fusión hifal durante la formación de zigoesporas que deriva en la transferencia de la cepa donadora de *Narnavirus* (sexo -) hacia el hongo receptor. En el escenario 2, dos hongos con el mismo sexo (+,+ o -,-) e incompatibles sexualmente no inducen el intercambio citoplasmático debido a la nula formación de zigoesporas y como consecuencia la transferencia de los *Narnavirus* no es posible.

Si bien, diseñamos este experimento considerando la reproducción sexual, no necesariamente esperaríamos la presencia de zigoesporas (debido a las condiciones de cultivo no específicas para este proceso), sino la fusión de hifas por efecto de la compatibilidad sexual, que derive en el intercambio citoplasmático entre los hongos y como consecuencia la colecta de estructuras de reproducción asexual y/o sexual (con los virus) del co-cultivo.



**Figura 11.- Esquematación de la transferencia de los *Narnavirus regida* por la compatibilidad sexual. Escenario 1-** Transferencia mediada por la fusión de hifas durante la formación de zigosporas. **Escenario 2-** Ausencia de transmisión debida a la incompatibilidad sexual.

Y como resultado, en los co-cultivos de cepas compatibles sexualmente esperamos la presencia de esporas asexuales y posiblemente sexuales. En los co-cultivos de cepas incompatibles sexualmente, únicamente esperamos esporas asexuales.

En esta ocasión establecimos una estrategia metodológica diferente de transferencia horizontal, la cual se encuentra desglosada en el punto 5.4.2. Esta estrategia, contempla interacciones fúngicas de “contacto cercano (5 mm de distancia)” y

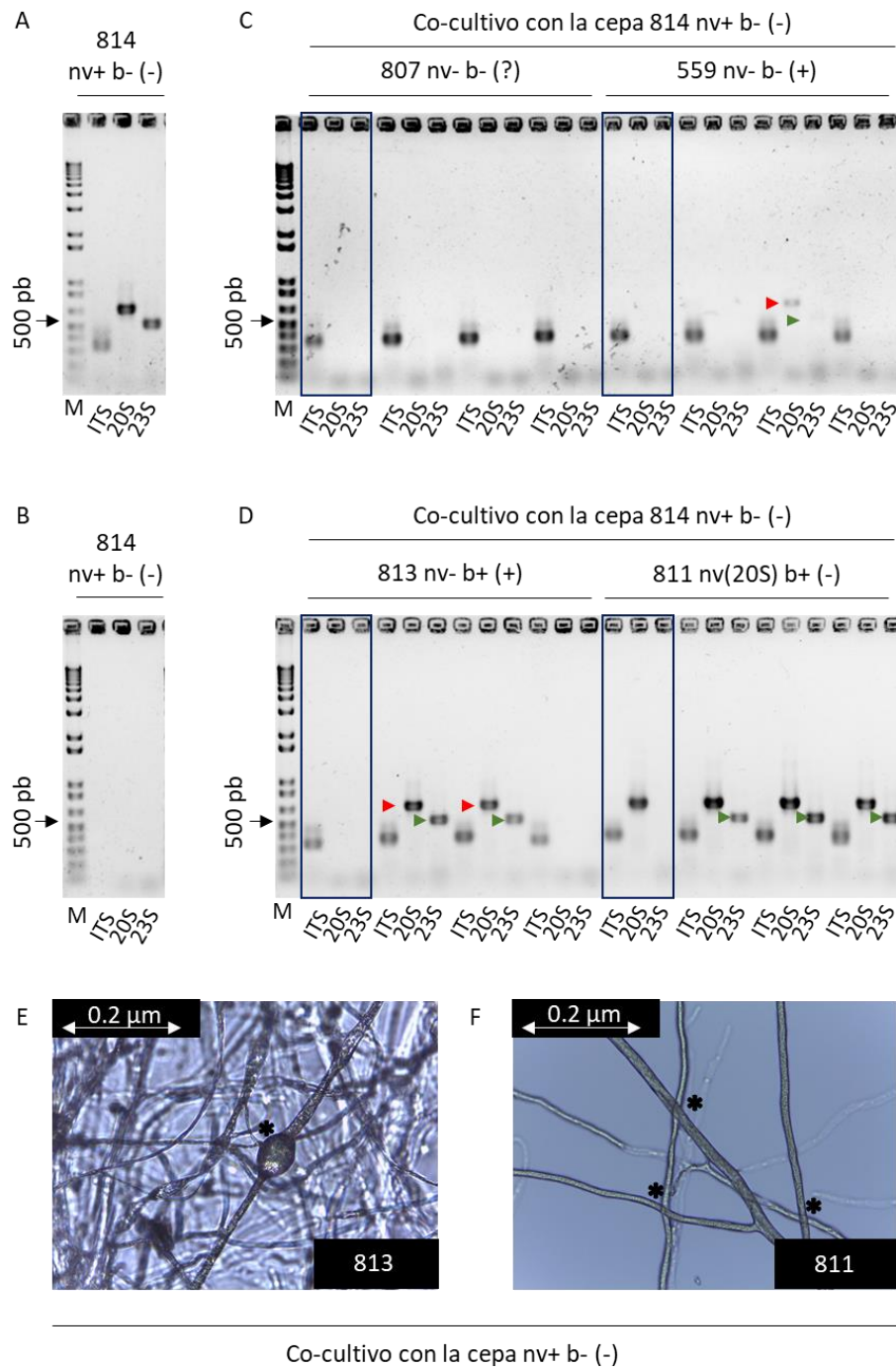
prolongadas (8 días comparada con la estrategia 1), además de un método de extracción de RNA estandarizado para este propósito.

Una vez más, tomando ventaja del cepario de *R. microsporus* del LIM previamente caracterizadas sexualmente por José Francisco Cabrera Rangel, escogimos dos cepas compatibles sexualmente (813, 559), una cepa incompatible sexualmente (811) y una cepa de sexo desconocido (807) (Tabla 3). Las cuales se pusieron en co-cultivo con la variante genética 814 nv+ b- del lote 2 (generado en diciembre de 2019).

Dentro de estos hongos, a la cepa 559 interesantemente no se le había podido asignar un sexo al emparejarlas con las cepas de sexo negativo 814 y sexo positivo 813 en su condición wt. Es decir, cuando en las cepas de evaluación de sexo habitaba *Mycetohabitans* spp. Sin embargo, al co-cultivarla bajo las condiciones de inducción de la reproducción sexual (estandarizada por José Francisco Cabrera Rangel) con la variante genética 814 nv+ b- (lote 2) fue posible observar la formación de zigoesporas y por lo tanto se le asignó el sexo positivo.

Con la implementación de este nuevo diseño experimental encontramos resultados interesantes. Por una parte, durante la detección de los virus en el micelio generado por las esporangioesporas colectadas del emparejamiento de la cepa 807 (sexo desconocido) con la variante 814 nv+ b-, no pudimos detectar la presencia de los *Narnavirus* (Fig. 12C), lo cual está en acuerdo con su falta de asignación sexual. Por otro lado, en el emparejamiento de las cepas 559 y 813, cuyo sexo asignado es +, con la variante 814 nv+ b- pudimos detectar la presencia de los *Narnavirus* (Fig. 12C-D), observándose además una coloración amarilla (típica durante la reproducción sexual) en la zona de contacto, confirmando así la transmisión vía reproducción sexual. Comparando los resultados de la estrategia 1 (co-cultivo de la cepa 559 y 814 nv+ b-) y 2, con la que si pudimos detectar la presencia de los *Narnavirus* en la cepa 559; creemos que la distancia y el tiempo de contacto son factores determinantes en el reconocimiento sexual y por ende en la fusión hifal e intercambio citoplasmático.

Contrastantemente detectamos la presencia de los *Narnavirus* en la cepa 811 (Fig. 12D), la cual es incompatible sexualmente con la variante 814 nv+ b-. En el caso especial de esta cepa, nuestro grupo de trabajo (LIM) detectó la presencia natural del *Narnavirus* RmNV-20S, lo cual se confirma en este trabajo, pero no la presencia del *Narnavirus* RmNV-23S que al co-cultivar con la variante 814 nv+ b- detectamos en todas las réplicas.



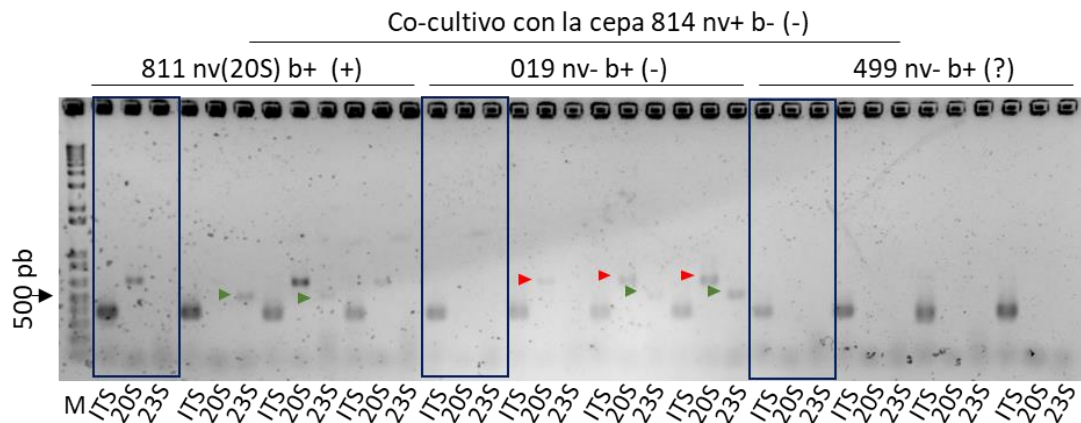
**Figura 12.- Evaluación de la transmisión de *Narnavirus* en los co-cultivos entre nv+ b y cepas silvestres de *R. microsporus*. A-B) Controles positivo y blanco, respectivamente. C-D) Detección de narnavirus. El rectángulo azul muestra el genotipo de la cepa wt control. Los triángulos rojo y verde indican transferencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S, respectivamente. En la parte superior se**



indica la cepa, su genotipo (*narnavirus - Mycetohabitans*) y su sexo. **E)** Interacción hifal entre cepas compatibles sexualmente. **F)** Interacción hifal entre cepas no compatibles sexualmente. \* Indica los contactos hifales.

En el caso de los co-cultivos entre las cepas compatibles sexualmente, 813 y nv+ b-, las micrografías (Fig. 12E) nos permitieron observar primordios de zigoesporas lo cual explica la transferencia. Pero en el caso de la cepa incompatible sexualmente, 811, no encontramos primordios de zigoesporas y tampoco puntos de fusión hifal (Fig. 12F), al contrario, observamos un sobrecrecimiento de hifas lo cual puede estar asociado a una falta de reconocimiento hifal.

Debido a que nuestros resultados sugieren que la transmisión de los *Narnavirus* también sucede entre cepas incompatibles sexualmente, decidimos conducir un segundo experimento considerando dos cepas de sexo -, 811 y 019, y una cepa de sexo desconocido, 499. A diferencia del primer experimento, donde la detección de los *Narnavirus* se realizó sobre micelio de tres días de crecimiento, producto de las estructuras de reproducción colectadas en los co-cultivos, (descrito en 5.4.2), en este segundo experimento detectamos los virus directamente del material genético de las esporas colectadas del co-cultivo.



**Figura 13.- Evaluación de la transmisión de *Narnavirus* en los co-cultivos entre nv+ b y cepas silvestres de *R. microsporus*.** El rectángulo azul muestra el genotipo de la cepa wt control. Los triángulos rojo y verde indican transferencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S, respectivamente. En la parte superior se indica la cepa, su genotipo (*narnavirus - Mycetohabitans*) y su sexo.

Este segundo experimento nos permitió confirmar la transmisión del *Narnavirus* RmNV-23S a la cepa 811, y además pudimos apreciar el mismo resultado (detección) en la cepa 019 pero no así en la cepa 499 (Fig. 13).

