



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
CAMPUS GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

TESIS

“Participación de proteínas tipo efector de *Trichoderma* spp. en interacción benéfica con plantas de *A. thaliana*.”

Para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias (Biología)

Presenta:
M. en C. Paulina Guzmán Guzmán

Enero del 2017

Contenido

Índice de Tablas.	5
Índice de Figuras.	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
El sistema inmune vegetal.	8
Efectores: sus características, funciones y su participación en interacciones patogénicas.	10
Identificación de posibles efectores en los sistemas patogénicos.	14
Efectores y su participación en interacciones benéficas planta–microorganismo.	15
<i>Trichoderma</i> spp. en interacción benéfica con plantas.	16
Presencia de Efectores en <i>Trichoderma</i> spp.	18
JUSTIFICACIÓN	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES.	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Selección de secuencias que codifican para posibles moléculas tipo efector de <i>T. virens</i> y <i>T. atroviride</i>	23
Material vegetal.....	23
Esterilización de semillas de <i>A. thaliana</i>	24
Esterilización de semillas de tomate.	24
Cepas fúngicas.	25
Ensayos de interacción <i>A. thaliana</i> – <i>Trichoderma</i>	25
Determinación del efecto de la presencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento vegetal.	26
Obtención de RNA y síntesis de cDNA.....	26
Análisis por RT-PCR semicuantitativo.	27
Análisis por qRT-PCR.	28
Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes.	28
Construcción de los vectores para sobreexpresión.	31
Construcción de las fusiones a la proteína rojo fluorescente mCherry.	33
Transformación de protoplastos de <i>Trichoderma</i>	35
Verificación de las transformantes.	37

Construcción de las fusiones de los dominios de translocación de las secuencias seleccionadas al gen reportero <i>gfp</i> .	39
Purificación de las proteínas quiméricas efector- <i>gfp</i> .	41
Ensayos de entrada de las proteínas a raíces de soya y plántulas de <i>A. thaliana</i> .	43
Prueba de hidrofobicidad de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen <i>tvhdyii1</i> .	43
Expresión de genes de defensa vegetal en plantas de <i>A. thaliana</i> .	44
Confrontación de cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen <i>tvhdyii1</i> con el fitopatógeno <i>R. solani</i> .	45
Ensayo de colonización de raíces de tomate.	45
Análisis por PCR semicuantitativo.	46
Análisis por qPCR.	46
Análisis estadístico.	47
Diseño de iniciadores.	47
RESULTADOS.	50
Selección de las secuencias.	50
Determinación del efecto de la presencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento vegetal.	51
Análisis de la expresión de los genes seleccionados durante la interacción <i>Arabidopsis</i> – <i>Trichoderma</i> mediante RT-PCR semicuantitativo.	55
Determinación del patrón de expresión de los genes seleccionados durante la interacción <i>Arabidopsis</i> – <i>Trichoderma</i> mediante RT-PCR cuantitativo.	58
Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes y verificación de las transformantes.	61
Fusiones de los posibles dominios de translocación de genes seleccionados al gen reportero <i>gfp</i> .	66
Obtención de las proteínas quiméricas efector – GFP.	70
Ensayos de entrada de las proteínas a raíces de soya y plántulas de <i>A. thaliana</i> .	71
Construcción de las fusiones a la proteína rojo fluorescente mCherry.	72
Construcción de los vectores para sobreexpresar los genes seleccionados.	75
Caracterización del gen <i>tvhdyii1</i> durante la interacción benéfica con plantas y en micoparasitismo.	77
Nivel de expresión del transcrito del gen <i>tvhdyii1</i> y corroboración de las cepas mutantes nulas.	78
Ensayo de hidrofobicidad.	79

Participación del gen <i>tvhydii1</i> en la inducción de la expresión de genes de defensa en plantas de <i>A. thaliana</i>	80
Participación del gen <i>tvhydii1</i> en confrontación con el fitopatógeno <i>R. solani</i>	82
Participación del gen <i>tvhydii1</i> en la colonización de raíces de tomate por <i>T. virens</i>	84
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	96
APÉNDICES.....	97
APÉNDICE A. Lista de iniciadores.	97
APÉNDICE B. Mapas de vectores y fusiones.	119
Vector pAvr1b-GFP (~4500pb).....	119
Vector pTvlysm1-GFP (~4500pb).....	120
Vector pTacfem1-GFP (~4500pb).....	121
Vector pEpl2-GFP (~4500pb)	122
Vector pTvhydii1-GFP (~4500pb)	123
Vector pNeg-GFP (~4500pb)	124
Vector pJET 1.2/Blunt (2974pb)	125
Vector pUE08.....	126
Vector pRSETB-mCherry.	126
Fusión Epl2-Cherry.	128
Fusión Tacfem1-Cherry.	128
Fusión Tatr2-Cherry.	129
Fusión Tvhydii1-Cherry.	129
APÉNDICE C. Medios de cultivo	130
APÉNDICE D. Secuencias de los genes seleccionados.....	133
<i>Tvlysm1</i> , DNA (3266pb)	133
<i>Tvlysm1</i> , cDNA (783aa).....	136
<i>Tatr2</i> , DNA (1839pb).....	139
<i>Tatr2</i> , cDNA (518aa).....	141
<i>Tacfem1</i> , DNA (600pb).....	143
<i>Tacfem1</i> , cDNA (90aa).....	144
<i>Epl2</i> , DNA (501pb).....	145
<i>Epl2</i> , cDNA (146aa).....	146

<i>Tvsep1</i> , DNA (2901pb)	147
<i>Tvsep1</i> , cDNA (889aa).....	150
<i>Tvhydi1</i> , DNA (423pb).....	153
<i>Tvhydi1</i> , cDNA (103aa)	154
<i>Tamp1</i> , DNA (1487pb).....	155
<i>Tamp1</i> , cDNA (442pb).....	157
REFERENCIAS	159

Índice de Tablas.

Tabla 1. Posibles moléculas tipo efector de <i>T. virens</i> y <i>T. atroviride</i> seleccionadas para este estudio.	50
--	----

Índice de Figuras.

Figura 1. PCR1. Amplificación del marcador de selección y de los extremos río arriba y río abajo de la secuencia de interés.	30
Figura 2. PCR2. Amplificación del marcador de selección flanqueado por las regiones río arriba y río abajo de las secuencias de interés.	30
Figura 3. PCR3. Amplificación de la construcción que contiene el marcador de selección para la interrupción de las secuencias seleccionadas.	31
Figura 4. Amplificación del marco de lectura abierto de los genes seleccionados y de la proteína rojo fluorescente mCherry.	34
Figura 5. Ubicación de los iniciadores diseñados para verificar la integración de la construcción con el marcador de selección en el locus correcto.	38
Figura 6. Diagrama de los iniciadores diseñados para generar construcciones para interrumpir los genes seleccionados mediante PCR de doble unión.	48
Figura 7. Ensayos de interacción <i>A. thaliana</i> – <i>Trichoderma</i> .	52
Figura 8. Efecto de la presencia de <i>Trichoderma</i> sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .	54
Figura 9. Cinéticas de interacción <i>A. thaliana</i> – <i>Trichoderma</i> .	56
Figura 10. Análisis de la expresión de los genes candidatos a efector de <i>Trichoderma</i> durante la interacción con <i>A. thaliana</i> .	57
Figura 11. RT-PCR cuantitativo de los niveles de expresión de los 7 genes seleccionados a los 3, 5 y 7 días de la interacción de <i>Trichoderma</i> con <i>A. thaliana</i> .	59
Figura 12. Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes nulas en los genes <i>tvhdi1</i> , <i>tacfem1</i> y <i>epl2</i> .	62
Figura 13. Confirmación de la inserción de los casetes de interrupción en el locus de los genes seleccionados.	66

Figura 14. Secuencias de aminoácidos fusionadas al gen reportero <i>gfp</i> en el trabajo realizado por Dou y col. (Dou et al., 2008), -Avr1b parte superior- y en este trabajo (secuencias <i>tvlysm1</i> , <i>epl2</i> , <i>tvhydii1</i> , <i>tacfem1</i> y Neg).	68
Figura 15. Fusión de posibles dominios de translocación de los genes candidatos con el gen reportero <i>gfp</i> .	69
Figura 16. Obtención de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP y Tvhydii1-GFP.	70
Figura 17. Ensayo de entrada de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP y Tvhydii1-GFP a raíces de <i>A. thaliana</i> (A, aumento 63x) y raíces de soya (B, aumento 8x).	72
Figura 18 . Construcción de la fusión de los genes seleccionados a la proteína rojo fluorescente mCherry.	73
Figura 19. Localización del producto del gen <i>tacfem1</i> .	75
Figura 20. Construcción de los vectores para sobreexpresar los genes seleccionados.	76
Figura 21. Análisis de expresión del gen <i>tacfem1</i> en las cepas sobreexpresantes.	77
Figura 22. Crecimiento de las cepas mutantes nulas $\Delta tvhydii1$ T2.1 (A) y $\Delta tvhydii1$ T2.3 (B) y de las cepas sobreexpresantes <i>tvhydii1OE</i> T2 (C) y <i>tvhydii1OE</i> T5 (D) en comparación con la cepa silvestre <i>T. virens</i> 29.8 (E) a 3 días de crecimiento.	78
Figura 23. Corroboración de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen <i>tvhydii1</i> .	79
Figura 24. Determinación de hidrofobicidad en micelio de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen <i>tvhydii1</i> .	80
Figura 25 . Inducción de la expresión de genes de defensa y de la biosíntesis de camalexina en plantas de <i>A. thaliana</i> .	81
Figura 26. Ensayos de micoparasitismo de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen <i>tvhydii1</i> de <i>T. virens</i> con el fitopatógeno <i>R. solani</i> AG5.	83
Figura 27. Ensayos de micoparasitismo de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen <i>tvhydii1</i> de <i>T. virens</i> con el fitopatógeno <i>R. solani</i> AG2.	84
Figura 28 . Colonización de raíces de tomate por las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen <i>tvhydii1</i> de <i>T. virens</i> .	86

RESUMEN

Cuando se establece una interacción negativa planta-patógeno, la planta activa respuestas del sistema inmune innato, gracias al reconocimiento de factores de virulencia del patógeno. En esta respuesta participan diversas fitohormonas como auxinas, fitoalexinas, ácido jasmónico y ácido salicílico, entre otras.

Estudios recientes sobre procesos patogénicos en plantas, reportan la participación de moléculas del patógeno conocidas como “efectores”, capaces de alterar la estructura y función celular del hospedero, facilitando su entrada y permanencia en las plantas, estos efectores son reconocidos por la planta, activando la respuesta de defensa vegetal. Se conoce un grupo de efectores que cuentan con el dominio de translocación RXLR, el cual está altamente conservado entre diversos patógenos, mediando la entrada a las células del hospedero. Las plantas también interactúan con microorganismos no patógenos y se conoce poco acerca de los mecanismos que controlan el establecimiento de estas interacciones benéficas.

Los hongos del género *Trichoderma* establecen interacciones benéficas con plantas y son capaces de promover su crecimiento y desarrollo, así como de activar el sistema de defensa vegetal. Es probable que esta interacción sea mediada por moléculas tipo efector, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la participación de este tipo de moléculas de *Trichoderma virens* y *Trichoderma atroviride* en la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y en la activación del sistema de defensa de la planta.