Nuestros resultados en conjunto sugieren que el proceso de reproducción sexual no es el único mediador de la transmisión de los *Narnavirus* en la especie *R. microsporus*. Implicando que la transmisión vía fusión hifal no es el mecanismo de transmisión participante en ausencia de la reproducción sexual, lo cual se encuentra en acuerdo con las observaciones microscópicas, así como con la nula detección de los *Narnavirus* en las cepas no competentes sexualmente. No obstante, este proceso desconocido también implica una aparente preferencia por las cepas con un sexo asignado, derivado de su cruce con las cepas controles 814 y 813, y que además se encuentran en asociación con *Mycetohabitans*.

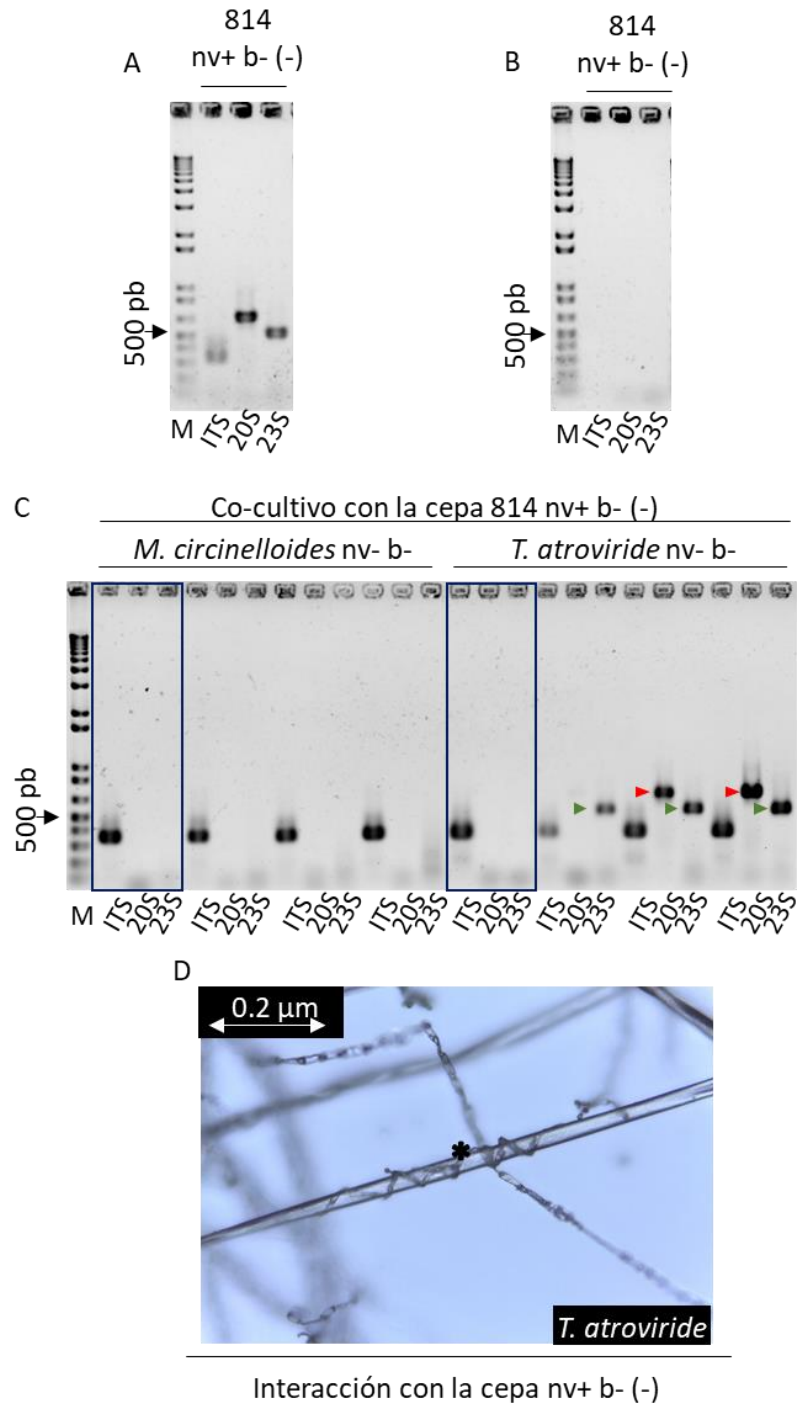
### 6.1.3 Los *Narnavirus* también se pueden transferir a hongos no relacionados con *R. microsporus*

Debido a que nuestros resultados sugieren un proceso de transmisión desconocido de los *Narnavirus* a cepas no compatibles sexualmente, decidimos realizar co-cultivos con hongos no relacionados al género *Rhizopus*, que además no son capaces de emparejarse sexualmente con *R. microsporus*.

Para ello, realizamos co-cultivos con *M. circinelloides*, dado que es un hongo perteneciente al subphylum *Mucoromycotina* y en el que además, la maquinaria de SPT controla los procesos de regulación sexual y asexual (Cervantes *et al.*, 2013). También consideramos el co-cultivo con *Trichoderma atroviride*, dado que es un hongo más alejado filogenéticamente de *Rhizopus* y que además posee un sistema activo de micoparasitismo que en ausencia de *Mycetohabitans* es capaz de tener un efecto sobre *R. microsporus* y que en términos de parasitismo podría tomar los *Narnavirus* del ambiente intracelular de *R. microsporus* (Seidl-Seiboth *et al.*, 2014).

Para llevar a cabo este ensayo consideramos también la estrategia 2 de transferencia horizontal de *Narnavirus* (punto 5.4.2) descrita anteriormente.

No pudimos detectar a los *Narnavirus* en *M. circinelloides* pero en contraste si fuimos capaces de detectar a los virus en todos los co-cultivos llevados a cabo con *T. atroviride*, siendo positiva la detección de al menos uno de los *Narnavirus* (Fig. 14C). Aunado a ello, al realizar las observaciones microscópicas en la interacción de la variante 814 nv+ b- y *T. atroviride* pudimos notar el enrollamiento de este último hongo sobre *R. microsporus* (Fig. 14D), indicando micoparasitismo.



**Figura 14.- Evaluación de la transmisión de *Narnavirus* en los co-cultivos entre nv+ b y cepas fúngicas distintas a *R. microsporus*. A-B) Controles positivo y blanco, respectivamente. C) Detección de narnavirus. El rectángulo azul muestra el genotipo de la cepa wt control. Los triángulos rojo y verde indican transferencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S, respectivamente. En la parte superior se indica la cepa y su genotipo (narnavirus - *Mycetohabitan*s). E) Interacción hifal entre nv+ b- y *T. atroviride* \* Indica contacto hifal.**

En este punto, y considerando nuestras observaciones microscópicas, así como la detección en *T. atroviride*; nuestros resultados implican que los *Narnavirus* pueden ser transferidos a otros hongos fuera de la especie *R. microsporus*, pero tal vez requieren de procesos como el micoparasitismo para poderse transmitir.

## 7 Discusión

### 7.1 Efecto de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo y crecimiento de *R. microsporus*.

Durante los últimos quince años la especie fúngica *R. microsporus* ha cobrado gran relevancia por la peculiaridad de hospedar una bacteria la cual contribuye en la producción de toxinas y modula aspectos inherentes al desarrollo del hongo (Partida-Martínez & Hertweck, 2005; Partida-Martínez *et al.*, 2007; Mondo *et al.*, 2017). Estas características le han otorgado a esta simbiosis mutualista la definición de holobionte fúngico (Partida-Martínez, 2017). Ahora, nuestro grupo de trabajo ha descubierto dos nuevos jugadores de origen viral en el holobionte *Rhizopus microsporus*: los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S (Espino-Vázquez *et al.*, 2020). Reforzando el postulado que asevera una diversa y abundante microbiota en los holobiontes fúngicos (Partida-Martínez, 2017). Sin embargo, se desconocía si su presencia exhibe algún fenotipo en *R. microsporus*.

Actualmente, no se ha asociado fenotipo evidente a los virus del género *Narnavirus* en sus hospederos (Hillman & Cai, 2013). Sin embargo, en nuestro trabajo y por primera vez, logramos revelar fenotipos en el holobionte fúngico *Rhizopus-Mycetohabitans* por efecto de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S.

En hongos, los simbiosis virales han sido ampliamente descritos como patógenos, debido principalmente a su capacidad de producir defectos en el crecimiento y desarrollo de su hospedero (Son *et al.*, 2015). Sin embargo, dentro de nuestros resultados, encontramos que la producción de biomasa de *R. microsporus* se ve comprometida por la ausencia de ambos simbiosis: virales y bacterianos (Fig. 5). Contrario a cuando uno de los simbiosis permanece en *R. microsporus*, cuya producción de biomasa es similar al del fenotipo wt. Posicionando a los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S como simbiosis virales benéficos para *R. microsporus*.

Los micovirus además, han mostrado decrementar el crecimiento y virulencia de su hospedero (Son *et al.*, 2015). En este contexto, a los *Narnavirus*, cuyos estudios se han realizado mayormente en *S. cerevisiae*, no se les ha asociado un fenotipo evidente salvo una alta replicación bajo condiciones de estrés (Matsumoto *et al.*, 1990; Hillman & Cai, 2013). Por lo que en este tenor, evaluamos a las variantes genéticas del primer lote (generado en agosto de 2018) con miras en revelar el posible efecto de los simbiosis virales en el crecimiento de *R. microsporus* en tres diferentes medios; considerando el medio donde la replicación de los *Narnavirus* oscila (Espino-Vázquez

*et al.*, 2020), y el medio donde *R. microsporus* en asociación con *Mycetohabitans spp.*, produce mayor cantidad de compuestos metabólicos virulentos (Partida-Martínez *et al.*, 2007; Scherlach *et al.*, 2006). No obstante, nuestros resultados demostraron que la producción de biomasa no depende del sustrato, sino de la asociación de *R. microsporus* con sus simbioses. Donde la interacción de estos con el medio parece también suponer una ventaja para *R. microsporus*, visualmente apreciable en la producción estable de biomasa de las variantes genéticas en los tres medios (Fig. 5).

Esta aparente ventaja en la producción de biomasa por la asociación de los simbioses con *R. microsporus*, está de acuerdo con Espino-Vázquez *et al.*, (2020), cuyos resultados sugieren que *Mycetohabitans spp.*, podría proveer de una adicional plasticidad metabólica en el crecimiento de *R. microsporus* bajo condiciones de estrés. Siendo plausible esta teoría también para los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S por la capacidad de los micovirus de reprogramar el metabolismo de su hospedero (Son *et al.*, 2015). Lo que refuerza nuestros resultados experimentales y estadísticos, dónde la interacción de los simbioses y los simbioses con el sustrato explican las diferencias de producción de biomasa entre las variantes genéticas de la cepa 814 wt.

La Dra. Astrid N. Espino Vázquez, miembro de nuestro grupo de trabajo, logró generar un segundo lote (diciembre de 2019) de variantes genéticas de la cepa 814 wt, considerando las posibles combinaciones de los simbioses con su hospedero, brindando así la posibilidad de evaluar confiablemente el fenotipo asociado de los *Narnavirus* y su hospedero fúngico. Los resultados de este nuevo lote, sin embargo, no corroboraron totalmente los efectos observados en el primer lote.

Por una parte, la ausencia de los simbioses en *R. microsporus* no varió la producción de biomasa entre las variantes genética (Fig. 6). Sin embargo, nuestros análisis estadísticos continúan posicionando a *Mycetohabitans spp.*, y a los *Narnavirus* como principales factores de variabilidad tal como en el lote 1. Además, y no menos importante, nuestra experiencia nos impulsa a hipotetizar que con el transcurrir del tiempo la disminución de biomasa en las variantes fúngicas 814 nv- b- (lote 2) podrá observarse, tal como en la variante 814 nv- b- del lote 1. Lo cual también puede deberse a una pérdida de la plasticidad fenotípica en *R. microsporus* debido a la ausencia de sus simbioses bacterianos y virales.

La plasticidad fenotípica se define como la habilidad de un organismo para producir fenotipos ajustables a estreses bióticos y abióticos. La mayoría de los cuales dependen

íntimamente de procesos de regulación epigenética del hospedero y su interacción con los simbioses asociados (Vannier *et al.*, 2015). Bajo este tenor, evidencia reciente sugiere la intervención de mecanismos epigenéticos activos en el establecimiento y desarrollo de las simbiosis mutualistas. Por ejemplo, en la asociación *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti* se requiere de un correcto estado de metilación para una eficiente nodulación, donde además el micro RNA “miR-3972” es únicamente inducido en los nódulos maduros. En el caso de *R. microsporus* se ha propuesto que la intervención de un sistema activo T3SS por parte de *Mycetohabitans spp.*, es necesario para el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis endo-fúngica. Sin embargo, ignoramos como los *Narnavirus* se asocian y producen cambios fenotípicos en *R. microsporus*.

Bajo este contexto, y considerando la interacción de organismos eucariotas y virus, se ha reportado que la persistencia de los simbioses virales se encuentra relacionada con cambios epigenéticos en sus hospederos. Donde la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular, senescencia, supervivencia, inflamación e inmunidad; se modifican por efecto de la presencia viral (Paschos & Allday, 2010). Interesantemente, la modulación viral del hospedero viene acompañada del mecanismo de silenciamiento postranscripcional (SPT), también conocido como silenciamiento epigenético (Wolffe & Matzke, 1999). En el cual el rol activo de las proteínas polimerasas dependientes de RNA (RdRp: censan secuencias de RNA extraño y de las cuales producen moléculas de doble cadena de RNA “dsRNA”), proteínas Dicer (cortan las moléculas dsRNA y producen fragmentos de interferencia pequeños de RNA “siRNAs”) y las proteínas Argonautas (Ago: usa los siRNAs como guía para encontrar secuencias específicas de RNAs mensajeros) putativamente defienden al organismo de ácidos nucleicos invasivos (virus) (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017). No obstante, la maquinaria de SPT puede ser reprimida junto a una amplia cantidad de transcritos del hospedero mediante la competencia y amplificación de transcritos de RNA por parte de las RdRp virales, produciendo dsRNA intermediarios que pueden actuar como sustrato del mecanismo de SPT y degradar los transcritos del hospedero (Li *et al.*, 2014)

Bajo este enfoque, los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S hospedados por *R. microsporus* son virus + ssRNA que codifica únicamente para una RdRp con la cual dirigen su propia replicación, los cuales incrementan hasta 4.5 millones de copias virales por ng de cDNA. Incluso cuando *R. microsporus* posee la maquinaria de SPT

necesaria para reprimir la replicación viral (Espino-Vázquez et al., 2020). Ante este fenómeno y por los antecedentes previamente mencionados, nos surge la pregunta ¿la maquinaria de SPT es modulada por los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S para cumplir una función diferente en *R. microsporus*?

Desde que nuestros experimentos revelaron la interacción de los *Narnavirus* y *Mycetohabitans spp.*, en la producción estable de biomasa, dónde principalmente *Mycetohabitans spp.*, parece proveer de una mayor plasticidad metabólica para *R. microsporus* (Espino-Vázquez et al., 2020); creemos que la presencia y actividad de los simbiontes virales induce cambios epigenéticos mediante la replicación de RNAs del hongo por acción de su RdRp, lo cual concluye con el secuestro y función de la maquinaria de SPT en el holobionte fúngico para la estable producción de biomasa en diferentes sustratos.

Además, durante la marcha de nuestros experimentos, notamos que la variante genética 814 nv- b- del primer lote, redujo su producción de biomasa a través del tiempo. Lo cual también comenzamos a observar en las variantes 814 nv- b- del lote 2. En este contexto, trabajos recientes han revelado que la intervención de secuencias de RNA, específicamente dsRNA, producidos en el núcleo o en el citoplasma, son capaces de inducir metilaciones y silenciamiento de genes nucleares. En plantas, por ejemplo, la inducción del mecanismo de SPT por un virus transgénico es capaz de metilar genes nucleares. En *Caenorhabditis elegans* el SPT mediado por dsRNA puede influenciar el DNA a través de las generaciones, donde la expresión de genes nucleares se mantiene reprimida incluso después de retirar la exposición a dsRNA (Wolffe & Matzke, 1999). Por ello, hipotetizamos que los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S inducen modificaciones epigenéticas a nivel nuclear (mediante un mecanismo desconocido), las cuales son perdidas gradualmente en las variantes genéticas 814 nv- b-, concluyendo en la disminución de biomasa.

Por otro lado, desde el descubrimiento de la asociación mutualista entre el hongo *R. microsporus* y *Mycetohabitans spp.*, debido a la producción de rhizoxin por parte de la endobacteria (Partida-Martínez & Hertweck, 2005), aún se desconoce como *Mycetohabitans spp.*, controla el sistema de reproducción asexual de su hospedero fúngico. Ahora, con el descubrimiento de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S, nos dimos a la tarea de investigar si su presencia induce cambios en el proceso de reproducción asexual controlado por *Mycetohabitans spp.*



Mediante la evaluación de las variantes genéticas de la cepa 814 wt hospedante de *Mycetohabitans spp.*, y los *Narnavirus*, fuimos capaces de encontrar que la presencia de los simbioses virales en *R. microsporus* produce cambios sustanciales en la producción de esporangioesporas. Específicamente, observamos que la ausencia de los *Narnavirus* incrementa el número de esporangioesporas producidas en comparación con el fenotipo silvestre (Fig. 7), suponiendo la presencia de los simbioses virales un costo para *R. microsporus*. Contrario a la producción de biomasa, este fenotipo se encuentra en total acuerdo con uno de los efectos más importantes asociados a la presencia de micovirus: decremento de la reproducción (Ghabrial *et al.*, 2015). El cual presumiblemente se debe a la modificación del metabolismo, el transporte celular y/o a la supresión de los procesos de silenciamiento postranscripcional del hospedero. Los que además de actuar en la defensa antiviral (Son *et al.*, 2015) han demostrado participar en la regulación de distintos procesos del desarrollo como el vegetativo y el sexual (Nicolás & Garre, 2016).

En hongos, los procesos de morfogénesis y reproducción requieren del transporte de enzimas (quitinasas, etc) a puntos específicos de la pared celular, las cuales comúnmente llegan a su destino mediante vesículas (Joffe *et al.*, 2016). El sistema vesicular no solo está implicado en la remodelación de la pared, sino en el transporte de proteínas estructurales, lípidos, etc., que son previamente traducidos, empaquetados en vesículas del retículo endoplasmático principalmente (RE) y posteriormente enviados a los compartimentos membranales donde cumplen su función (Lodish *et al.*, 2001).

En este contexto, reportes previos han denotado la función de los compartimentos membranales como espacios idóneos para el ensamblaje y replicación de virus en el espacio celular. Dentro los cuales, la mayoría de los virus de RNA de cadena positiva prefieren el RE, donde reclutan la maquinaria del hospedero y secuestran la membrana mediante la inducción de formación de vesículas que los protegen de un ambiente hostil (Ritzenthaler & Elamawi, 2006; Nagy & Pogany, 2012).

Estudios en *Cryphonectria parasítica* confirman un aumento en la producción vesicular debido a la presencia de un micovirus + ssRNA, *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1), además el secuestro de la maquinaria vesicular inhibe el encapsulamiento y secreción de la proteína criparin al ambiente extracelular (Kazmierczak *et al.*, 2012). Bajo este enfoque, la reproducción asexual es inducida por *Mycetohabitans* en *R.*

*microsporus* quien posiblemente requiera de la producción de enzimas implicadas en la remodelación celular (Moebius *et al.*, 2014), y considerando que estas proteínas son importantes para la morfogénesis en *Mucor circinelloides*, un hongo también perteneciente al subphylum *Mucoromycotina* (Nicolás *et al.*, 2015), es plausible considerar que la alta replicación de los *Narnavirus* durante el desarrollo de *R. microsporus* “4.5 millones de copias virales por ng de cDNA” (Espino-Vázquez *et al.*, 2020), secuestra una fracción del sistema vesicular de su hospedero fúngico evitando así una alta remodelación de la pared celular explicando el costo durante la reproducción asexual (Fig. 7).

Finalmente, pero no menos importante, nuestros resultados también sugieren una gran influencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en el desarrollo sexual de *R. microsporus*.

Previamente se ha demostrado que en la alianza *Rhizopus-Mycetohabitans* la presencia de la endobacteria en ambos parentales es requerida para el éxito de la reproducción sexual (Mondo *et al.*, 2017). Donde *Mycetohabitans spp.*, posiblemente estimula la expresión de *ras2-1*, el cual que codifica una proteína pequeña G (GTPase). Cuya funcionalidad radica en la transferencia de las señales percibidas para el control de procesos relacionados a la morfogénesis con ayuda de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Mondo *et al.*, 2017).

No obstante, nosotros encontramos que no solo la presencia del simbionte bacteriano es importante para la correcta reproducción sexual de *R. microsporus*, sino también su interacción con los simbiontes virales. Gracias al proceso de evaluación que llevamos a cabo con la colección completa de variantes genéticas de la cepa 814 wt (lote 2), nos percatamos que la ausencia de *Mycetohabitans* y los *Narnavirus* de las variantes genéticas 814 nv- b- durante el proceso de reproducción sexual con la cepa 813, reduce parcial o totalmente el número de zigoesporas producidas. Siendo contrario el efecto cuando al menos uno de ambos huéspedes (814 nv+ b-, 814 nv-b+) se encuentra en asociación con su hospedero fúngico (Fig. 8).

En la asociación mutualista *R. microsporus-Mycetohabitans spp.*, se ha propuesto al sistema T3SS como uno de los principales mecanismos mediante el cual la endobacteria controla el sistema de reproducción asexual de su hospedero (Lackner *et al.*, 2010). Notablemente las bacterias que expresan este sistema lo usan en la

manipulación de la respuesta inmune, de la dinámica del citoesqueleto, el transporte vesicular y las vías de transducción de señales de su hospedero (Deng *et al.*, 2017).

La transducción de señales (implicada en el destino celular, el control de la proliferación y supervivencia celular mediante la acción de morfógenos) (Basson, 2012), parece tener una alta implicación en los procesos de reproducción sexual y asexual en hongos.

En estos, la formación de cuerpos fructíferos (proceso que demanda de una alta coordinación celular de los programas de desarrollo y diferenciación) puede ser desencadenada por la presencia de metabolitos de producción endógena o de origen bacteriano. Por mencionar algunos ejemplos; *Aspergillus nidulans* sintetiza oxilipinas que le ayudan a inducir y mantener el balance entre reproducción sexual y asexual. *Penicillium notatum* requiere de un diterpeno que interesantemente produce durante todo el desarrollo y que al superar los 350 pM desencadena la esporulación. La formación de cuerpos fructíferos del hongo *Flavolus arcularius* se inducen por la presencia de basidifferquinona, producto metabólico de una cepa del género *Streptomyces* (Kües & Navarro-González, 2009). La producción de trisacáridos por parte de *Paenibacillus validus* promueve la elongación hifal y la esporulación del hongo micorrízico *Glomus intraradices*. El Fengycin A, un lipopéptido producido por *Bacillus subtilis*, causa la formación de clamidosporas en diversos taxones fúngicos. Por último la producción de metabolitos difusibles de *Ralstonia solanacearum* provoca diferenciaciones morfológicas en 34 especies de los phyla Ascomycota, Basidiomycota y Mucoromycota; y además produce ralsolamycin, un lipopéptido capaz de inducir la formación de clamidosporas en varias especies fúngicas (Spraker *et al.*, 2016).