A partir de la base de datos de los secretomas predichos para *T. virens* y *T. atroviride*, se seleccionaron 16 secuencias codificantes para posibles efectores, se realizaron cinéticas de interacción con *Arabidopsis thaliana*, para determinar mediante RT-PCR convencional su expresión en la interacción y mediante RT-PCR en tiempo real se determinó la expresión relativa de 7 genes que mostraron un patrón de expresión reproducible. Se fusionaron los dominios de translocación de 4 de las 10 secuencias a la proteína rojo fluorescente mCherry. Se obtuvieron mutantes nulas y cepas sobreexpresantes para 4 de los genes seleccionados.

Se determinó que el gen *tvhydi1* de *T. virens*, que codifica para una hidrofobina clase II, participa en la interacción micoparasítica con el fitopatógeno *R. solani*, y en la colonización de raíces de tomate, favoreciendo la adhesión a la superficie de los hospederos.

INTRODUCCIÓN

Como todo ser vivo, las plantas llevan a cabo diversas interacciones no sólo con el ambiente físico, sino con otros seres vivos. Las interacciones que establecen las plantas con los microorganismos pueden ser benéficas, como las que se establecen en las micorrizas (por ejemplo, *Laccaria bicolor* - álamo) o en los nódulos fijadores de nitrógeno (*Rhizobium*-leguminosas), con quienes se favorece el intercambio de nutrientes y el crecimiento de las plantas. Las interacciones también pueden ser perjudiciales, como aquellas que se establecen con diversos oomicetos como *Phytophthora* spp., hongos fitopatógenos como *Colletotrichum* spp., y bacterias como *Pseudomonas syringae*, los cuales infectan a las plantas y perjudican su crecimiento (Irieda *et al.*, 2014; Macho *et al.*, 2010; Plett *et al.*, 2011; Rey & Schornack, 2013).

El sistema inmune vegetal.

Cuando se establece una interacción planta-patógeno, en la planta se activan los componentes del sistema inmune innato, que funcionan a través de dos tipos de resistencia:

(I) Resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés), la cual se inicia generalmente por una infección local cuando la planta reconoce moléculas que constituyen componentes estructurales de los microorganismos, promoviendo una respuesta hipersensible que se caracteriza principalmente por la generación de especies reactivas de oxígeno, muerte celular alrededor del sitio de infección entre otras, y genera una resistencia a largo plazo ante el ataque subsecuente de patógenos (Shoresh *et al.*, 2010). Este tipo de resistencia está mediada por el ácido salicílico (SA), fitohormona que participa en la activación de la síntesis de proteínas como quitinasas y glucanasas que ayudan a la defensa de la planta, además de inducir la expresión de genes relacionados a patogenicidad,

conocidos como PR's, (Shoresh *et al.*, 2005; Yedidia & Benhamou, 1999). En el caso de la proteína PR-1, la expresión del gen que la codifica se induce en respuesta a la presencia de ácido salicílico y sirve como marcador de activación de SAR, como se ha demostrado en diversos estudios (Frías *et al.*, 2011).

(II) Resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), que se activa con el reconocimiento de factores de virulencia provenientes del patógeno (Shoresh *et al.*, 2010). Esta resistencia está mediada principalmente por el ácido jasmónico (JA), el cual induce la expresión de genes que participan en la defensa de la planta, como el gen que codifica para la fenilalanina amonía liasa (PAL), que participa en la biosíntesis de precursores de lignina, fenoles y SA, los cuales participan en procesos de defensa de las plantas (Shoresh *et al.*, 2005).

Además del SA y del JA, en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos participan otras fitohormonas como las auxinas, cuyo principal representante es el ácido indolacético (IAA), esta hormona participa principalmente en el crecimiento y el establecimiento de los patrones de desarrollo vegetales, y además tiene un papel relevante en la regulación de genes involucrados en las vías de señalización de respuesta a estrés biótico y abiótico (Ghanashyam & Jain, 2009); las fitoalexinas, compuestos que poseen fuerte actividad antimicrobiana y que se acumulan en grandes cantidades alrededor del sitio de infección (Bacelli *et al.*, 2014; Velazquez-Robledo *et al.*, 2011; Yedidia *et al.*, 2003) y el etileno, que media respuestas tanto a estrés abiótico como a interacciones mutualistas y patogénicas (Groen & Whiteman, 2014; Plett *et al.*, 2014a).

Efectores: sus características, funciones y su participación en interacciones patogénicas.

De manera relativamente reciente, se ha asignado el término de efectores a aquellas moléculas, principalmente proteínas liberadas por el patógeno, capaces de alterar la estructura y función celular del hospedero, y que tienen un papel importante en el establecimiento de interacciones patogénicas. Los reportes publicados hasta la fecha en organismos tan diversos como bacterias, oomicetos y hongos filamentosos sobre estas moléculas, indican que los efectores facilitan el establecimiento del patógeno en el hospedero, promoviendo su patogenicidad a través de diferentes mecanismos, por ejemplo protegiéndolo contra enzimas hidrolíticas del hospedero, estimulando la producción de análogos de hormonas o suprimiendo la inmunidad del hospedero, aunque también pueden evitar el proceso patogénico, induciendo respuestas de defensa y resistencia, como la proteína Avr-Pita de *Magnaporthe griseae* que induce resistencia en arroz (Khang *et al.*, 2008).

Para el caso de interacciones planta–patógeno, a estas moléculas tipo efector se les ha dividido en 2 clases, dependiendo de la localización que presentan en el tejido vegetal: efectores apoplásticos y efectores citoplasmáticos (Hogenhout *et al.*, 2009; Kamoun, 2006, 2007; Schornack *et al.*, 2009).

Los efectores apoplásticos son secretados en el espacio extracelular del hospedero, donde interactúan con blancos y receptores de superficie. Estos efectores se caracterizan por tener una región rica en cisteínas, después del péptido señal para secreción. Los efectores citoplasmáticos son translocados al interior de la célula, donde pueden interactuar con distintos blancos. Estos efectores cuentan con un dominio de translocación ubicado

generalmente después del péptido señal para secreción (Hogenhout *et al.*, 2009; Kamoun, 2006; Schornack *et al.*, 2009). La mayoría de estos efectores están clasificados dentro de la familia RXLR, y se caracterizan por presentar, después del péptido señal para secreción, un dominio conservado con los aminoácidos RXLR.

Se ha propuesto que este dominio RXLR permite la translocación al interior de las células del hospedero uniéndose al fosfatidil-inositol-3-fosfato de las membranas, o mediante el empleo de un translocón, que es un complejo de proteínas asociado a la translocación a través de membranas, y de esta forma poder internalizar a los efectores (Dou *et al.*, 2008; Grouffaud *et al.*, 2010; Wawra *et al.*, 2012). Existe cierta controversia sobre la función del dominio RXLR, algunos autores indican que este dominio pudiera no ser suficiente o necesario para la translocación (Yaeno & Shirasu, 2013). Sin embargo, varios reportes experimentales han probado la relevancia de este dominio en sistemas diversos como la proteína PfHRP2 de *Plasmodium falciparum*, cuyo dominio RXLX es capaz de translocarla al interior de los eritrocitos, o la proteína Avr1b de *Phytophthora sojae* que con el dominio RXLR es capaz de entrar a las células de raíces de soya (Bhattacharjee *et al.*, 2006; Dou *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2010; PONZIO *et al.*, 2014; Stassen & Van den Ackerveken, 2011). Lo anterior sugiere que esta característica pudiera estar conservada en efectores citoplasmáticos de distintos organismos. Sin embargo, hay evidencia de otros dominios adicionales al RXLR, que también pudieran participar en la internalización de los efectores. Tal es el caso del dominio YFLAK de los efectores de la familia Crinkler de diversos oomicetos (Schornack *et al.*, 2010), o el dominio CHXC de *Albugo* (Kemen *et al.*, 2011). Se han identificado otros dominios en diferentes efectores de hongos y oomicetos, como [L/I]xAR (Yoshida *et al.*, 2009), YxSL[R/K] (Lévesque *et al.*, 2010), [Y,F,W]xC

(Godfrey *et al.*, 2010) o el dominio [R/K]VY[L/I]R (Ridout *et al.*, 2006), aunque no hay evidencias suficientes de que participen en la entrada de los efectores a las células del hospedero.

Los efectores pueden desempeñar distintas funciones dentro del hospedero, encaminadas a facilitar el establecimiento de la interacción patogénica, de tal manera que para su estudio los efectores también han sido clasificados según su función, (Stassen & Van den Ackerveken, 2011; Wawra *et al.*, 2012). Algunos de los grupos principales de efectores son aquellos que contienen un dominio LysM, como el efector Mg3LysM de *Mycosphaerella graminicola* que se une a fragmentos de quitina provenientes del hongo, evitando que la planta de tomate perciba estos fragmentos, previniendo así la activación de las respuestas de defensa vegetal (Marshall *et al.*, 2011). Los efectores que tienen homología a la proteína cerato platanina (CP) de *Ceratocystis platani*, son denominados cerato plataninas, y en el caso de la proteína CP, ésta activa la SAR en plantas de *Arabidopsis thaliana*, evidenciada por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de camalexina, una fitoalexina, en las hojas (Bacelli *et al.*, 2014).

Otros tipos de efectores, entre ellos los apoplásticos y algunos citoplasmáticos, tienen actividad de proteasas, por lo que una de sus principales funciones es la protección del patógeno contra enzimas hidrolíticas del hospedero (Hogenhout *et al.*, 2009; Kamoun, 2006; Schornack *et al.*, 2009). Entre este tipo de efectores se encuentran las serin-proteasas y las metaloproteasas, por nombrar algunas. Las serin-proteasas son hidrolasas que tienen en su centro activo un residuo de serina y degradan enlaces peptídicos, y han sido implicadas en el metabolismo y formación del apresorio en *M. griseae* (Donofrio *et al.*, 2006); mientras que las metaloproteasas utilizan un catión divalente, generalmente zinc,

para activar una molécula de agua y degradar los enlaces peptídicos mediante hidrólisis y se asocian a la degradación de tejido en hongos patógenos (Jongeneel *et al.*, 1989; Staats *et al.*, 2013).

Se ha descrito la función de algunas hidrofobinas y proteínas con dominio CFEM como efectores, durante la interacción de los patógenos con sus hospederos. Los efectores con dominio CFEM (por sus siglas en inglés, Common in Fungal Extracellular Membranes) tienen un dominio formado por 8 residuos de cisteínas y algunos de estos efectores parecen tener papeles importantes en la patogénesis de los hongos (Kulkarni *et al.*, 2003), tal es el caso de la proteína Pth11p de *M. griseae* que es necesaria para la formación del apresorio en el proceso infectivo de plantas de cebada (DeZwaan *et al.*, 1999). Las hidrofobinas, al igual que las proteínas con dominio CFEM, tienen 8 residuos de cisteínas, pero difieren en el espacio entre estos residuos y el patrón en que están distribuidas las cisteínas. Estas proteínas participan principalmente en la adhesión celular de las hifas a superficies (Kulkarni *et al.*, 2003), como la hidrofobina Pgh1 de *Phlebiopsis gigantea* que incrementa su síntesis durante la interacción parasítica con *Heterobasidion annosum* (Mgbeahuruike *et al.*, 2012).