En el caso de los hongos pertenecientes al subphylum *Mucoromycotina* la presencia del ácido trispórico es factor determinante en la activación del proceso de desarrollo sexual (Heitman *et al.*, 2006). Durante este proceso, un precursor del ácido trispórico, 4-dihidrotrispোরin, producto de la ruta de  $\beta$ -carotenos que se produce en cada uno de los hongos de sexo compatible involucrados, es posiblemente secretado al medio y censado por ambos parentales. En este punto el 4-dihidrotrispোরin es convertido a 4-ácido dihidromethyltrispোরico y trispোরin en los parentales sexo positivo y negativo respectivamente que posteriormente son secretados y tomados por el parental opuesto por difusión y convertido en ácido trispórico (Wetzel *et al.*, 2009).

Interesantemente este proceso estimula la producción de  $\beta$ -carotenos (Heitman *et al.*, 2006) asegurando el éxito del desarrollo sexual.

Previamente Lackner *et al.*, (2011) sugirió un escenario de complementación metabólica, debido a que *R. microsporus* provee a *Mycetohabitans spp.*, de glicerol como fuente carbono. Y, además el simbionte bacteriano posee un alto potencial de producción de metabolitos secundarios que podrían verse implicados en la comunicación hongo-bacteria. Por ello, un escenario de complementación metabólica podría ser también plausible en la síntesis de ácido trispórico (José Francisco Cabrera Rángel, tesis de maestría 2020), considerando que en ausencia de la endobacteria la producción de zigoesporas es escasa (o nula) y aparentemente no hay presencia de una coloración típica en las cruas (Mondo *et al.*, 2017) que en estudios previos se ha asociado a la síntesis de  $\beta$ -carotenos (Sahadevan *et al.*, 2013).

No sabemos si *Mycetohabitans* induce la maquinaria de reproducción sexual a través de la secreción de morfógenos o efectores proteicos. No obstante, las consecuencias de su actividad modulan la expresión de genes involucrados en la reproducción asexual y sexual (Mondo *et al.*, 2017).

En hongos los procesos de reproducción sexual y asexual se han visto ampliamente influenciada por el mecanismo de (SPT). Por ejemplo, *Neurospora crassa* suprime la expresión de secuencias repetitivas, como transposones, mediante el mecanismo de SPT. *Cryptococcus neoformans* también activa su mecanismo de SPT para silenciar elementos transponibles evitando una alta carga mutacional. Interesantemente, este mecanismo de silenciamiento no ha sido únicamente observado en la mantención de la integridad del genoma sino también en distintos procesos del desarrollo y en la regulación de la respuesta de señales ambientales. En este contexto *M. circinelloides* fue el primer modelo fúngico en el que el rol de secuencias endógenas de RNA (esRNA) y su producción se encuentran directamente implicadas en la regulación de diversas funciones biológicas mediante el mecanismo de SPT (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017).

En este modelo fúngico los procesos de reproducción asexual y sexual, la delección de componentes específicos de esta maquinaria reduce el número de esporangioesporas y zigoesperas. Donde además, la deficiencia del mecanismo de SPT sobre-expresa genes inherentes al control de la expresión y las señales de transducción, lo cual podría explicar la baja o nula expresión de genes relacionados a la remodelación de la

pared celular y por ende de la formación de estructuras de reproducción (Nicolás *et al.*, 2015).

Ahora, considerando que los virus en su condición de patógenos o huéspedes benéficos han mostrado tener la capacidad de modular el metabolismo de su hospedero, mediante el secuestro de la maquinaria de traducción y la maquinaria de SPT para asegurar su permanencia y replicación (Li *et al.*, 2014; Ahlquist, 2002). Y tomando en cuenta, nuevamente, la alta replicación de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en *R. microsporus*. Creemos que su presencia regula epigenéticamente genes implicados en el control de la expresión (como en *M. circinelloides*) a través del secuestro de la maquinaria de SPT, contribuyendo así en el éxito del proceso reproductivo sexual de *R. microsporus* en ausencia de *Mycetohabitans* spp.

Estos resultados demuestran un rol funcional único de los *Narnavirus* en el desarrollo sexual del holobionte *Rhizopus-Mycetohabitans*, dado que un fenotipo similar en este proceso por efecto de los micovirus no ha sido reportado en ningún modelo fúngico.

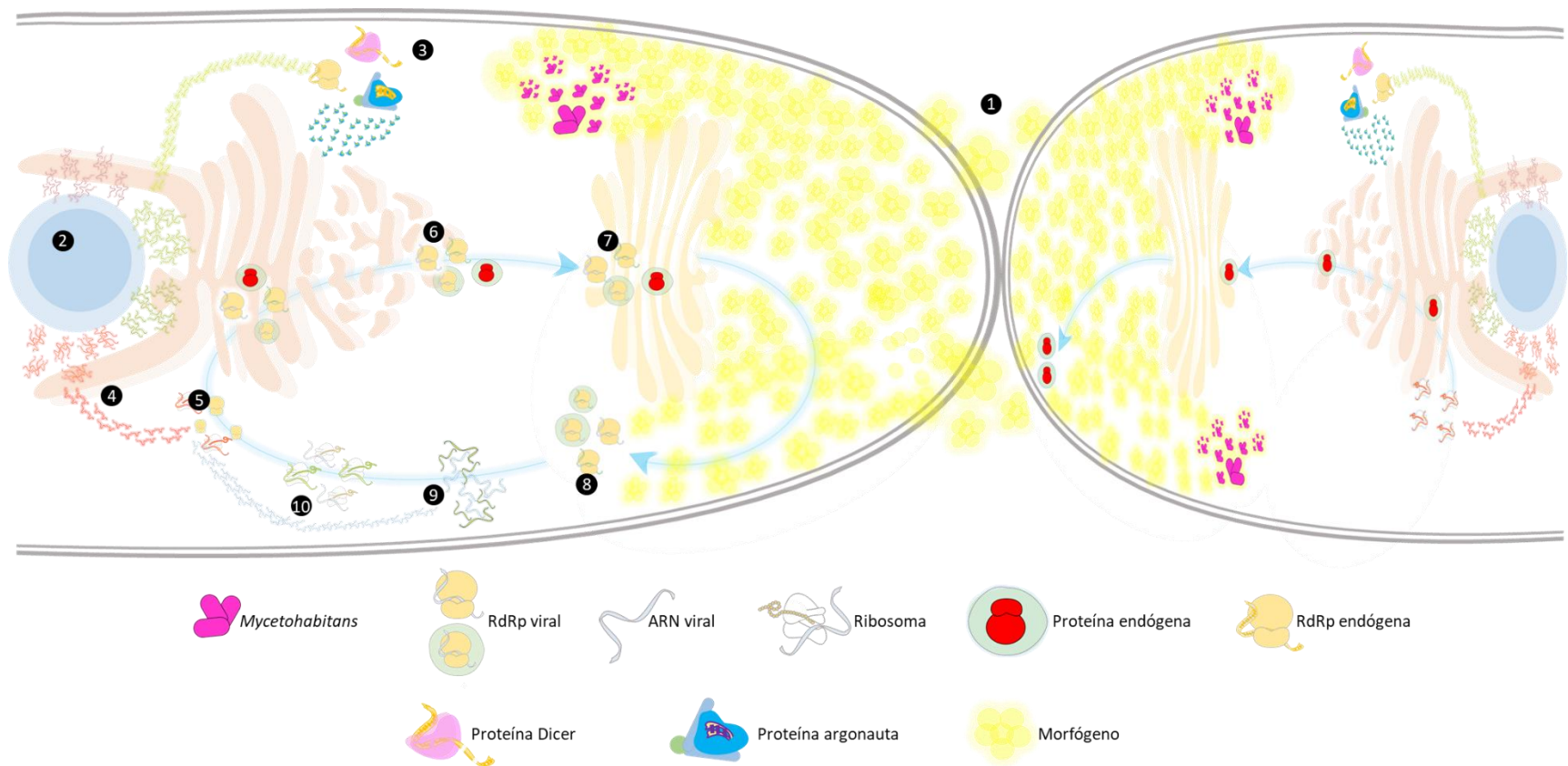
### **Nuestra hipótesis funcional de la influencia de los *Narnavirus* en el desarrollo y crecimiento de *R. microsporus***

Globalmente se ha estimado que existen un aproximado de  $1 \times 10^{31}$  partículas tipo virales, los cuales se encuentran en cada uno de los ambientes donde la vida está presente siendo hospedados por organismos procariotas, arqueas y eucariotas (Rohwer *et al.*, 2009). Gran parte del conocimiento alrededor del efecto dado por la presencia de los virus se ha generado en organismos eucariotas, plantas y animales específicamente, posicionándolos como patógenos. Sin embargo, muchos otros son benéficos para sus hospederos bajo condiciones específicas ambientales, en las cuales proveen de funciones esenciales que pueden ser condicionadas, es decir, que en ciertas circunstancias son benéficos y en otros implican un costo. Por mencionar algunos ejemplos: los virus bacterianos o fagos pueden existir por muchas generaciones integrados en el genoma bacteriano; lisogenia, y bajo determinadas condiciones, el genoma viral en algunas bacterias de la población comienza su ciclo lítico que deriva en la infección de bacterias competidoras no lisogénicas. *Drosophila* spp., puede ser infectada por varios virus, de los que la mayoría son comensales. Dentro de estos, *Drosophila* C virus (DCV) puede ser patógeno o mutualista, dado que reduce la supervivencia de moscas jóvenes, pero aumenta la capacidad reproductiva. Así también, la presencia del virus de DNA *Dysaphis plantaginea* densovirus (DpIDNV)

en el áfido *Dysaphis plantaginea* reduce la fecundidad pero produce la morfología alada, contribuyendo a la colonización de plantas nuevas cuando otras son muy concurridas (Roossinck, 2011).

Considerando estos ejemplos, y debido al costo de la presencia de los *Narnavirus* en el desarrollo asexual de *R. microsporus*. Así como su actividad benéfica en la producción de biomasa y desarrollo sexual de su hospedero fúngico, proponemos a la asociación entre *R. microsporus* y los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S como: mutualismo condicionado.

Además proponemos un modelo de interacción biológica entre *R. microsporus*, *Mycetohabitans spp.*, y los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S; esquematizado en la figura 15. El cual intenta explicar la actividad de los simbiositos en el desarrollo sexual de su hospedero fúngico



**Figura 15. Propuesta de interacción biológica entre *R. microsporus*, *Mycetohabitans* spp., y los Narnavirus RmNV-20S y RmNV-23S.** 1- Durante el desarrollo sexual, ambos hongos producen 4-dihidrotrispurin, posiblemente en concentraciones no suficientes como para inducir el proceso, el cual podría estar siendo secretado al medio y tomado por los hongos. Un cambio en la concentración puede iniciar la reacción de señalización, posiblemente catalizada por el gen *ras2-1*, que induce la expresión de los genes de la biosíntesis de ácido trispórico mediante la activación de las MAPK. 2-El ácido trispórico induce la expresión de

genes de la maquinaria de desarrollo sexual. Se activa la transcripción de los genes involucrados en la reproducción sexual. **3-**Se activa la maquinaria de SPT. Los genes implicados en la regulación de los genes implicados en la reproducción sexual son silenciados mediante la actividad de la maquinaria de SPT. En este punto la RdRp viral puede actuar como un potenciador de la señal de SPT al producir dsRNA de templados de RNA del hospedero específicos. **4-**Se activan los genes implicados en la reproducción sexual. El SPT de los genes de regulación permite la activación de los genes implicados en la reproducción sexual. **5-**Los RNAs implicados en la reproducción sexual son liberados del núcleo y traducidos en el citoplasma. Además, la RdRp viral captura su RNA viral y posibles RNAs del hospedero, para producir moléculas dsRNA. **6-7-**Las proteínas son empaquetadas en vesículas y enviadas a los diferentes compartimentos membranales donde ejecutan su función. **8-**Las RdRp virales se encuentran replicando su genoma y posibles RNAs del hospedero dentro/fuera de vesículas. **9-**El RNA viral y del hospedero, en su forma dsRNA, son liberados al citoplasma. **10-**El RNA viral es traducido por acción de los ribosomas del hospedero (RdRp). La maquinaria de SPT recluta los dsRNAs producidos por la RdRp viral.



## 7.2 Transmisión horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S a otros hongos

Tipicamente los micovirus se encuentran confinados al reino de los hongos ya que carecen de proteínas de movimiento (Son *et al.*, 2015), es decir, no codifican para proteínas que interactúan con la membrana endoplasmática y por ello no pueden ingresar en otra célula (Heinlein & Epel, 2004).

Debido a la carencia de proteínas de movimiento, dependen totalmente de los mecanismos de transmisión vertical y horizontal del hospedero para poder transmitirse (Son *et al.*, 2015). Dentro de los que la reproducción sexual y asexual (transmisión vertical) tienen gran impacto en su dispersión, mientras que la transmisión a otros individuos fúngicos (transmisión horizontal) depende íntimamente de la compatibilidad vegetativa entre ellos; por lo cual la capacidad de infectar otras especies fúngicas es limitada (Ghabrial *et al.*, 2015).

Interesantemente, reportes recientes han demostrado que los virus del género *Narnavirus* no solo están presentes en el reino de los hongos (Cai *et al.*, 2012; Lye *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016; Grybchuk *et al.*, 2017; Richaud *et al.*, 2019) por lo que su potencial transmisión horizontal a organismos no fúngicos es una posibilidad abierta.

Considerando esta posibilidad, evaluamos la transferencia horizontal de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S hospedados por *R. microsporus* a otros hongos, con especial interés en la transferencia entre cepas de la especie *R. microsporus*. Bajo este enfoque, desde nuestros primeros experimentos fuimos incapaces de detectar la presencia en las esporas colectadas del co-cultivo entre la variante genética 814 nv+ b- (lote 1) y la cepa 559. Cuyas interacciones hifales además, exhibieron una posible incompatibilidad vegetativa (Fig. 9B). Debido a que pudimos observar un autotropismo negativo de las hifas con respecto a la zona de contacto; y que en hongos de los phyla Ascomycota y Basidiomycota ha sido ampliamente descrito como principal responsable de la falta de contacto hifal (Glass *et al.*, 2000).

En conjunto, nuestras observaciones fenotípicas y esfuerzos fallidos en la detección de los *Narnavirus*, nos sugirieron la potencial incompatibilidad vegetativa entre los hongos evaluados.

En hongos, la compatibilidad vegetativa refleja diferencias fenotípicas entre individuos de una especie en una población. Estas diferencias pueden ser apreciadas a nivel macroscópico, donde es posible apreciar una acumulación de hifas apoptóticas

en la zona de contacto (Burgess *et al.*, 2009). Por ello, decidimos ampliar el número de cepas implicadas en la interacción hifal en un multi-cultivo, para detectar potenciales hongos capaces de fusionar sus hifas exitosamente. Sin embargo, solo encontramos potencial compatibilidad vegetativa entre cepas sexualmente compatibles (Fig. 10).

En este contexto, interesantemente ningún reporte previo ha demostrado la existencia de eventos de anastomosis en el género *Rhizopus*, diferente al intercambio citoplasmático durante la fusión de los gametangios durante la reproducción sexual (Dijksterhuis & Samson, 2006). De hecho se ha postulado que este proceso se encuentra ausente o es muy raro dentro de los hongos del phylum Mucoromycota (Dijksterhuis & Samson, 2006)., siendo únicamente descrito en los hongos del subphylum *Glomeromycotina*. En los que un ciclo de reproducción sexual se encuentra ausente, y donde el intercambio genético probablemente juega un papel importante en la adaptación a condiciones ambientales adversas (Chagnon, 2014).

Debido a que nuestros resultados apuntan únicamente a eventos de fusión hifal entre cepas compatibles sexualmente, y considerando la escasa o nula información respecto al proceso de anastomosis en el subphylum *Mucoromycotina*; nos preguntamos si el intercambio citoplasmático entre cepas de la especie *R. microsporus* se encuentra únicamente mediado por el éxito sexual reproductivo del hongo. Pusimos a prueba esta hipótesis mediante el co-cultivo entre cepas compatibles, incompatibles sexualmente y de sexo desconocido; con la variante genética 814 nv+ b- (lote 2). Sin embargo y contrario a lo esperado, fuimos capaces de detectar la presencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S tanto en las cepas compatibles, así como en cepas incompatibles sexualmente, no así en las cepas de sexo desconocido (Fig. 12 C, D y 13). Además, nuestras observaciones microscópicas sugieren al proceso de reproducción sexual como mediador de la transmisión en cepas compatibles sexualmente (Fig 12 E). No obstante, la interacción entre hifas de cepas incompatibles sexualmente mostró un patrón de sobre crecimiento de hifas (Fig 12 E), que en *Glomus clarum*, un hongo perteneciente al subphylum *Glomeromycotina*, ha sido asociado a una falta de reconocimiento hifal (Yu *et al.*, 2013).

En este punto, nuestros resultados apuntan a un posible proceso transferencia extracelular de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus* no descrito en hongos (Ghabrial *et al.*, 2015). Y que dentro de los micovirus y su interacción con hongos,

unicamente el micovirus de DNA, *Sclerotinia sclerotiorum* asociado a hipovirulencia (SsHADV-1) proveniente de *Sclerotinia sclerotiorum*, ha demostrado ser infeccioso (bajo condiciones de laboratorio) si su partícula viral es purificada y posteriormente aplicada sobre hifas intactas de hongos libres de virus (Yu *et al.*, 2013). No obstante, si la transferencia de los *Narnavirus* es extracelular, parece no ser efectiva en todos los casos sugiriendo que es hospedero dependiente (cepas de sexo desconocido). Característica que también se ha descrito en el estudio del micovirus SsHADV-1, el cual no fue capaz de infectar otros hongos fuera del género *Sclerotinia* (Yu *et al.*, 2013). Aún así, no tenemos evidencia experimental que confirme un evento de transmisión extracelular de los simbioses virales de *R. microsporus*.

Macro y microorganismos interactúan dentro y entre especies para sobrevivir en ambientes que se encuentran basados en modelos fluctuantes de competencia y cooperación. Para mantener el balance, las células transmiten y reciben señales químicas para modular la expresión génica y las funciones celulares. Muchas de estas señales biológicas suceden a través de la síntesis celular y la liberación de biomoléculas al ambiente. Sin embargo, usualmente las biomoléculas son insolubles o requieren mecanismos específicos para transmitir las señales. En esta situación, las células encapsulan las biomoléculas en vesículas para posteriormente ser liberadas al entorno extracelular.

Este mecanismo ha sido descrito en procariotas, eucariotas y arqueas (Caruana & Walper, 2020); y tal como lo hacen las bacterias, los hongos producen vesículas extracelulares que han sido descritas como factores de virulencia. Por mencionar algunos, lípidos, polisacáridos y proteínas están presentes en vesículas extracelulares.

Muchas características de la vía de producción de vesículas extracelulares entre los tres dominios previamente mencionados se comparten (Caruana & Walper, 2020). Sin embargo, en hongos el transporte al entorno extracelular es desconocido dada la complejidad de la pared celular. Por una parte, se postula que una vez que proteínas, lípidos, polisacáridos, etc., son traducidos y empaquetados por los diferentes compartimentos membranales estos son enviados al aparato de Golgi donde proteínas o péptidos con señal de secreción son agregadas para permitir el paso al entorno extracelular (Lodish *et al.*, 2001). Por otro lado, existen vesículas que no poseen dichas señales de secreción y sin embargo son encontradas extracelularmente (Rodriguez *et al.*, 2011). En este escenario, proteínas degradadoras de la pared celular han sido asociadas a las vesículas extracelulares sugiriendo que pueden estar

presentes en la membrana vesicular exhibiendo su actividad degradadora permitiendo el paso a través de la pared celular (Joffe *et al.*, 2016).

En este contexto, ha sido ampliamente reportado que los virus secuestran el mecanismo vesicular de su hospedero para llevar a cabo su replicación en los compartimentos membranales. Dentro de los cuales la mayoría de los virus tipo ssRNA de cadena positiva prefieren la replicación dentro de vesículas producto del RE (Ritzenthaler & Elamawi, 2006). Bajo este enfoque, durante los últimos años se ha incrementado el número de reportes de vesículas extracelulares con ácidos nucleicos (RNA) en su interior, los cuales se sugiere pueden jugar un papel importante en la comunicación inter-especies (Joffe *et al.*, 2016).

Además, para el caso especial de la familia *Narnaviridae* se ha sugerido que el genoma de sus miembros virales se encuentra confinado dentro de vesículas lipídicas (Hillman & Cai, 2013). Por lo que un escenario de transporte extracelular en conjunto con el aparato de Golgi o mediado por vesículas extracelulares que llevan consigo enzimas degradadores de la pared (Kazmierczak *et al.*, 2012) puede tener lugar para los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S de *R. microsporus*.

Sin embargo, hasta el día de hoy, no existe suficiente evidencia de la asociación de vesículas lipídicas con virus del género *Narnavirus*. Para estos, la acción de la maquinaria de degradación del hospedero debería ser efectiva, debido a la ausencia de poliadenilación en el extremo 3' y el *capping* en el extremo 5'. Sin embargo, escapan a dicha maquinaria supuestamente gracias a la interacción entre la proteína (RdRp) y 3 sitios del genoma de RNA (posicionados en la posición 3', centro y 5' del genoma viral). Cuya interacción además, asegura la correcta y exitosa replicación de los *Narnavirus* (Fujimura & Esteban, 2007).

Considerando la naturaleza del complejo riboproteico de los *Narnavirus*, existen reportes de RNAs extracelulares fuera de vesículas (los cuales representan una gran mayoría de los RNAs extracelulares) que presumiblemente se encuentran en asociación con complejos riboproteicos, cuya formación asegura su estabilidad y función. Estos complejos riboproteicos, se cree, no necesitan de procesos de señalización para salir de la célula; en su lugar, aprovechan los procesos de muerte celular del hospedero, los cuales exponen el contenido citoplasmático celular (Igaz, 2015).

En organismos eucariotas los procesos de apoptosis y muerte celular mantienen la homeostasis celular, eliminan células dañadas; y además les permiten responder a agentes infecciosos, envejecimiento y diferenciación; así como en la respuesta a estreses bióticos. En términos de interacción fúngica, la incompatibilidad vegetativa induce la muerte celular (Sharon, Finkelstein, Shlezinger, & Hatam, 2009). En este sentido, a pesar de que en la interacción entre la cepa 811 y la variante genética 814 nv+ b- (lote 2) observamos una posible falta de reconocimiento hifal; podría ser posible que los varios compuestos secretados por ambos hongos induzcan también la muerte celular. Lo cual cobra sentido tomando en cuenta que en levaduras la exposición a feromonas de un “sexo opuesto” inapropiado, durante el proceso de reproducción sexual, induce la muerte celular (Sharon et al., 2009).

Debido a estos antecedentes, también tenemos en mente que el transporte al medio extracelular de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S (como complejo ribroproteico) hospedados por *R. microsporus* se podría llevar a cabo por efecto de los procesos de apoptosis o muerte celular programada en *R. microsporus*.

Por otro lado, nuestros resultados infieren un posible mecanismo de transmisión extracelular de los *Narnavirus*, decidimos evaluar también su posible transmisión a hongos distintos a *R. microsporus*. En nuestros co-cultivos (llevados a cabo con *M. circinelloides* y *T. atroviride*) sin embargo, únicamente pudimos detectar la presencia de los *Narnavirus* en *T. atroviride*. Donde interesantemente, pudimos observar indicios de interacción micoparasitica entre las hifas de la cepa donadora y receptora (Fig. 14D).