En tomate se ha reportado la tioredoxina CITRX funcionando como efector; ésta regula negativamente la muerte celular y las respuestas de defensa mediadas por la interacción Cf9/Avr9 durante la infección con *Cladosporium fulvum* (Rivas *et al.*, 2004). Las tioredoxinas, se han identificado como posibles efectores en *Ustilago maydis* durante la interacción planta-patógeno (Müller *et al.*, 2008), o en interacciones micoparasíticas, como es el caso de *Pythium oligandrum* (Horner *et al.*, 2012).

Existen otros efectores a los que se les denomina Avr, o proteínas de avirulencia, como el caso se las proteínas Avr de *Phytophthora spp.* Avr1b de *P. sojae* suprime la respuesta de muerte celular en la planta, manteniendo la viabilidad de las células para favorecer la infección (Dou *et al.*, 2008).

Otro tipo de efectores, como el efector MiSSP7 de *L. bicolor* (Plett *et al.*, 2011) o el efector SP7 de *Glomus intrarradices* (Kloppholz *et al.*, 2011) tienen la capacidad de entrar al núcleo de la célula del hospedero, y de esta forma alterar directamente la transcripción de genes que participan en el desarrollo de la raíz, favoreciendo la colonización y el establecimiento de la interacción.

En cuanto a la participación de efectores en interacciones micoparasíticas, hay muy poca evidencia al respecto. Horner y col. (Horner *et al.*, 2012) identificaron una serie de posibles efectores del agente biocontrolador *Pythium oligandrum*, expresados durante la interacción con el fitopatógeno *P. infestans*, sugiriendo que los efectores también pudieran participar en interacciones micoparasíticas.

Como se puede notar, las funciones de los efectores son muy diversas y dependen del tipo de efector de que se trate; éstos pueden actuar de manera general o puntual en el hospedero, alterando su respuesta de defensa, y facilitando de esta forma la infección y el establecimiento del patógeno.

Identificación de posibles efectores en los sistemas patogénicos.

Dada la importancia de la participación de los efectores en el establecimiento de interacciones patogénicas, se ha hecho relevante la identificación de estas moléculas en los organismos patógenos más estudiados, haciendo uso de herramientas bioinformáticas y

análisis *in silico* (Ellis *et al.*, 2009; Guyon *et al.*, 2014; Rafiqi *et al.*, 2013). Estas herramientas toman en cuenta características frecuentes de los efectores ya caracterizados, tales como la presencia de un péptido señal para ser secretados, tamaño generalmente pequeño (menor a 300 o 400 aminoácidos), regiones ricas en cisteínas, presencia de dominio de translocación, entre otras (Guyon *et al.*, 2014; Rafiqi *et al.*, 2013). En el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* se identificaron 78 genes que codifican para posibles efectores, empleando herramientas bioinformáticas y tomando en cuenta características como anotación del secretoma, filogenia, selección y duplicación de genes y predicción tridimensional de la estructura de las proteínas (Guyon *et al.*, 2014).

El uso de herramientas bioinformáticas y de análisis *in silico* no sólo han permitido distinguir a los efectores según sus funciones predichas (Guyon *et al.*, 2014; Rafiqi *et al.*, 2013), sino que en algunos casos, estas funciones han podido ser corroboradas de manera experimental, como el efector Mg3LysM, que fue identificado haciendo un análisis del genoma de *Mycosphaerella graminicola*, para después determinar su participación como efector durante la interacción con plantas de tomate (Marshall *et al.*, 2011).

Efectores y su participación en interacciones benéficas planta–microorganismo.

La mayoría de los estudios sobre moléculas tipo efector han sido enfocados a sistemas planta-patógeno. Sin embargo, las plantas son capaces de establecer interacciones benéficas con diversos microorganismos en el suelo, siendo importantes incluso, para el correcto desarrollo de diversas especies vegetales (Druzhinina *et al.*, 2011; Harman, 2011) . Se conoce poco aún sobre los mecanismos moleculares que permiten el establecimiento de interacciones benéficas con plantas, sin embargo, se han descrito proteínas tipo efector que

participan en el establecimiento de este tipo de interacciones. Se ha descrito que las leguminosas como *Medicago* spp. responden a factores de nodulación de *Sinorhizobium meliloti*, favoreciendo el establecimiento de la simbiosis entre estos dos organismos (Liang *et al.*, 2013). En el caso de la simbiosis entre plantas del género *Populus* con el hongo *Laccaria bicolor*, participa la proteína MiSSP7, la cual entra al núcleo de las células vegetales y evita la degradación de proteínas JAZ. Estas proteínas funcionan como represores de la transcripción de genes que responden a JA, de esta manera atenúa la respuesta de defensa de la planta y permite el desarrollo de la micorriza (Plett *et al.*, 2011, 2014a). De manera similar funciona la proteína SP7 de *Glomus intraradices*, ésta entra al núcleo de la célula vegetal y altera la transcripción, contribuyendo al desarrollo de la relación simbiótica con *Medicago truncatula* (Kloppholz *et al.*, 2011).

En interacciones benéficas se ha demostrado que el estatus fisiológico de la planta puede afectar también el establecimiento de las interacciones, puesto que se ha visto que en circunstancias en que la respuesta de defensa de la planta pudiera encontrarse sobre activada, se reduce el establecimiento de estas interacciones. Esto fue demostrado al inducir de forma exógena la vía de defensa mediada por etileno, reduciendo de esta manera la formación de la red de Hartig, proceso fundamental en el establecimiento de la simbiosis *L. bicolor* – *Populus* (Plett *et al.*, 2014b). Al parecer, es importante que exista una modulación entre la activación y represión de las vías de señalización en la planta, de forma tal que no afecte el crecimiento del simbionte en el interior, pero que tampoco afecte a la planta.

***Trichoderma* spp. en interacción benéfica con plantas.**

Entre los organismos que son capaces de establecer interacciones benéficas con plantas, se encuentran varias especies de hongos del género *Trichoderma*. Se trata de hongos

filamentosos, pertenecientes al *phylum* Ascomycota, con un estilo de vida considerado como saprófito y oportunista, pues se les puede encontrar en sustratos como suelo, madera, cortezas, entre otros (Druzhinina *et al.*, 2011). Varias especies de este género han sido estudiadas ampliamente debido a su uso industrial, por su capacidad de secretar enzimas, particularmente *T. reesei* (Saloheimo *et al.*, 2004); y por su actividad micoparasítica, como las especies *T. atroviride* y *T. virens*, por lo que son utilizadas como agentes de control biológico sobre hongos patógenos de plantas (Benítez *et al.*, 2004; Harman, 2011; Shores *et al.*, 2010).

Se han reportado distintos efectos benéficos en plantas en interacción con *Trichoderma*, entre ellos promoción del crecimiento y desarrollo en cultivos de maíz (Harman, 2011) y aumento de la biomasa y el crecimiento radicular en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Salas-marina *et al.*, 2011; Tucci *et al.*, 2011). Se ha reportado también que plantas de *A. thaliana* creciendo en una atmósfera compartida con *T. viride* presentan mayor crecimiento de raíces laterales debido a la liberación de compuestos orgánicos volátiles de este hongo (Hung *et al.*, 2013).

Los estudios indican que *Trichoderma* produce compuestos tipo auxina (ácido 3-indol acético, indol-3-acetaldehído e indol-3-etanol) y que su presencia podría ser la responsable de promover el crecimiento vegetal. (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Salas-marina *et al.*, 2011). Es probable que moléculas tipo efector de *Trichoderma* participen en modificar los contenidos de esta fitohormona en la planta, se sabe que algunos efectores como AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* (Kazan *et al.*, 2009) o 19C07 de *Heterodera schachtii* (Lee *et al.*, 2011) son capaces de promover la síntesis y el flujo de auxinas en plantas de *Arabidopsis*.

Adicionalmente, en plantas co-cultivadas con *Trichoderma*, se ha observado un aumento en la concentración de fitoalexinas (Yedidia *et al.*, 2003) como la camalexina, y de fitohormonas como ácido jasmónico y ácido salicílico, contribuyendo a la protección de la planta contra el ataque de patógenos como *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae* (Salas-marina *et al.*, 2011; Velazquez-Robledo *et al.*, 2011)

En general se conoce muy poco en relación al mecanismo mediante el cual *Trichoderma* puede establecerse como endófito en una interacción benéfica con las plantas; se ha planteado la posibilidad de que sea a través del empleo de moléculas tipo efector, como el establecimiento de simbiosis como las micorrizas (Plett *et al.*, 2011, 2014b) o la interacción benéfica con rizobacterias (Liang *et al.*, 2013).

Se sabe también que, para el caso de *T. harzianum*, la vía de defensa vegetal mediada por ácido salicílico regula la entrada y colonización de este hongo en plantas de *A. thaliana* donde, en plantas deficientes en el gen *sid2* que no producen esta fitohormona, *T. harzianum* es capaz de colonizar el tejido vascular, así como las partes aéreas, afectando la supervivencia de la planta (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

Presencia de Efectores en Trichoderma spp.

En *Trichoderma* spp. se han identificado algunas moléculas tipo efector, uno de los mejor caracterizados es Sm1 de *T. virens* (Epl1 en *T. atroviride*), se trata de una cerato platanina capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes relacionados con la respuesta al patógeno, en plantas de algodón y maíz (Djonovic *et al.*, 2007; Seidl *et al.*, 2006). TasSWO de *T. asperellum*, estimula el sistema de defensa en plantas de pepino y proporciona protección contra *B. cinerea* y *P. syringae*, además de facilitar la colonización de las raíces de pepino (Brotman *et al.*, 2008); el gen que codifica

para la hidrofobina Tashyd1 de *T. asperellum* incrementa su expresión durante la interacción con pepino (Viterbo & Chet, 2006), y la sobre expresión del gen que codifica para la serin-proteasa Tvsp1 de *Trichoderma virens* mejora la protección de semillas de algodón contra *Rhizoctonia solani* (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007).

Además de los efectores mencionados, se sabe también que metabolitos secundarios de distintas especies de *Trichoderma* tales como los peptaiboles (péptidos pequeños, de origen no ribosomal) el harzianolide y la 6-pentil- α -pirona, entre otros, igualmente presentan actividades relacionadas con la activación de las respuestas de defensa vegetal (Hermosa *et al.*, 2012; Mukherjee *et al.*, 2013).

Es importante identificar y estudiar otros posibles efectores en hongos del género *Trichoderma* que participen en el establecimiento de interacciones benéficas, que nos ayuden a entender el mecanismo por el cual el hongo puede permanecer en la planta sin generar un proceso patogénico. La disponibilidad de procesos bioinformáticos y la información obtenida a partir de la secuenciación de genomas representan herramientas sumamente útiles para este fin. Actualmente están disponibles los genomas de 7 especies del género *Trichoderma*, entre ellos *T. reesei*, *T. atroviride*, *T. virens*, *T. harzianum* y *T. asperellum* ('JGI Fungi Portal - Home', n.d.; Kubicek *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013).

En lo que se refiere a la identificación de efectores de *Trichoderma*, en el grupo de trabajo se elaboró una lista de secuencias de genes que codifican para posibles efectores, empleando distintas herramientas bioinformáticas que permitieron buscar dentro de los genomas de *T. virens* y de *T. atroviride*, e identificar genes con características comunes a efectores, como la presencia de péptido señal de secreción, de dominio de translocación

RXLR o similar a éste y secuencias correspondientes a proteínas pequeñas secretadas ricas en cisteínas, además de identificar secuencias homólogas a efectores reportados previamente en otros sistemas. Esta lista agrupa las secuencias que codifican para posibles efectores en *Trichoderma* principalmente de acuerdo a su función predicha, en por lo menos 7 categorías: (I) secuencias con dominio LysM; (II) secuencias con dominio CFEM; (III) hidrofobinas; (IV) proteasas; (V) cerato plataninas; (VI) metaloproteasas y (VII) tioredoxinas (Guzmán-Guzmán *et al.*, artículo sometido).