La transferencia a *T. atroviride*, potencialmente vía micoparasitismo, sugiere que hongos distintos al género *Rhizopus* pueden “infectarse” por virus del género *Narnavirus*, soportando la transferencia a otros organismos no regidos por la transmisión vertical y horizontal descrita para hongos (Espino-Vázquez et al., 2020). Sin embargo, el mecanismo de transferencia puede ser distinto al presente en la especie *R. microsporus*.

*T. atroviride* ha sido ampliamente reconocido como agente de biocontrol por su capacidad de micoparasitar, es decir, la capacidad de alimentarse a expensas de otro (Seidl-Seiboth et al., 2014). En este sentido, se ha reportado que insectos, nemátodos y hongos, son capaces de ser vectores de transmisión de virus, una vez se han alimentado de la planta enferma (Gallet et al., 2018). Por lo que en el caso de *T.*

*atroviride* un escenario activo de internalización de “nutrientes” derivado del proceso micoparasitico es plausible (Seidl-Seiboth *et al.*, 2014), debido a que pudimos observar el enrollamiento típico sobre las hifas de la variante fúngica 814 nv+ b-.

Interesantemente, el micoparasitismo además de ser usado como potencial mecanismo de control biológico por *T. atroviride* (Seidl-Seiboth *et al.*, 2014), ha demostrado también poder ser un mediador de la transferencia horizontal de genes, específicamente en hongos del suphyllum *Mucoromycotina*. En estos el parásito facultativo *Parasitella parasítica*, se caracteriza por la formación de un puente plasmático con su hospedero, el cual permite una limitada continuidad citoplasmática entre ambos hongos (Rosewich & Kistler, 2000).

Este puente, permite que los núcleos de *P. parasitica* invadan el micelio de su hospedero, los cuales pueden permanecer por tiempos prolongados en su hospedero, provocando en ocasiones lisis celular (Rosewich & Kistler, 2000).

Por ello creemos que la detección de los *Narnavirus* en *T. atroviride* se encuentra relacionada con la toma de “nutrientes” por efecto del micoparasitismo en *R. microsporus*.

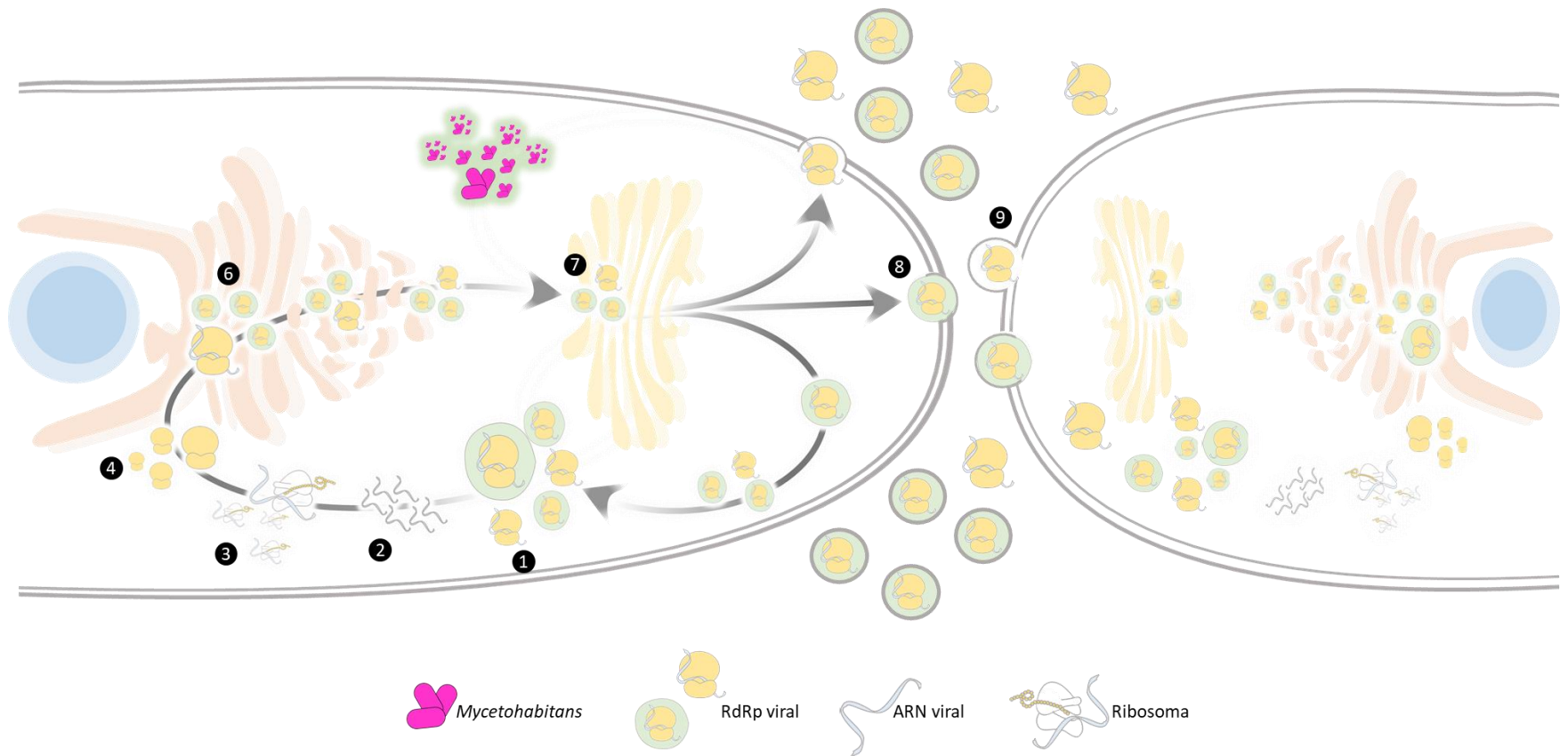
Para poder ser activos, efectores y/o vesículas extracelulares necesitan internalizarse en una célula receptora. Actualmente, se han descrito diversas rutas de internalización, en su mayoría dependen de la composición membranal de las vesículas y su capacidad de interactuar con la membrana endoplasmática del recipiente. Dentro de estos compuestos membranales se encuentran: tetraspaninas, proteínas de adhesión; integrinas, adhesión celular; lectinas, receptores capaces de reconocer ligandos y permitir la internalización (Mulcahy *et al.*, 2014).

Los procesos de endocitosis, macropinocitosis y fagocitosis también han demostrado participar en la internalización de vesículas extracelulares, así como la fusión membranal (Mulcahy *et al.*, 2014). En hongos filamentosos los procesos celulares de endocitosis y exocitosis han sido descritos como reguladores de la expansión vegetativa y el mantenimiento de la estructura hifal; así también han demostrado jugar un papel importante como rutas de señalización molecular (Schultzhause & Shaw, 2015).

**Nuestra hipótesis de transmisión horizontal de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus***

Considerando los antecedentes presentados y los resultados que obtuvimos: creemos que los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S hospedados por *R. microsporus* son exportados al medio extracelular, a través del transporte vesicular (en vesículas), o aprovechando (como complejo riboproteico) los procesos implicados en el desarrollo fúngico: apoptosis y muerte celular programada. Donde una vez estando fuera del ambiente intracelular, pueden internalizarse en una célula receptora mediante alguno de los procesos descritos. Además, creemos que la internalización de los *Narnavirus* en otro organismo es hospedero dependiente, ya que, en nuestros experimentos no todos los hongos co-cultivados con la variante fúngica 814 nv+ b- pudieron ser “infectados”.

Estos aspectos de la biología del transporte vesicular y su relevancia en la biología de los hongos nos hacen proponer un posible escenario de transmisión de los *Narnavirus*; el cual se encuentra esquematizado en la [figura 16](#).



**Figura 16.- Propuesta del mecanismo de transmisión de los *Narnavirus* entre diferentes especies fúngicas.** 1-Los *Narnavirus* se encuentran replicándose dentro/fuera de vesículas en el citoplasma. 2- Los RNAs virales son liberados al citoplasma. 3-Los RNA virales son traducidos por los ribosomas del hongo. 4-La RdRp viral es traducida y/o empaquetada en el RE dentro/fuera de vesículas. Además, los RNAs virales se encuentran en asociación con su RdRp. 5-6-Los *Narnavirus* son transportados extracelularmente. Esto puede llevarse a cabo mediante la adición de señales de secreción, la interacción con proteínas remodeladoras de la pared celular, la interacción directa con la membrana endoplasmática y la pared celular; o mediante la



liberación del contenido citoplasmático por efecto de la muerte celular. **7**-Las vesículas/y o complejos riboproteícos atraviesan la membrana endoplasmática y la pared celular. **8**-Las vesículas/y o complejos riboproteícos son internalizadas por el hongo receptor. Este proceso puede tener lugar principalmente gracias a: los procesos de endocitosis, macropinocitosis o fagocitosis; la acción de enzimas remodeladoras de la pared celular asociadas a las vesículas o a la interacción directa de las vesículas lípidicas con la pared celular y la membrana endoplasmática.

## 8 Conclusiones

Previos reportes no habían logrado asociar un fenotipo a la presencia de micovirus del género *Narnavirus*. En este estudio por primera vez encontramos que la presencia de *Narnavirus* modifica aspectos de la biología del holobionte fúngico *R. microsporus*.

Por una parte, nuestros resultados revelaron que su presencia reduce la cantidad de esporangioesporas durante el desarrollo asexual del hongo, suponiendo un costo. Y, por otro lado, la interacción de los *Narnavirus* y *Mycetohabitans* asegura el desarrollo sexual de *R. microsporus*, en el que la ausencia de ambos simbioses reduce parcial o totalmente la producción de zigoesporas.

Biológicamente, proponemos un escenario de secuestro de la maquinaria traducción de proteínas (replicación en compartimentos membranales) como parte de la alta replicación de los *Narnavirus* lo cual provoca una reducción de producción de esporangioesporas durante la reproducción asexual de *R. microsporus*. Así también, consideramos que la reducción de biomasa (crecimiento vegetativo) y poca producción de zigoesporas (reproducción sexual) de *R. microsporus* se debe a la pérdida de plasticidad fenotípica por ausencia de los simbioses virales y bacterianos.

Estos resultados además, nos impulsan a hipotetizar que los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S modulan la producción de biomasa y zigoesporas (en ausencia de *Mycetohabitans spp.*) mediante el mecanismo de silenciamiento postranscripcional.

Tomando en cuenta nuestros resultados, donde la interacción de los *Narnavirus* y *R. microsporus* supone un costo durante la reproducción asexual, pero en cambio representan un beneficio durante la reproducción sexual. Proponemos que su interacción simbiote se debe considerar como “mutualismo condicionado”.

En el reino fúngico los micovirus, incluyendo a los pertenecientes al género *Narnavirus*, se transmiten vertical y horizontalmente.

En este tenor, nuestro grupo previamente probó que los *Narnavirus* hospedados por el holobionte *R. microsporus* se transfieren verticalmente (Espino-Vázquez et al., 2020). Interesantemente, nuestros experimentos de transmisión horizontal sugieren que la transmisión de los *Narnavirus* a otros hongos no depende de eventos de fusión hifal en la especie *R. microsporus*. En cambio, implican que su transmisión se realiza de forma extracelular y que además su internalización (en un hongo receptor) es hospedero dependiente.

Además, fuimos capaces de “infectar” con los *Narnavirus* a un hongo no relacionado con *R. microsporus*: *T. atroviride*. Por lo que hemos expandido los posibles mecanismos de transmisión horizontal de los simbioses virales de *R. microsporus*, así como el rango de hospederos.

Considerando también los antecedentes respecto a la biología de los virus del género *Narnavirus* generados en otros estudios, hipotetizamos que los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S son liberados al entorno extracelular mediante dos posibles mecanismos: transporte vesicular o la liberación del complejo riboproteico aprovechando los procesos de apoptosis y muerte celular programada del *R. microsporus*.

## 9 Perspectivas

Nuestro trabajo abrió dos líneas principales de necesaria investigación.

**Primera línea:** Efecto de los *Narnavirus* en el desarrollo y crecimiento de *R. microsporus*.

Nuestros resultados revelaron que la presencia de los *Narnavirus* reduce la producción de esporangioesporas en la reproducción asexual de *R. microsporus*, y en contraparte son necesarios para asegurar el desarrollo sexual y posiblemente la producción de biomasa de su hospedero fúngico.

En ambos casos un análisis transcriptómico podría aportar evidencia molecular para ayudar a interpretar los fenotipos observados. En este tenor, actualmente estamos trabajando en la generación de material genético para este propósito.

**Segunda línea:** Transmisión horizontal de los *Narnavirus* hospedados por *R. microsporus*.

Debido a que no pudimos encontrar evidencia de eventos de fusión hifal en la especie *R. microsporus* salvo en cepas compatibles sexualmente. Y considerando que fuimos capaces de detectar la presencia de los *Narnavirurs* RmNV-20S y RmNV-23S en cepas incompatibles sexualmente. Nuestros resultados sugieren que los simbioses virales de *R. microsporus* pueden ser transferidos extracelularmente.

Primero: necesitamos confirmar la ausencia de eventos de fusión hifal en cepas incompatibles sexualmente de la especie *R. microsporus*. Aumentar el número de cepas evaluadas para caracterizar las interacciones hifales macro y microscópicamente.

Segundo: necesitamos repetir y aumentar el número de cepas evaluadas en los co-cultivos destinados a la transmisión de los *Narnavirus* a otras cepas de *R. microsporus* y hongos no relacionados.

Tercero: Debido a que proponemos un mecanismo de transmisión extracelular, debemos evaluar las secreciones de *R. microsporus* con el objeto de detectar molecularmente la presencia de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S.

Durante la realización del objetivo dos pudimos generar líneas fúngicas de las cepas silvestres evaluadas ahora con los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S. Por ello creamos una tercera línea de investigación.

**Tercera línea:** Efecto de los *Narnavirus* en el desarrollo y crecimiento de las nuevas líneas fúngicas.

Líneas fúngicas generadas en este trabajo				
Fenotipo silvestre			Nueva variante	
Cepa	Bacteria	Virus	Con RmNV-20S	RmNV-23S
559	No	No	Si	Si
811	Si	Si (RmNV-20S)		Si
019	Si	No	Si	Si
<i>T. atroviride</i>	No	No	Si	Si

Debido a que ahora contamos con más cepas de la especie *R. microsporus* en asociación con *Mycetohabitans spp.*, pero no de simbioses virales; y cepas no simbioses naturalmente (ni virus ni bacteria). Podemos realizar un escrutinio más profundo de la implicación de los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S en el crecimiento y desarrollo de la especie *R. microsporus*, considerando además la influencia de *Mycetohabitans spp.*

Además, gracias a que ahora contamos con líneas fúngicas de *T. atroviride* “infectadas con los *Narnavirus* RmNV-20S y RmNV-23S”; ahora podemos estudiar el efecto de estos simbioses en la biología de este modelo fúngico.

## 10 Referencias Bibliográficas

- Ahlquist, P. (2002). RNA-Dependent RNA Polymerases , Viruses , and RNA Silencing. *Science*, 296. <https://doi.org/10.1126/science.1069132>
- Basson, M. A. (2012). Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, 1–21.
- Bermúdez Barrientos, J. R. (2016). *Exploring the molecular mechanisms maintaining the Rhizopus microsporus - Burkholderia rhizoxinica symbiosis*. CINVESTAV-Irapuato.
- Bonfante, P., & Desirò, A. (2017). Who lives in a fungus ? The diversity , origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *The ISME Journal*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.21>
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host Biology in Light of the Microbiome : Ten Principles of Holobionts and Hologenomes. *PLoS Biology*, 13(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Box, M. S., Coustham, V., Dean, C., & Mylne, J. S. (2011). Protocol : A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from Arabidopsis. *Plant Methods*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-7>
- Burgess, T. I., Bihon, W., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2009). A simple and rapid method to determine vegetative compatibility groups in fungi. *Newsletter of the Mycological Society of America*, 60(6).
- Cai, G., Myers, K., Fry, W. E., & Hillman, B. I. (2012). A member of the virus family Narnaviridae from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Arch Virol*, 157, 165–169. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1126-5>
- Caruana, J. C., & Walper, S. A. (2020). Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe – Microbe and Microbe – Host Community Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11(432), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00432>
- Cervantes, M., Vila, A., Nicolás, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Dalmay, T., ... Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). A Single Argonaute Gene Participates in Exogenous and Endogenous RNAi and Controls Cellular Functions in the Basal Fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069283>
- Chagnon, P.-L. (2014). Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS*, 88, 437–444. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12321>
- Coleman-Derr, D., Desgarennes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... Tringe, S. G. (2016a). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209, 798–811. <https://doi.org/10.1111/nph.13697>

- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., ... Tringe, S. G. (2016b). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, *209*, 798–811.
- Cruz-Lachica, I., Marquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., Ley-Lopez, N., Adriana, J., & Garcia-Estrada, R. S. (2018). Diversity of mucoralean fungi in soils of papaya (*Carica papaya* L.) producing regions in Mexico. *Fungal Biology*, *122*, 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.04.008>
- Deng, W., Marshall, N. C., Rowland, J. L., McCoy, J. M., Worrall, L. J., Santos, A. S., ... Finlay, B. B. (2017). Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, *15*, 323–337. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.20>
- Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (2006). Zygomycetes. En W. B. Clive de (Ed.), *Food spoilage microorganisms* (pp. 415–436). <https://doi.org/10.1533/9781845691417.4.415>
- Dolatabadi, S., Walther, G., Gerrits van den Ende, A. H. G., & de Hoog, G. S. (2014). Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Diversity*, *64*, 145–163. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0229-6>
- Espino-Vázquez, A. N., Bermúdez-Barrientos, J. R., Cabrera-Rangel, J. F., Córdova-López, G., Cardoso-Martínez, F., Martínez-Vázquez, A., ... Partida-Martínez, L. P. (2020). Narnaviruses: novel players in fungal – bacterial symbioses. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0638-y>
- Esteban, R., & Fujimura, T. (2003). Launching the yeast 23S RNA Narnavirus shows 5' and 3' cis-acting signals for replication. *PNAS*, *100*(5), 2568–2573.
- Estrada-de los Santos, P., Palmer, M., Beukes, C., Steenkamp, E. T., Briscoe, L., Id, N. K., ... James, E. K. (2018). Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia sensu lato* Contains Two Additional Novel Genera Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae. *Genes*, *9*(389), 1–23. <https://doi.org/10.3390/genes9080389>
- Ferrucho, R. L., Cifuentes, J. M., Ceresini, P., & García-domínguez, C. (2012). *Rhizoctonia solani* AG-3PT is the major pathogen associated with potato stem canker and black scurf in Colombia. *Agronomía Colombiana*, *30*(2), 204–213.
- Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. G., & Partida-Martínez, L. P. (2016). The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and. *Frontiers in Microbiology*, *7*(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00150>
- Fujimura, T., & Esteban, R. (2007). Interactions of the RNA Polymerase with the Viral Genome at the 5' and 3' Ends Contribute to 20S RNA Narnavirus Persistence in

- Yeast \*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282(26), 19011–19019.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M702432200>
- Gallet, R., Michalakakis, Y., & Blanc, S. (2018). Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus – vector interactions. *Current Opinion in Virology*, 33, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.005>
- García-Pedrajas, M. D., Cañizares, M. C., Sarmiento-Villamil, J. L., Jacquat, A. G., & Dambolena, J. S. (2019). Mycoviruses in Biological Control : From Basic Research to Field Implementation Mycoviruses in Biological Control : From Basic Research to Field Implementation. *Phytopathology*, 109(11), 1–12. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0166-RVW>
- Ghabrial, S. A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., & Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.034>
- Gil, R., & Latorre, A. (2019). Unity makes strength: A review on mutualistic symbiosis in representative insect clades. *Life*, 9(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/life9010021>
- Glass, N. L., Jacobson, D. J., & Shiu, P. K. T. (2000). THE GENETICS OF HYPHAL FUSION AND VEGETATIVE INCOMPATIBILITY IN FILAMENTOUS ASCOMYCETE FUNGI. *Annu. Rev. Genet.*, 34, 165–186.
- Grybchuk, D., Akopyants, N. S., Kostygov, A. Y., Konovalovas, A., Lye, L., Dobson, B. E., ... Yurchenko, V. (2017). Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite Leishmania. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717806115>
- Gryganskyi, A. P., Golan, J., Dolatabadi, S., Mondo, S., Idnurm, A., Muszewska, A., ... Stajich, J. E. (2018). Phylogenetic and Phylogenomic De fi nition of Rhizopus Species. *Genes*, 8, 2007–2018. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200235>
- Heinlein, M., & Epel, B. L. (2004). Macromolecular Transport and Signaling Through Plasmodesmata. *International Review of Cytology*, 235, 93–164.
- Heitman, J., Kronstad, J. W., Taylor, J. W., & Casselton, L. A. (Eds.). (2006). *Sex in Fungi Molecular Determination and Evolutionary Implications*.
- Hillman, B. I., & Cai, G. (2013). The Family Narnaviridae : Simplest of RNA Viruses. En *Advances in Virus Research* (1a ed., Vol. 86, pp. 149–176). Copyright &copy; 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4>
- Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., Hoog, G. S. De, Benny, G. L., ... Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales : a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia*, 30, 57–76.
- Igaz, P. (2015). *Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential*



*Biological Relevance.* (P. Igaz, Ed.) (1a ed.).

- Jennessen, J., Fog Nielsen, K., Houbraken, J., Lyhne, E. K., Schnürer, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Secondary Metabolite and Mycotoxin Production by the Rhizopus microsporus Group. *Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1833–1840. <https://doi.org/10.1021/jf048147n>
- Joffe, L. S., Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., & Del Poeta, M. (2016). Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection. *mSphere*, *1*(4), 11–14. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-16.Editor>
- Kazmierczak, P., McCabe, P., Turina, M., Jacob-wilk, D., & Alfen, N. K. Van. (2012). The Mycovirus CHV1 Disrupts Secretion of a Developmentally Regulated Protein in *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, *86*(11), 6067–6074. <https://doi.org/10.1128/JVI.05756-11>
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy.* (E. A. Press, Ed.) (Ninth Repo). San Diego.
- Kües, U., & Navarro-González, M. (2009). Communication of Fungi on Individual, Species, Kingdom, and Above Kingdom Levels. En *Physiology and Genetics* (1st Editio, Vol. 1).
- Lackner, G., Möbius, N., Scherlach, K., Laila, P., Winkler, R., Schmitt, I., ... Partida-Martínez, L. P. (2009). Global Distribution and Evolution of a Toxinogenic Burkholderia-Rhizopus Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(9), 2982–2986. <https://doi.org/10.1128/AEM.01765-08>
- Lackner, G., Moebius, N., & Hertweck, C. (2010). Endofungal bacterium controls its host by an hrp type III secretion system. *The ISME Journal*, *5*(2), 252–261. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.126>
- Lackner, G., Moebius, N., Partida-Martínez, L. P., Boland, S., & Hertweck, C. (2011). Evolution of an endofungal Lifestyle: Deductions from the Burkholderia rhizoxinica Genome. *BMC Genomics*, *12*(1), 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-210>
- Lackner, G., Moebius, N., Partida-Martínez, L. P., & Hertweck, C. (2011). Complete Genome Sequence of Burkholderia rhizoxinica , an Endosymbiont of Rhizopus microsporus . *Journal of Bacteriology*, *193*(3), 783–784. <https://doi.org/10.1128/JB.01318-10>
- Lastovetsky, O. A., Gaspar, M. L., Mondo, S. J., Labutti, K. M., Sandor, L., Grigoriev, I. V., ... Pawlowska, T. E. (2016). Lipid metabolic changes in an early divergent fungus govern the establishment of a mutualistic symbiosis with endobacteria. *PNAS*, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615148113>
- Lee, S. A., Kim, Y., Kim, J. M., Chu, B., Joa, J., Sang, M. K., ... Weon Yeon, H. (2019). A preliminary examination of bacterial , archaeal , and fungal communities