Como se ha descrito en trabajos para otros sistemas biológicos, no sólo es necesario identificar secuencias que codifiquen para posibles efectores dentro de los genomas, sino determinar su participación en el establecimiento de las interacciones, de tal forma que ayuden a elucidar los mecanismos mediante los cuales organismos como *Trichoderma* spp. son capaces de establecer interacciones benéficas con las plantas.

JUSTIFICACIÓN

Los efectores han sido estudiados más ampliamente en los sistemas patogénicos, donde juegan un papel relevante en el establecimiento de interacciones perjudiciales facilitando al patógeno establecerse e infectar a su hospedero, modulando la estructura y función celular de éste. Sin embargo, hay evidencia de que en interacciones benéficas de plantas con diversos microorganismos participan moléculas tipo efector que favorecen la simbiosis, pero se conoce poco sobre los mecanismos que permiten establecer este tipo de interacciones.

Algunas especies de *Trichoderma* son capaces de establecer interacciones benéficas con plantas, favoreciendo su crecimiento y desarrollo, activando las respuestas de defensa y proporcionando protección contra diversos organismos fitopatógenos. Se propone que las moléculas tipo efector podrían ser elementos clave en el establecimiento de la interacción planta-*Trichoderma* siendo necesario identificarlas y determinar su participación en este proceso.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la participación de moléculas tipo efector de *T. virens* y *T. atroviride* en el establecimiento de su interacción benéfica con plantas de *Arabidopsis thaliana*, desencadenando la activación de respuestas de defensa en la planta.

OBJETIVOS PARTICULARES.

OBJETIVO 1: Verificar la actividad transcripcional de miembros de las 7 familias de efectores en interacción con *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVO 2: Seleccionar al menos 5 posibles efectores con base en el patrón de expresión identificado, para determinar el nivel de expresión durante la interacción *Trichoderma* – *Arabidopsis*.

OBJETIVO 3: Determinar la capacidad de las posibles moléculas tipo efector para entrar en las células vegetales.

OBJETIVO 4: Determinar la función de al menos un candidato a efector en los procesos de activación de mecanismos de defensa, en la promoción del crecimiento en las plantas y en la protección contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de secuencias que codifican para posibles moléculas tipo efector de *T. virens* y *T. atroviride*.

En el grupo de trabajo, se identificaron 233 secuencias de genes que codifican para posibles efectores (Guzmán-Guzmán *et al*, artículo sometido) para *T. atroviride* y *T. virens*. Ésta fue obtenida empleando herramientas bioinformáticas y con apoyo de datos bibliográficos sobre efectores validados experimentalmente, se realizó una búsqueda de homólogos a éstos en los secretomas predichos de *Trichoderma*. Adicionalmente, se buscó que tuvieran el motivo de translocación RXLR, o uno similar a éste (RXXX, XXLR, XXXR, XXLX, RXLX); de todos los candidatos 101 mostraron este tipo de dominio. Los candidatos fueron agrupados en 7 familias, dependiendo de los dominios encontrados, utilizando la base de datos Pfam, correspondientes a 1) repetidos de LysM, 2) tioredoxinas, 3) proteínas con el dominio CFEM, 4) cerato plataninas, 5) serin proteasas, 6) Hidrofobinas y 7) metaloproteasas.

De la lista de posibles efectores de *Trichoderma* se escogieron 16 secuencias, tomando como principales criterios de selección que fueran representantes de cada una de las siete familias y que presentaran el motivo de translocación RXLR o uno similar a éste.

Material vegetal.

En este trabajo se emplearon semillas de *A. thaliana* ecotipo Col 0 (*A. thaliana* Wt) y las líneas marcadoras de *A. thaliana* pLox2:*uidA*, pPR1:*uidA*, pBA3:*uidA* y pDR5:*uidA*. Las semillas de las líneas marcadoras se seleccionaron en cajas de Petri con medio MS 1X suplementado con kanamicina para asegurar que fueran homocigotas para el gen reportero *uidA* que codifica para la β -D-glucuronidasa. En estas líneas marcadoras, el gen reportero

está fusionado a promotores que responden a jasmonatos (pLox2), ácido salicílico (pPR1) y auxinas (pBA3 y pDR5), por lo que se utilizan frecuentemente para observar las respuestas de defensa de *A. thaliana* en interacciones con otros organismos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009; Velazquez-Robledo *et al.*, 2011).

Las semillas de soya (*Glycine max*) utilizadas en este trabajo se compraron en el mercado de Zamora, Mich., y se mantuvieron en un lugar seco y sin luz.

Las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) que se utilizaron en este trabajo son semillas comerciales de la marca Germinal, para uso agrícola.

Esterilización de semillas de A. thaliana.

Se colocaron las semillas de *A. thaliana* en tubos Eppendorf y se agregaron 500µL de etanol absoluto grado reactivo, agitando el tubo para lavar las semillas; una vez hecho esto, se centrifugaron por 20s a 14000rpm (microcentrífuga SIGMA) y se decantó el etanol. Se repitió el lavado con etanol de 4 a 5 veces, decantando el etanol del último lavado en la campana de flujo de laminar. Se dejaron abiertos los tubos dentro de la campana hasta que el etanol se evaporó por completo y las semillas estuvieron secas. Las semillas esterilizadas por este método se utilizaron en el momento o se guardaron para usarse después en los ensayos de interacción con *Trichoderma*.

Esterilización de semillas de tomate.

Las semillas de tomate se colocaron en tubos Falcon de 50mL, y se lavaron 5 veces con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, decantando el líquido cada vez. Se dio un lavado final con etanol absoluto.

Cepas fúngicas.

En este trabajo se emplearon las cepas silvestres *T. virens* 29.8 y *T. atroviride* IMI 206040, y la cepa con auxotrofia a arginina *T. virens* 10.4 (Baek & Kenerley, 1998). Se utilizaron también los grupos de anastomosis AG2 y AG5 del fitopatógeno *R. solani*. Cada cepa se creció en cajas Petri con agar papa dextrosa por un período aproximado de 5 a 7 días, para después cosechar las conidias correspondientes y contar en cámara de Neubauer. La cosecha de conidias se realizó de manera continua, asegurando tener conidias frescas para cada uno de los ensayos de interacción con la planta.

Las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes obtenidas en este trabajo, se mantuvieron en medio agar papa dextrosa suplementado con 50 µg/mL de higromicina, y en medio mínimo de Vogel para la mutante nula $\Delta tvhydii1$.

Ensayos de interacción A. thaliana – Trichoderma.

Para llevar a cabo los ensayos de interacción *A. thaliana* – *Trichoderma*, en cajas Petri con medio MS 0.2X se colocaron 10 semillas por caja (*A. thaliana* Wt, pLox2, pPR1, pDR5 o pBA3), ubicándolas hacia un extremo, y se dejaron vernalizar a 4°C por un período de 2 a 3 días. Después del período de vernalización, se pasaron las cajas a una cámara de crecimiento para plantas (Growth Chamber modelo PGI-500H MRClab) con ciclos de luz/oscuridad de 16h/8h y 24°C de temperatura, dejando germinar las semillas por 4 días, colocando las cajas con un ángulo de inclinación de aproximadamente 60° para evitar que las raíces se enterraran en el medio. A los 4 días de germinación, se inocularon 1×10^6 conidias de la cepa correspondiente de *Trichoderma*, o agua estéril como control, colocando el inóculo a 5cm de la punta de la raíz de las plántulas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Se colectó el micelio y/o las plántulas a los 3, 5 y 7 días después de la inoculación.

Como controles para los ensayos de interacción se emplearon plantas de *A. thaliana* creciendo solas, así como las cepas correspondientes de *Trichoderma* en cultivos axénicos. En los casos en que debía colectarse el micelio, la interacción se realizó en cajas Petri con medio MS 0.2X cubierto con papel celofán dulce, esterilizado en autoclave, para facilitar la colecta del micelio, se tomó únicamente 1cm de ancho de la porción del frente de la colonia en crecimiento. Se realizaron 5 experimentos independientes, con 3 réplicas técnicas cada uno.

El micelio y las plántulas de *A. thaliana* Wt fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido después de la recolección y almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

Determinación del efecto de la presencia de Trichoderma sobre el crecimiento vegetal.

A partir de los experimentos de interacción ya descritos, se midió la longitud de la raíz principal de cada plántula a los 3, 5 y 7 días. Los brotes radiculares secundarios para cada una de las plántulas fueron contados al día 7 de interacción. En estas plántulas se determinó el peso fresco del tejido aéreo (sin raíces); el tejido se colocó posteriormente en un horno de secado a 100°C durante 2 días para obtener el peso seco.

Obtención de RNA y síntesis de cDNA.

El micelio congelado en nitrógeno líquido se trituró dentro de un tubo eppendorf empleando un pistilo de vidrio. Se siguieron las indicaciones del proveedor del reactivo TRIzol (Life Technologies) para la extracción de RNA. Una vez resuspendida la pastilla de RNA, se cuantificó en nanodrop y la síntesis de cDNA se realizó siguiendo las instrucciones del kit para síntesis de cDNA RevertAid H Minus First Strand cDNA

Synthesis Kit (Thermo Scientific). Las muestras de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Análisis por RT-PCR semicuantitativo.

Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies), utilizando como templado el cDNA sintetizado a partir del RNA del micelio de las confrontaciones de *Trichoderma* con *A. thaliana*. Se diseñaron iniciadores específicos para cada una de las secuencias seleccionadas de *T. virens* y de *T. atroviride* (ver Apéndice A). Como control para las reacciones se emplearon iniciadores que amplifican un fragmento del gen que codifica para la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gpd*), que se expresa de manera constitutiva y, para validar el experimento, se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento del gen que codifica para el efector Sm1 de *T. virens* y un par de iniciadores para el gen que codifica para el efector Epl1 de *T. atroviride*, los cuales se sabe incrementan su expresión en interacción con plantas (Djonović *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2006).

Las condiciones de amplificación fueron como sigue: 95°C de desnaturalización por 3 min, 25 ciclos de amplificación con 95°C de desnaturalización por 30s, 60°C de alineamiento por 30s y 72°C de extensión por 1min, y un tiempo final de extensión de 5min.

Los productos de las reacciones de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se realizó un análisis densitométrico de los niveles de expresión de los genes seleccionados en confrontación con la planta, con el programa ImageJ 1.48V (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), utilizando el nivel de expresión de *gpd* para normalizar los niveles de expresión de los genes seleccionados y después comparar la expresión de cada gen durante la interacción de *Trichoderma* con la planta (condición de

interacción) contra el nivel de expresión del gen en la condición control (hongo creciendo solo).

Análisis por qRT-PCR.