- inhabiting different rhizocompartments of tomato plants under real-world environments. *Scientific Reports*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45660-8>
- Li, C., Hu, J., Hao, J., Zhao, B., Wu, B., Sun, L., ... Meng, S. (2014). Competitive virus and host RNAs: the interplay of a hidden virus and host interaction. *Protein & Cell*, 5(5), 348–356. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0039-y>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2001). *Molecular Cell Biology* (4th editio, Vol. 29). New York.
- Lumini, E., Bianciotto, V., Jargeat, P., Novero, M., Salvioli, A., Faccio, A., ... Bonfante, P. (2007). Presymbiotic growth and sporal morphology are affected in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* cured of its endobacteria. *Cellular Microbiology*, 9(7), 1716–1729. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00907.x>
- Lye, L., Akopyants, N. S., Dobson, D. E., & Beverley, S. M. (2016). A Narnavirus -Like Element from the Trypanosomatid Protozoan Parasite *Leptomonas seymouri*. *American Society for Microbiology*, 4(4), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00713-16>. Copyright
- Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., & Roossinck, M. J. (2007). A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. *Science*, 315(513), 513–515. <https://doi.org/10.1126/science.1136237>
- Matsumoto, Y., Fishel, R., & Wickner, R. B. (1990). Circular single-stranded RNA replicon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 7628–7632.
- Milgroom, M. G., & Hillman, B. I. (2011). THE ECOLOGY AND EVOLUTION OF FUNGAL VIRUSES. En C. J. Hurst (Ed.), *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems* (First Edit, Vol. 1, pp. 217–253).
- Moebius, N., Üzümlü, Z., Dijksterhuis, J., Lackner, G., & Hertweck, C. (2014). Active invasion of bacteria into living fungal cells. *eLIFE*, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.03007>
- Mondo, S. J., Lastovetsky, O. A., Gaspar, M. L., Schwardt, N. H., Barber, C. C., Riley, R., ... Pawlowska, T. E. (2017). Bacterial endosymbionts influence host sexuality and reveal reproductive genes of early divergent fungi. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02052-8>
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: Genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218–229. <https://doi.org/10.1038/nrg2319>
- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter Francisco, D. R. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>

- Nagy, P. D., & Pogany, J. (2012). The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 137–149. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2692>
- Nicolás, F. E., & Garre, V. (2016). RNA Interference in Fungi : Retention and Loss. *Microbiology Spectrum*, 4(6), 1–15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0008-2016>.Correspondence
- Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Cascales, M. D., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., & Garre, V. (2015). The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics*, 16(237), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1443-2>
- Nuss, D. L. (2005). Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3(8), 632–642. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1206>
- Partida-Martínez, L. P. (2017). The fungal holobiont: Evidence from early diverging fungi. *Environmental Microbiology*, 19(8), 2919–2923. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13731>
- Partida-Martínez, L. P., De Looß, C. F., Ishida, K., Ishida, M., Roth, M., Buder, K., & Hertweck, C. (2007). Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 793–797. <https://doi.org/10.1128/AEM.01784-06>
- Partida-Martínez, L. P., Groth, I., Schmitt, I., Richter, W., Roth, M., & Hertweck, C. (2007). *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2583–2590. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64660-0>
- Partida-Martínez, L. P., & Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*, 437(7060), 884–888. <https://doi.org/10.1038/nature03997>
- Partida-Martínez, L. P., & Hertweck, C. (2007). A Gene Cluster Encoding Rhizoxin Biosynthesis in “ *Burkholderia rhizoxina* ”, the Bacterial Endosymbiont of the Fungus *Rhizopus microsporus*. *ChemBioChem*, 8, 41–45. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600393>
- Partida-Martínez, L. P., Monajembashi, S., Greulich, K. O., & Hertweck, C. (2007). Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism. *Current Biology*, 17(9), 773–777. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.039>
- Paschos, K., & Allday, M. J. (2010). Epigenetic reprogramming of host genes in viral and microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 18(10), 439–447.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.07.003>

- Richaud, A., Frézal, L., Tahan, S., Jiang, H., Blatter, J. A., Zhao, G., & Kaur, T. (2019). Vertical transmission in *Caenorhabditis* nematodes of RNA molecules encoding a viral RNA-dependent RNA polymerase. *PNAS*, *116*(49), 24738–24747. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903903116>
- Ritzenthaler, C., & Elamawi, R. (2006). The ER in Replication of Positive-Strand RNA Viruses. *Plant Cell Monogr.*
- Rodrigues, M. L., Nosanchuk, J. D., Schrank, A., Vainstein, M. H., Casadevall, A., & Nimrichter, L. (2011). Vesicular transport systems in fungi. *Future Microbiol.*, *6*(11), 1371–1381.
- Rohwer, F., Prangishvili, D., & Lindell, D. (2009). Roles of viruses in the environment. *Environmental Microbiology*, *11*(11), 2771–2774. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02101.x>
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses : viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *9*, 99–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2491>
- Rosewich, U. L., & Kistler, H. . C. (2000). ROLE OF HORIZONTAL GENE TRANSFER IN THE EVOLUTION OF FUNGI. *Annu. Rev. Phytopathol.*, *38*, 325–363.
- Rossmann, M., Sarango-Flores, S. W., Chiaramonte, J. B., Carolina, M., Kmit, P., & Mendes, R. (2017). Plant Microbiome : Composition and Functions in Plant Compartments. *The Brazilian Microbiome*, 7–20. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59997-7>
- Sahadevan, Y., Richter-fecken, M., Kaerger, K., & Voigt, K. (2013). Early and Late Trisporoids Differentially Regulate  $\beta$ -Carotene Production and Gene Transcript Levels in the Mucoralean Fungi *Blakeslea trispora* and *Mucor mucedo*. *Applied and environmental Microbiology*, *79*(23), 7466–7475. <https://doi.org/10.1128/AEM.02096-13>
- Scherlach, K., Partida-Martínez, L. P., & Dahse, H. (2006). Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus microsporus*. *J. AM. CHEM. SOC.*, (10), 11529–11536.
- Schmitt, I., Partida-Martínez, L. P., Winkler, R., Voigt, K., Einax, E., Dölz, F., ... Hertweck, C. (2008). Evolution of host resistance in a toxin-producing bacterial-fungal alliance. *ISME Journal*, *2*(6), 632–641. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.19>
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., ... Liu, J. O. (2010). Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat Chem Biol.*, *6*(3), 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>.Inhibition
- Schultzhause, Z. S., & Shaw, B. D. (2015). Endocytosis and exocytosis in hyphal growth.

- Fungal Biology Reviews*, 1(0), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.04.002>
- Seidl-Seiboth, V., Ihrmark, K., Druzhinina, I., & Karlsson, M. (2014). Biotechnology and Biology of Trichoderma. En *Molecular Evolution of Trichoderma Chitinases* (pp. 67–78). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00005-9>
- Sharon, A., Finkelstein, A., Shlezinger, N., & Hatam, I. (2009). Fungal apoptosis : function , genes and gene function. *FEMS Microbiology Reviews*, 333, 833–854. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00180.x>
- Shi, M., Lin, X., Tian, J., Chen, L., Chen, X., Li, C., ... Zhang, Y. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- Solórzano, A., Rodríguez-Cousiño, N., Esteban, R., & Fujimura, T. (2000). Persistent yeast single-stranded RNA viruses exist in vivo as genomic RNA-RNA polymerase complexes in 1:1 stoichiometry. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26428–26435. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002281200>
- Son, M., Yu, J., & Kim, K. (2015). Five Questions about Mycoviruses. *PLoS Pathogens*, 11(11), 5–11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005172>
- Song, H., Choi, H., Jeong, H., Choi, D., Kim, D., & Kim, J. (2016). Mycobiology Viral Effects of a dsRNA Mycovirus ( PoV-ASI2792 ) on the Vegetative Growth of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycobiology*, 44(4), 283–290. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.283>
- Spraker, J. E., Sanchez, L. M., Lowe, T. M., Dorrestein, P. C., & Keller, N. P. (2016). *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamydospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues. *The ISME Journal*, 10, 2317–2330. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.32>
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M.-A., Kenrick, P., & Martin, F. M. (2018). The origin and evolution of mycorrhizal symbioses : from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, 220, 1012–1030. <https://doi.org/10.1111/nph.15076>
- Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, M. (2017). The RNAi Universe in Fungi : A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. *Annu. Rev. Microbiol.*, 9(54), 371–391.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2013). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>.The
- Vannier, N., Mony, C., Bittebière, A.-K., & Vandenkoornhuyse, P. (2015). Epigenetic Mechanisms and Microbiota as a Toolbox for Plant Phenotypic Adjustment to Environment. *Frontiers in Plant Science*, 6(1159), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01159>

- Wetzel, J., Scheibner, O., Burmester, A., Schimek, C., & Wöstemeyer, J. (2009). 4-Dihydrotrispurin-Dehydrogenase, an Enzyme of the Sex Hormone Pathway of *Mucor mucedo*: Purification, Cloning of the Corresponding Gene, and Developmental Expression. *Eukaryotic Cell*, 8(1), 88–95. <https://doi.org/10.1128/EC.00225-08>
- Wolffe, A. P., & Matzke, M. A. (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science*, 286(5439), 481. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.481>
- Xu, S., & Yamamoto, N. (2017). mRNA-Seq reveals accumulation followed by reduction of small nuclear and nucleolar RNAs in yeast exposed to antiviral ribavirin. *FEMS*, (March), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox067>
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S. A., ... Jiang, D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *PNAS*, 110(4), 1452–1457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213755110>
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

# GONZALO CÓRDOVA LÓPEZ

Ingeniero en Biotecnología

## PERFIL

Fecha de nacimiento: 26 de marzo de 1996

Nacionalidad: Mexicana

Estado civil: Soltero

## CONTACTO

TELÉFONO:  
3315753667

CORREO ELECTRÓNICO:  
[Gonzalocorlop96mail.com](mailto:Gonzalocorlop96mail.com)

## FORMACIÓN ACADÉMICA

---

**Universidad Politécnica del Centro**  
2014 - 2018

**Universidad de Guanajuato campus Irapuato-Salamanca**  
2017  
Estancia académica

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad-Irapuato**  
2016  
Estancia académica

**Colegio de Postgraduados Campus Tabasco**  
2015  
Estancia académica

## PUBLICACIONES

---

Espino-Vázquez, A. N., Bermúdez-Barrientos, J. R., Cabrera-Rangel, J. F., Córdoba-López, G., Cardoso-Martínez, F., Martínez-Vázquez, A., Camarena-Pozos, D. A., Mondo, S. J., Pawlowska, T. E., Abreu Goodger, C., Partida-Martínez, L. P. (2020). **Narnaviruses: novel players in fungal – bacterial symbioses**. *The ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0638-y>

## CONGRESOS Y ACTIVIDADES DE DIVULGACIÓN

---

XIII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos (2019): Participación en cartel: Insights Into Mycoviral Diversity and Transmission in *Rhizopus microsporus*. Baja California, Ensenada.

XXV Aniversario Semana Nacional de Ciencia y Tecnología 2018: Día Abierto Cinvestav. "Holograma 3D de la evolución".

**Declaración de independencia**

**Por este medio declaro que yo he preparado este trabajo de tesis de forma independiente y sin ayuda externa. Especialmente declaro que he citado de forma correcta y explícita a los autores y trabajos en los que esta tesis se apoya, así como las contribuciones de las personas que coadyuvaron en su desarrollo.**

**Lugar: Irapuato, Guanajuato, México.**

**Fecha: 27 de agosto de 2020**

**Firma: Gonzalo Córdova López**

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.