Se realizaron reacciones de qRT-PCR con el reactivo Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), utilizando como templado el cDNA sintetizado a partir del RNA del micelio de las confrontaciones de *Trichoderma* con *A. thaliana*, y se diseñaron iniciadores específicos para cada una de las secuencias seleccionadas de *T. virens* y de *T. atroviride* para utilizarse en los ensayos de tiempo real (ver Apéndice A). Como controles se utilizaron los mismos iniciadores para *gpd*, *sm1* y *epl1* que se usaron en los ensayos de RT-PCR semicuantitativo. Se analizó 1 réplica biológica con 3 réplicas técnicas.

Los datos obtenidos del tiempo real se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$, el cual permite comparar el nivel de expresión de una muestra en una condición dada (condición de interacción) con respecto de una muestra control (condición control), normalizando los datos con respecto a la expresión de un gen endógeno, *gpd* para este caso. Se utilizó el programa StepOne Plus (Applied Biosystems) para los análisis de la expresión por tiempo real.

Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes.

Se siguió el protocolo de PCR de doble fusión (Yu *et al.*, 2004), el cual consiste en realizar 3 rondas de PCR para generar una construcción conteniendo los extremos del gen que se va a interrumpir y de un gen que funciona como marcador de selección. Para interrumpir los genes *tatr2*, *tac1*, *epl2* y *tamp1* de *T. atroviride* y el del gen *tvlys1* de *T. virens* se utilizó el gen que confiere resistencia a higromicina (*hph*, higromicina fosfotransferasa). Para el gen *tvhdi1* de *T. virens* se utilizó como marcador de selección el gen *arg2* que

codifica para la subunidad pequeña de la carbamoil fosfato sintasa de *T. virens*, que revierte la auxotrofia a arginina de la cepa 10.4 de este hongo (Baek & Kenerley, 1998). Las 3 rondas de amplificación se llevaron a cabo con utilizando High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific ®) y se realizaron como sigue:

PCR 1. Se amplificaron simultáneamente, por separado, el marcador de selección, el extremo 5' y el extremo 3' del gen a interrumpir, para cada uno de los candidatos (Figura 1). Las condiciones de reacción fueron: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 65°C y 3min de extensión a 72°C, con un tiempo final de 10 min a 72°C. Se utilizó como templado el DNA genómico correspondiente y el vector pUE08 para amplificar el gen *hph* (Esquivel-Naranjo & Herrera-Estrella, 2007), y DNA genómico de *T. virens* 29.8 como templado para amplificar el gen *arg2*. Los iniciadores que se utilizaron para esta primer PCR fueron los iniciadores quiméricos, que contienen secuencias complementarias al marcador de selección. Los 3 productos de PCR se purificaron juntos por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific), en proporción 1:3:1 (extremo 5': marcador: extremo 3').

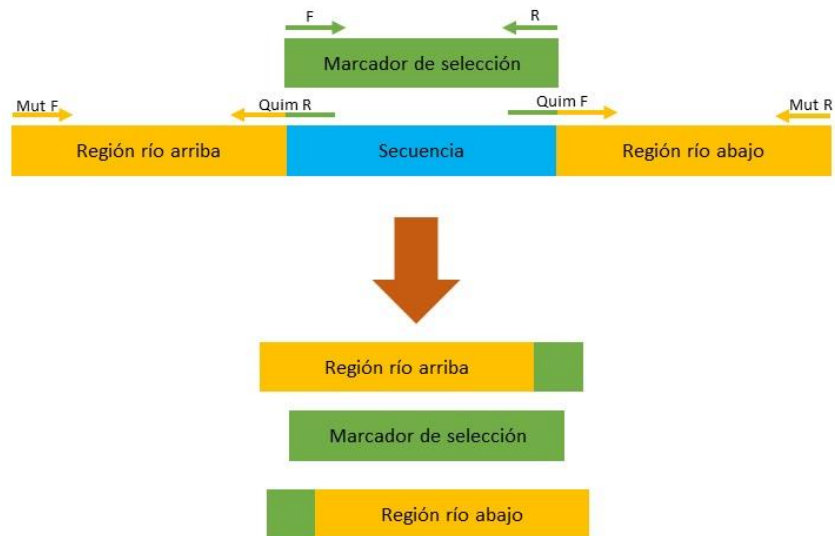


Figura 1. PCR1. Amplificación del marcador de selección y de los extremos río arriba y río abajo de la secuencia de interés.

PCR 2. Con los productos de la PCR 1 purificados, se realizó la segunda reacción, utilizando como iniciadores los extremos 5' y 3' que tienen secuencias complementarias a los marcadores *hph* y *arg2*, según fuera el caso (Figura 1; Figura 2). Las condiciones de reacción fueron: 3 min a 94°C, 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 65°C y 6.5min de extensión a 72°C, con un tiempo final de 10min a 72°C. El templado para esta reacción fueron los productos de la PCR1.

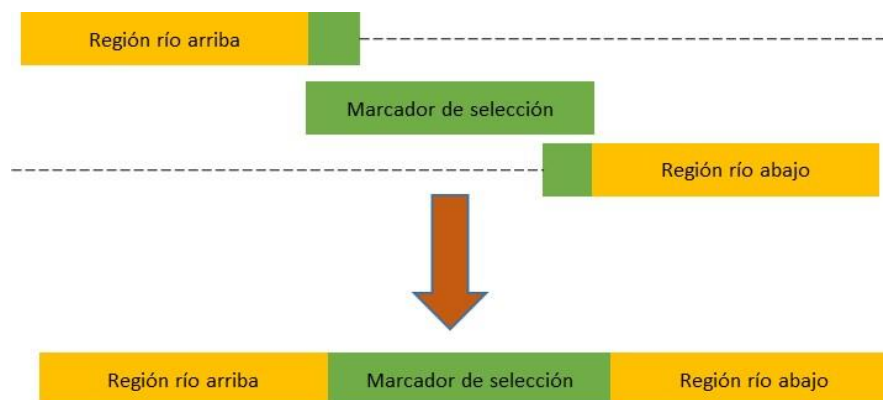


Figura 2. PCR2. Amplificación del marcador de selección flanqueado por las regiones río arriba y río abajo de las secuencias de interés.

PCR 3. En esta última reacción se utilizaron los iniciadores anidados para cada uno de los genes, con la finalidad de contar con una cantidad suficiente de la construcción para hacer la interrupción del gen de interés (Figura 3). Se utilizó como templado 2.5µL de la reacción del PCR2, y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C y 6.5min de extensión a 72°C, y un tiempo final de 10min a 72°C. Los productos de la PCR se purificaron por columna (GeneJet Gel Extraction Kit; Thermo Scientific) y se utilizaron para transformar protoplastos de *T. atroviride* o de *T. virens*10.4.

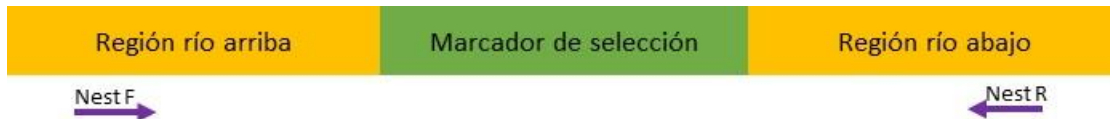


Figura 3. PCR3. Amplificación de la construcción que contiene el marcador de selección para la interrupción de las secuencias seleccionadas.

Construcción de los vectores para sobreexpresión.

Para sobreexpresar los genes seleccionados, se utilizó el vector pUE08 que contiene el promotor constitutivo del gen de la piruvato cinasa (*pki*) de *T. reesei*, y el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina, como marcador de selección (Esquivel-Naranjo & Herrera-Estrella, 2007). Para los genes *tatr2*, *tacfem1* *epl2* y *tvhydii1*, se diseñaron iniciadores que amplificaran el marco de lectura abierto correspondiente. Al iniciador derecho se le agregó un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI, mientras que al iniciador reverso se le agregó un sitio para la enzima *Hind*III. Lo anterior se hizo con la finalidad de insertar el marco de lectura abierto de cada gen, en el sitio de clonación múltiple del vector pUE08 utilizando las enzimas mencionadas.

Con los iniciadores correspondientes, se amplificaron los marcos de lectura abiertos de los genes, usando como templado cDNA. Las condiciones de reacción fueron: 3 min a 94°C, 35 ciclos de 30s a 94°C, 45s a 55°C y 2min de extensión a 72°C, con un tiempo final de 10min a 72°C. Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Scientific ®) y se clonaron en el vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific ®), como indica el protocolo del fabricante, y se procedió a transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y se plaquearon en cajas Petri con medio LB-A (ampicilina 100 μ g/ml). Mediante PCR en colonia y utilizando los iniciadores que amplificaban los marcos de lectura abiertos, se corroboró la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina. Se realizó extracción de plásmido mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001). Se hizo una digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Invitrogen, Life Technologies ®); de los plásmidos obtenidos y del vector pUE08 se analizaron las digestiones por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron las bandas correspondientes a los marcos de lectura abiertos de los genes *tatrx2* (1749pb), *tacfem1* (536pb) *epl2* (450pb), *tvhydii1* (321pb), así como el vector pUE08 (6100pb), siguiendo el protocolo del GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific ®).

Una vez que se tuvieron los fragmentos y el vector purificados, se realizó una ligación con T4 DNA ligasa (Thermo Scientific ®) del vector digerido pUE08, con cada uno de los marcos de lectura abiertos, obteniendo los vectores pUE08-tatrx2SE, pUE08-tacfem1SE, pUE08-epl2SE y pUE08-tvhydii1SE. Estas ligaciones se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α , y mediante PCR en colonia, se seleccionaron por lo menos 3 clonas positivas resistentes a ampicilina (100 μ g/mL), para cada uno de los

vectores. Estos vectores se mandaron secuenciar para asegurar que el marco de lectura abierto de cada gen fuera correcto. Una vez confirmada la secuencia de los vectores, se utilizaron para transformar protoplastos de *Trichoderma*, y obtener las cepas sobreexpresantes correspondientes.

Construcción de las fusiones a la proteína rojo fluorescente mCherry.

Para determinar la localización de los productos de los genes seleccionados, se fusionó el marco de lectura abierto de cada gen al marco de lectura abierto de la proteína rojo fluorescente mCherry (717pb), y se utilizó el vector pUE08 para su expresión en *Trichoderma* (Esquivel-Naranjo & Herrera-Estrella, 2007). Se utilizó el protocolo de PCR de doble fusión (Yu *et al.*, 2004), como se hizo para generar los casetes de interrupción para las mutantes, realizando las 3 rondas de PCR descritas anteriormente. Para amplificar los marcos de lectura de cada gen se utilizó como templado cDNA de *T. atroviride* o *T. virens*, y para amplificar el marco de lectura de la proteína mCherry se empleó el vector pRSET-B-mCherry proporcionado por el Dr. Juan Carlos Torres Guzmán. Se diseñaron iniciadores que amplificaran el marco de lectura abierto de los genes *tatrx2*, *tacfem1* y *epl2* de *T. atroviride* y el del gen *tvhydi1* de *T. virens*, así como el de la proteína mCherry, e iniciadores quiméricos que contuvieran secuencias complementarias a mCherry (Figura 4). Para amplificar la construcción completa (PCR 3, Figura 3), se utilizaron los iniciadores F y Cherry R, como se muestra en la Figura 4, los cuales tienen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente.

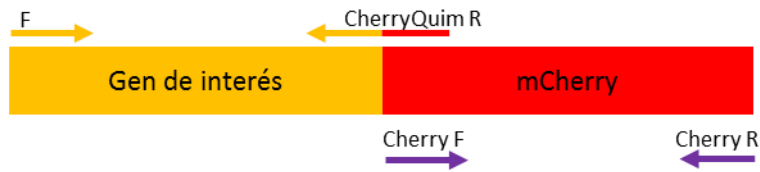


Figura 4. Amplificación del marco de lectura abierto de los genes seleccionados y de la proteína rojo fluorescente mCherry.

El producto de la PCR 3 se clonó en el vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific ®), como indica el protocolo del fabricante, y se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . Se plaquearon en cajas Petri con medio LB-A (ampicilina 100 μ g/mL) y mediante un PCR en colonia se corroboró la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina. Se hizo extracción de plásmido mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001), para después realizar una digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III de los plásmidos obtenidos y del vector pUE08, se analizaron las digestiones por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron las bandas correspondientes a las construcciones de los genes *tatrx2* (2208pb), *tacfem1* (990pb) *epl2* (1158pb), *tvhydii1* (1029pb), así como el vector pUE08 (6100pb), siguiendo el protocolo del GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific ®).

Con los fragmentos y el vector purificados, se realizó una ligación con T4 DNA ligasa (Thermo Scientific ®) del vector digerido pUE08, con cada una de las construcciones, obteniendo los vectores pUE08-tatrx2Cherry, pUE08-tacfem1Cherry, pUE08-epl2Cherry y pUE08-tvhydii1Cherry. Estas ligaciones se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α , y mediante PCR en colonia, se seleccionaron por lo menos 3 clonas positivas resistentes a ampicilina para cada uno de los vectores. Estos

vectores se mandaron secuenciar para asegurar que el marco de lectura abierto de la proteína mCherry estuviera en fase con el marco de lectura abierto de cada gen, y que la secuencia fuera la correcta en cada caso. Estos vectores se utilizaron para transformar protoplastos de *Trichoderma*, y obtener las cepas correspondientes.

Transformación de protoplastos de Trichoderma.

Se siguió el protocolo descrito por Castellanos y col. (Castellanos *et al.*, 2010) para la obtención de protoplastos. Para obtener las germínulas, en 100mL de medio PDB (Difco) se inocularon 1×10^6 conidias/mL de *T. virens* o *T. atroviride* y se incubaron a 28°C de 14 a 16h.

Para preparar los protoplastos se siguió todo el protocolo bajo condiciones de esterilidad. El micelio se filtró en embudos de cono de tela y se lavó con 100mL de agua destilada. En una caja Petri previamente pesada, se colocaron 0.2 – 0.5g de micelio. Se agregaron 10-15mg/mL de extracto enzimático de *Trichoderma* (Glucanex) a 5mL de solución osmótica (CaCl₂ 50mM, Manitol 0.5M, MES 50mM, pH5.5) y se esterilizó por filtración (membrana Millipore de 0.45µm) en un tubo Corning de 50mL. A esta solución enzimática se le agregó el micelio de *Trichoderma* y se mezcló en vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. El tubo se colocó en un agitador orbital a 100rpm, durante 2-3h y la formación de protoplastos se fue monitoreando cada hora, mediante observaciones de pequeñas muestras al microscopio.

Para recuperar los protoplastos, la suspensión se filtró utilizando filtros miracloth (150 y 100µm), y se lavaron con 2mL de solución osmótica. El filtrado se distribuyó equitativamente en tubos eppendorf y se centrifugaron a 8000rpm por 10min (centrífuga SIGMA). Se desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en un volumen

mínimo de solución osmótica (10 μ L). Luego se cuantificaron los protoplastos en cámara de Neubauer, esperando una cuenta del orden 1.0x10⁷- 1.0x10⁸ protoplastos/mL.

Para llevar a cabo la transformación, se prepararon dos reacciones: una reacción para transformar los protoplastos y una reacción control. En la reacción de transformación se mezclaron 250 μ L de protoplastos con 60 μ L de solución osmótica conteniendo la construcción del PCR 3 o del vector de transformación correspondiente (10 a 20 μ g), en la reacción control se mezclaron 250 μ L de protoplastos sólo con 60 μ L de solución osmótica. Las reacciones se incubaron 20min en hielo y se agregó un volumen igual al de las reacciones de polietilenglicol (PEG) 8000 al 40%, previamente incubado a 42°C; se mezclaron los tubos suavemente por inversión. Se incubaron las reacciones 30min a temperatura ambiente.

Para finalizar, los protoplastos se mezclaron con 10mL de agar PDA suave con higromicina, 100 μ g/mL y se dispersaron en 2 placas de Petri con medio PDA selectivo. La mitad de la reacción control se colocó en 5mL de agar suave sin antibiótico y se dispersó en 1 caja de Petri con medio PDA selectivo sin antibiótico, siendo esta caja el control positivo de regeneración. Mientras que la otra mitad de la reacción control se colocó en 5mL de agar suave con antibiótico y se dispersó en 1 caja de Petri con medio selectivo, con antibiótico, esta caja fue el control negativo del proceso de transformación. Para la transformación de *T. virens*10.4, se siguieron los pasos ya descritos, sólo que, en lugar de utilizar PDA para preparar los medios selectivos y el agar suave, se utilizó medio mínimo Vogel. Las colonias transformantes se recuperaron de la placa a los xx días y se pasaron a una placa independiente con PDR higromicina

Verificación de las transformantes.

Se realizó extracción de DNA genómico (Raeder & Broda, 1985) empelando un buffer a base de urea (Buffer urea: urea 42%, NaCl 0.3M, EDTA 0.02M, Tris-HCl pH 8 0.05M), para cada una de las transformantes obtenidas de *Trichoderma*. En el caso de las cepas mutantes, para verificar si la construcción con el marcador de selección se había recombinado en el locus correcto, se diseñaron iniciadores ubicados en los extremos 5' y 3' del gen, que no estuvieran contenidos en la construcción e iniciadores contenidos en el marco de lectura abierto del marcador de selección (Figura 5B). Como control negativo de la inserción en el sitio deseado, se utilizó un iniciador en el extremo 5' del gen, ubicado fuera de la construcción y un iniciador contenido en el marco de lectura abierto del gen a interrumpir, así como un iniciador hacia el extremo 3' del gen y un iniciador ubicado dentro del marco de lectura abierto del gen a interrumpir (Figura 5A). Con estos iniciadores y empleando como templado el DNA de las transformantes y el DNA de las cepas silvestres como control, se realizaron reacciones de PCR (Taq DNA Polimerasa, Invitrogen, Life Technologies) con las siguientes condiciones de reacción: 3 min a 95°C, 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 65°C y 3min de extensión a 72°C, y un tiempo final de 10min a 72°C. Los productos de las PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para las posibles transformantes que integraron la construcción en el locus correcto se realizaron cuatro pases monospóricos.

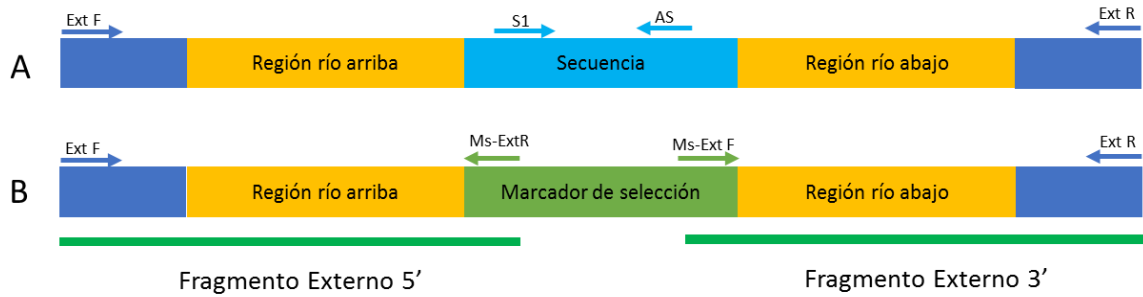


Figura 5. Ubicación de los iniciadores diseñados para verificar la integración de la construcción con el marcador de selección en el locus correcto. En el DNA de una cepa que integró la construcción de manera ectópica (A), los iniciadores ExtF – AS y ExtR – S1 amplifican regiones de mayor tamaño que los productos de amplificación de los iniciadores ExtF – Ms-ExtR y ExtR – Ms-ExtF en el DNA de una cepa que sí integró la construcción en el locus deseado (B).

En el caso de las transformantes de *Trichoderma* obtenidas para sobre expresar cada gen, se seleccionaron 2 transformantes independientes, resistentes a higromicina (100µg/mL), y se realizaron tres pases monospóricos para cada una. Al término de los pases, se extrajo RNA de micelio creciendo activamente, para realizar síntesis de cDNA, y mediante RT-PCR, confirmar la sobreproducción de los mensajeros de cada uno de los genes seleccionados.

Para las transformantes de *Trichoderma* con la fusión a la proteína mCherry, se seleccionaron 2 transformantes independientes, resistentes a higromicina (100µg/mL), para cada una de las fusiones. Después de tres pases monospóricos para cada una, se extrajo RNA de micelio creciendo activamente, para posteriormente sintetizar cDNA y verificar mediante RT-PCR, la expresión del mensajero de la proteína mCherry.

Construcción de las fusiones de los dominios de translocación de las secuencias seleccionadas al gen reportero *gfp*.

El vector pAvr1b-GFP, donado por el Dr. Brett Tyler, se utilizó para generar las construcciones con los dominios de translocación de las secuencias seleccionadas y el gen codificante para la proteína verde fluorescente (GFP). Este vector tiene el dominio de translocación del efector Avr1b de *Phytophthora sojae* fusionado en fase al gen *gfp*, una etiqueta de histidinas (His) para la purificación de la proteína en columnas de níquel y una etiqueta de hemaglutinina (HA) ubicada entre el dominio de translocación y el marco de lectura abierto de GFP, además del promotor inducible por IPTG del gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7 (Dou *et al.*, 2008). Para los genes analizados por RT-PCR en tiempo real se diseñaron iniciadores para amplificar un fragmento de entre 180 y 300pb después del sitio de corte del péptido señal de secreción, tomando en consideración la ubicación del dominio de translocación RXLR o similar a éste para las secuencias de los genes *tvlysm1*, *epl2* y *tvhydi1*, y para amplificar el marco de lectura abierto completo del gen *tacfem1*. También se diseñaron iniciadores para amplificar un fragmento de 273pb del gen de actina de *T. atroviride*, que no codificara para alguna secuencia de aminoácidos RXLR o similares a éste, con el objetivo de tener un control negativo para los ensayos de entrada de la proteína a las raíces de soya; a este fragmento se le llamó “Neg”. El iniciador sentido se diseñó con un sitio de restricción para la enzima *Bgl*II, mientras que para el iniciador antisentido, dada la ubicación de la etiqueta de HA en el vector y la poca disponibilidad de sitios de restricción para llevar a cabo la construcción deseada, en 5’ se diseñó con la secuencia gacgtcatatggata, que corresponde a una parte de la etiqueta de HA y al sitio de restricción para la enzima *Aat*II (parte subrayada), de esta forma no se perdía la

etiqueta de HA al momento de hacer la construcción con los dominios de translocación de las secuencias de *Trichoderma*, ni el marco de lectura abierto de GFP (ver Apéndice B).

Con los iniciadores correspondientes, se amplificaron los fragmentos de los dominios de translocación de las secuencias seleccionadas, utilizando la enzima *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas); y se clonaron en el vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific), como indica el protocolo del fabricante, y se procedió a transformar células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α y se plaquearon en cajas Petri con medio LB-A (ampicilina 100 μ g/ml). Para el gen *tacfem1* se utilizó el vector de mantenimiento pCRII-TOPO (Life Technologies) debido a que con el vector pJET 1.2/blunt hubo dificultades posteriores para liberar y purificar el fragmento deseado. Mediante PCR en colonia y utilizando los iniciadores que amplifican los fragmentos correspondientes a los dominios de translocación, se corroboró la presencia del inserto en al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina. Se realizó extracción de plásmido mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001). Se hizo una digestión con las enzimas de restricción *AatII* (Thermo Scientific) y *BglIII* (Fermentas) de los plásmidos obtenidos y del vector pAvr1b-GFP, se analizaron las digestiones por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron las bandas correspondientes a los dominios de translocación de *tvlysm1* (222pb), *epl2* (213pb), *tvhydi1* (192pb), y el marco de lectura abierto de *tacfem1* (288pb), así como el vector pAvr1b-GFP (~4500pb) que liberó la región correspondiente al dominio de translocación de Avr1b al ser digerido con *BglIII* y *AatII*, y el fragmento Neg (273pb), siguiendo el protocolo del GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Una vez que se tuvieron los fragmentos y el vector purificados, se realizó una ligación con T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) del vector digerido pAvr1b-GFP, con cada uno de los dominios de translocación, el gen completo y el fragmento Neg, obteniendo los vectores pTvlysm1-GFP, pTacfem1-GFP, pEpl2-GFP, pTvhydii1-GFP y pNeg-GFP. Estas ligaciones se utilizaron para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 C43 (DE3), esta cepa tiene el gen que codifica para la RNA polimerasa del fago T7, lo cual la hace ideal para la expresión del vector que contiene GFP. Se verificaron al menos 3 colonias independientes de transformantes de *E. coli* resistentes a ampicilina/cloranfenicol (100µg/ml / 35µg/ml) mediante PCR en colonia, para asegurar la presencia del inserto correcto en la ligación. Se realizó extracción de plásmido de al menos 2 colonias positivas para cada construcción y se mandaron secuenciar para asegurar que el inserto hubiera quedado en fase y que el marco de lectura abierto de GFP y la secuencia de los dominios de translocación no estuvieran alterados.

Purificación de las proteínas quiméricas efector-gfp.

Para esta parte se siguieron los protocolos de inducción y purificación de proteínas reportados por Dou y col. (Dou *et al.*, 2008) y Gu y col. (Gu *et al.*, 2011) modificando las condiciones de inducción de las proteínas (0.05mM de IPTG, 20h de incubación a 37°C). Se prepararon preinóculos de las clonas de *E. coli* BL21 C43 (DE3) transformadas con los vectores pTvlysm1-GFP, pTacfem1-GFP, pEpl2-GFP, pTvhydii1-GFP, pNeg-GFP y pAvr1b-GFP en 25 ml de medio LB con cloranfenicol (35 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml), se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se inocularon 500ml de medio LB con 2.5ml de cada preinóculo y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 – 0.5 a 600nm. Una vez alcanzada esta densidad óptica, se indujeron los cultivos con

0.05mM de IPTG, dejando un cultivo sin inducir como control, y se incubaron 20h a 37°C. Se centrifugaron los cultivos a 13000 rpm por 30 minutos (centrifuga SIGMA). Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM, EDTA 50mM y DTT 100mM), calculando tener un volumen correspondiente al cuádruple del volumen de la pastilla; se agregó lisozima a una concentración final de 10mg/ml y se incubó por 30min a 4°C. Se utilizó un sonicador para romper las células con 4 ciclos de 10s. Se centrifugaron las muestras a 13000rpm por 30 minutos (centrifuga SIGMA). Se separaron los sobrenadantes y las pastillas y se cuantificó la cantidad de proteína presente en las muestras por el ensayo colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Una vez cuantificadas las muestras, se analizaron en geles de SDS-PAGE para verificar la inducción en la síntesis de las proteínas deseadas, en cada pozo se cargó la misma cantidad de proteína total (80µg).

Para purificar las proteínas se preparó una columna con 3ml de resina Ni-NTA (Quiagen) y se equilibró con 15ml de buffer de lisis. Se agregó el homogenado a la columna, hasta que entrara en la resina y se colectaron fracciones de aproximadamente 1ml en tubos eppendorf. Se agregó a la columna buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 20mM) y se colectaron las fracciones correspondientes de 1ml. Al final se hizo pasar el buffer de elución (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 250mM) por la columna y se colectaron las últimas fracciones de 1ml. Las fracciones obtenidas se analizaron en geles de SDS-PAGE al 12%, para determinar las fracciones en que se encontraban las proteínas de interés. Las fracciones ya purificadas, se concentraron en un evaporador Savant y se resuspendieron en buffer MES 25mM, pH 5.8, se cuantificaron nuevamente por el método de Lowry y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Ensayos de entrada de las proteínas a raíces de soya y plántulas de *A. thaliana*.

Para determinar la funcionalidad de los dominios de translocación presentes en nuestros candidatos, seguimos el protocolo ya reportado por Gu y col. (Gu *et al.*, 2011). Se germinaron semillas de soya en vermiculita hidratada, y se vernalizaron por un período de 2 días. Después del período de vernalización, se colocaron en una cámara de crecimiento para plantas (Growth Chamber modelo PGI-500H MRClab) con ciclos de luz/oscuridad de 16h/8h y 24°C de temperatura, dejando germinar las semillas por 4 días. Las raíces se lavaron con agua destilada, para eliminar restos de la vermiculita y se cortaron aproximadamente 2cm de la punta de la raíz. La raíz se colocó en un volumen de 100 - 150µl de la solución conteniendo 1mg/ml de la proteína de interés, y como control, se colocó una punta de raíz en buffer MES. Se incubaron las raíces toda la noche (12 a 15hr) a 28°C. Pasado el período de incubación las raíces se enjuagaron con agua destilada, y se lavaron por un período de 2hr en 75ml de agua destilada, en un agitador orbital a 120rpm. Las muestras fueron analizadas en el estereomicroscopio (Axio Zoom V16, Zeiss).

Se realizaron también ensayos de entrada de las proteínas quiméricas efector-gfp a raíces de *A. thaliana* de 12 días de edad, siguiendo el mismo protocolo que para las raíces de soya, pero en este caso se utilizaron las plántulas completas.

Prueba de hidrofobicidad de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen *tvhydii1*.

Para determinar la hidrofobicidad de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen *tvhydii1*, se tomaron bocados de igual tamaño de micelio de las cepas silvestre, $\Delta tvhydii1$ T2.1, $\Delta tvhydii1$ T2.3, *tvhydii1*OE T2 y *tvhydii1*OE T5 de *T. virens*, de 72h de crecimiento.

Sobre cada bocado se colocó una gota de 20µL de agua destilada, y se observó la permanencia de la gota sobre el micelio (Crutcher *et al.*, 2015).

Expresión de genes de defensa vegetal en plantas de A. thaliana.

Para determinar la participación del gen *twhydii1* en la inducción del sistema de defensa vegetal, se realizaron ensayos de interacción de cada una de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *twhydii1* de *T. virens* con la planta *A. thaliana*, como se describió anteriormente. A los 7, 9 y 12 días de confrontación, se congelaron las plántulas, y se hizo extracción de RNA y síntesis de cDNA. Se realizó un experimento con tres réplicas técnicas.

Mediante RT-PCR semicuantitativo, se determinó la expresión de los genes *pad3*, *sid2*, *pr5*, *pr1-b*, *pdf1.2*, *jin1* y *lox2*, que participan en la vía de defensa mediada por ácido salicílico (*sid2*, *pr5*, *pr1-b*), en la vía de defensa mediada por ácido jasmónico (*pdf1.2*, *jin1*, *lox2*), y en la biosíntesis de la fitoalexina camalexina (*pad3*). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min a 95°C, 25 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C y 30s de extensión a 72°C, y un tiempo final de 1min a 72°C. Todas las amplificaciones se realizaron con Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Life Technologies ®). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ 1.48V (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Como control de amplificación, y para normalizar la intensidad de las bandas en el análisis densitométrico, se emplearon iniciadores que amplifican un fragmento del gen que codifica para actina, *act11* (Huang *et al.*, 1997).

Para corroborar lo observado en el análisis semicuantitativo, se realizó un análisis por tiempo real, para verificar la expresión de los genes *pad3*, *sid2*, *pr5* y *pr1-b* a los 7 días de interacción únicamente. Se utilizó como templado el cDNA sintetizado a partir del RNA extraído del ensayo de interacción, y los resultados se analizaron mediante el método $\Delta\Delta C_t$, como se menciona anteriormente.

Confrontación de cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen tvhydi1 con el fitopatógeno R. solani.

Para determinar la participación del gen *tvhydi1* durante el micoparasitismo, se realizaron confrontaciones de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas con dos grupos de anastomosis de *R. solani*, AG2 y AG5. En placas de Petri conteniendo agar papa dextrosa, se colocaron en extremos opuestos de la caja, un bocado de micelio creciendo activamente de las cepas de *T. virens* y del grupo de anastomosis de *R. solani* correspondiente. Las cajas se incubaron a 28°C en total oscuridad durante 14 días. Se tomaron fotografías del frente y de la parte de debajo de las cajas a los 3, 4, 5, 7, 9, 12 y 14 días de confrontación.

Ensayo de colonización de raíces de tomate.

Para verificar la participación de la hidrofobina Tvhydi1 de *T. virens* durante la colonización de raíces, se colocaron semillas estériles de tomate en frascos conteniendo vermiculita. Después de 10 días de germinación, se inocularon 1×10^3 conidias de cada una de las cepas sobreexpresantes, mutantes nulas y silvestre de *T. virens*. Pasados 10 días de la inoculación de las conidias, se sacaron las plantas de tomate de los frascos, se separó la raíz de la parte aérea de cada planta, y las raíces se lavaron varias veces con agua destilada para

eliminar restos de vermiculita y de micelio adherido a la superficie de la raíz. Se extrajo DNA de las raíces de tomate, y se cuantificó utilizando un nanodrop.

Análisis por PCR semicuantitativo.

Para determinar la presencia de DNA proveniente del hongo en la raíz de tomate, se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento del gen *sm1* de *T. viresns*, y como control del DNA vegetal se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento del gen *apt* (900pb) que codifica para una adenina fosforiltransferasa (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008). Las condiciones de amplificación fueron como sigue: 3 min a 95°C, 25 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 58°C y 1min de extensión a 72°C, y un tiempo final de 2min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el análisis densitométrico se realizó utilizando el software ImageJ 1.48V (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Análisis por qPCR.

Para corroborar los resultados el análisis por PCR semicuantitativo, se llevó a cabo un análisis por tiempo real, utilizando los iniciadores para *sm1* para indicar la presencia de DNA del hongo, y como control del DNA vegetal se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento del gen *expressed*, reportado por Expósito-Rodríguez y col. (Expósito-Rodríguez *et al.*, 2008) como una secuencia expresada constitutivamente en tomate. Estos iniciadores amplifican un fragmento de aproximadamente 300pb, el cuál es más adecuado para utilizarse en qPCR. Los resultados fueron analizados por el método $\Delta\Delta C_t$, como se describe anteriormente.

Análisis estadístico.

Se realizó un ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar los resultados obtenidos de las mediciones de la raíz principal, los valores del análisis densitométrico de la expresión de las secuencias por RT-PCR y los valores obtenidos de la expresión por qRT-PCR, con un valor de significancia $p < 0.05$. Los datos de peso fresco, peso seco, del número de brotes laterales y de colonización de raíces de tomate se analizaron con un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar los resultados obtenidos, con un valor de significancia $p < 0.05$

Diseño de iniciadores.

Mediante los programas Primer Quest (Integrated DNA Technologies) y SnapGene (GSL Biotech, LLC) se diseñaron todos los iniciadores empleados en este trabajo. Para el diseño de la mayoría de los iniciadores las principales consideraciones que se tomaron en cuenta fueron: (I) contenido de GC mayor o igual al 50%; (II) longitud de 20 a 24 nucleótidos y (III) variación de la temperatura de alineamiento para cada par de iniciadores no mayor a 2°C entre ellos.

Para realizar la interrupción de cada una de las secuencias de interés, se diseñaron los juegos de iniciadores que se muestran en la Figura 6 y las secuencias específicas se muestran en el apéndice A.



Figura 6. Diagrama de los iniciadores diseñados para generar construcciones para interrumpir los genes seleccionados mediante PCR de doble unión.

El par de iniciadores F y R amplifican el marco de lectura abierto de los marcadores de selección (*hph* o *arg2*). Para el diseño de los iniciadores MutF, MutR, NestF y NestR se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones: (I) se seleccionaron al menos 1500pb río arriba y 1500pb río abajo de la secuencia que se iba a interrumpir; (II) se hizo una búsqueda manual en las regiones río arriba y río abajo seleccionadas con buenas características para el diseño de los iniciadores, y se obtuvieron las características como porcentaje de GC y temperatura de alineamiento con el programa Oligo Calc (Kibbe, 2007). Para diseñar los iniciadores quiméricos (QuimF y QuimR) éstos deben incluir una secuencia de nucleótidos complementaria al locus que se va a eliminar y otra a la secuencia del marcador de selección. Para el diseño de los iniciadores quiméricos con el marcador de selección *hph* se usaron las siguientes secuencias:

GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAGCA para el iniciador QuimR y
 CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG para el iniciador QuimF. Estas secuencias corresponden al extremo 5' y 3' del marcador de selección *hph*, respectivamente. Para el diseño de los iniciadores quiméricos con el marcador de selección *arg2* se usaron las siguientes secuencias:

GACCAAGGAGATTGACGGCGGC GTGGAGACGGT para el iniciador QuimR y TCGAGCCTGTTCCCTCTTGTCGGCTTTGCTTAA para el iniciador QuimF. Estas secuencias corresponden al extremo 5' y 3' del marcador de selección *arg2*, respectivamente.

Para el iniciador CherryQuimR utilizado en la construcción para fusionar los genes seleccionados a la proteína rojo fluorescente mCherry, se utilizó la siguiente secuencia: TACCACTCGTTCCCGCTCCTCCTATTGTAC, que corresponde al extremo 5' del marco de lectura abierto del gen que codifica para esta proteína.

RESULTADOS

Selección de las secuencias.

Con base en la lista de los posibles efectores de *Trichoderma* (Guzmán-Guzmán *et al.*, artículo sometido), se seleccionaron un total de 16 secuencias, tomando en cuenta que tuvieran un dominio de translocación RXLR o similar y que fueran representantes de cada una de las 7 principales familias en las que esta lista clasifica a los posibles efectores de *T. virens* y *T. atroviride*; los candidatos seleccionados se especifican en la Tabla 1.

CANDIDATOS A EFECTORES DE <i>Trichoderma</i>							
Especie	Gen	ID	Longitud (aa)	Dominio de translocación (aa)	Familia	Corte del péptido señal de secreción (aa)	Ubicación del dominio de translocación (aa)
<i>T. virens</i>	<i>tvlysm1</i>	149422	783	RGYR	Repetidos LysM	21	66-69
	<i>tvlysm2</i>	28703	440	RGYR	Repetidos LysM	21	66-69
	<i>tvtrx1</i>	111061	499	HTYK	Tioredoxina	21	98-101
	<i>tvsep1</i>	230947	879	HALR	Serin-proteasas	20	62-65
	<i>tvsep2</i>	11141	854	RRLR	Serin-proteasas	19	62-65
	<i>tvsep3</i>	217176	613	RALR	Serin-proteasas	23	33-36
	<i>tvhydi1</i>	49849	103	HGLR	Hidrofobinas	17	22-25
	<i>tvmp1</i>	86763	420	RLWR	Metaloproteasas	17	29-32
<i>T. atroviride</i>	<i>talysm1</i>	291370	443	RGYR	Repetidos LysM	24	69-72
	<i>tatrx1</i>	161155	340	KNLK	Tioredoxina	26	51-54
	<i>tatrx2</i>	139062	496	KELK	Tioredoxina	21	98-101
	<i>tacfem1</i>	302587	90	CFEM	Con el dominio CFEM	17	No Aplica
	<i>epl2</i>	88590	146	RSLR	Cerato-platanina	19	31-34
	<i>tasep1</i>	321810	885	HALR	Serin-proteasas	20	62-65
	<i>tasep2</i>	143106	858	RRLR	Serin-proteasas	19	62-65
	<i>tamp1</i>	314331	423	RLWR	Metaloproteasas	17	36-39

Tabla 1. Posibles moléculas tipo efector de *T. virens* y *T. atroviride* seleccionadas para este estudio.

Como se puede ver en la Tabla 1, los 16 genes seleccionados cubren características comunes a los efectores citoplasmáticos como son: un péptido señal para secreción, las proteínas predichas son de tamaño menor a 900aa y tienen un dominio de translocación RXLR o similar, excepto la secuencia *tacfem1*, que pertenece a la familia con el dominio CFEM, y hay por lo menos un miembro perteneciente a cada familia de posibles efectores

de *Trichoderma*. En la Tabla 1 se puede observar también que la ubicación de los posibles dominios de translocación se encuentra después del péptido señal para secreción.

Una vez seleccionados estos 16 genes, se ubicaron los posibles dominios de translocación indicados en la tabla 1 dentro del marco de lectura abierto de cada gen, mediante el programa SnapGene (GSL Biotech, LLC). Sin embargo, para algunos de éstos, incluidos los candidatos *tatrx2*, *tvsep1* y *tamp1*, no fue posible ubicar este dominio, debido probablemente a cambios en las secuencias anotadas de los genomas de *T. virens* y *T. atroviride*.

Como se verá más adelante en los resultados de este trabajo, los 16 genes son transcripcionalmente activos y 7 de ellos muestran un patrón de expresión reproducible durante la interacción con *A. thaliana*, por lo que se continuó trabajando con estos candidatos, aún cuando carecieran del dominio de translocación, considerando además que los efectores apoplásticos no contienen estos dominios (Hogenhout *et al.*, 2009; Kamoun, 2006, 2007; Schornack *et al.*, 2009).

Determinación del efecto de la presencia de Trichoderma sobre el crecimiento vegetal.

Para confirmar los efectos reportados sobre el desarrollo de las plantas (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) y establecer las condiciones de interacción para analizar la actividad transcripcional de los genes seleccionados, se realizaron ensayos de interacción de la cepa silvestre de *A. thaliana* con las cepas silvestres *T. virens* y *T. atroviride*, como control para comparación se emplearon plántulas creciendo axénicamente. En la Figura 7 se observan

las placas donde se llevaron a cabo las interacciones y sus respectivos controles, a los 3, 5 y 7 días de co-cultivo.

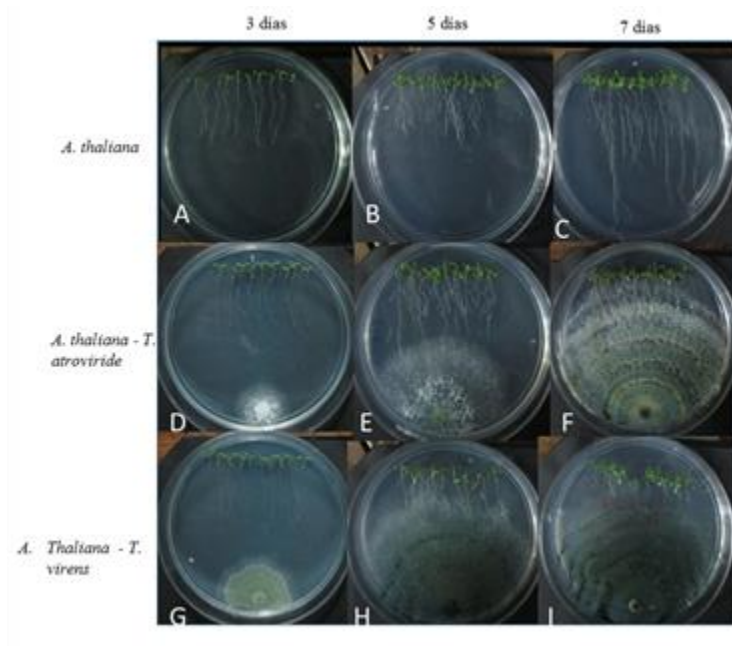


Figura 7. Ensayos de interacción *A. thaliana* – *Trichoderma*. (A-C) Placas control con plántulas de *A. thaliana* a los 3, 5 y 7 días después de la inoculación (ddi). (D-F) Placas de confrontación de *A. thaliana* con *T. atroviride* a los 3, 5 y 7 ddi. (G-I) Placas de confrontación de *A. thaliana* con *T. virens*, a los 3, 5 y 7 ddi.

Para determinar el efecto de la presencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetal, se midió la longitud de la raíz principal de la planta a los 3, 5 y 7 días de interacción con ambas especies de hongos, y de las plantas creciendo solas. En las plántulas a los 7 días de interacción se contó el número de brotes laterales para cada una de las condiciones y se tomaron datos de peso fresco y peso seco para determinar el efecto sobre la biomasa. Los resultados obtenidos del efecto sobre el crecimiento vegetal se muestran en la Figura 8.

Se observó que a los 3 días de interacción no hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$) en la longitud de la raíz principal de las plántulas en interacción con *Trichoderma* en comparación con las plántulas control. A los 5 días de confrontación, se observó una

diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la longitud de la raíz principal de las plántulas control en comparación con las plántulas creciendo con *T. virens* y *T. atroviride*; mientras que la longitud de la raíz principal de las plántulas en interacción con *T. virens* fue de $2.07\text{cm} \pm 0.25$ y para las plántulas en interacción con *T. atroviride* fue de $2.30\text{cm} \pm 0.32$, la longitud de la raíz principal de las plántulas creciendo solas fue de $2.80\text{cm} \pm 0.98$. A los 7 días de interacción, también se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la longitud de la raíz principal de las plántulas control en comparación con las plántulas creciendo con *T. virens* y *T. atroviride*. En este caso, la longitud de la raíz principal de las plántulas control fue de $3.70\text{cm} \pm 1.47$, para las plántulas en interacción con *T. virens* fue de $2.30\text{cm} \pm 0.32$ y para las plántulas en confrontación con *T. atroviride* fue de $2.32\text{cm} \pm 0.26$ (Figura 8A) Estos resultados coinciden con los reportados previamente (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009).

El efecto de la presencia de *Trichoderma* sobre el número de brotes laterales secundarios en la raíz principal de *A. thaliana* a los 7 días de interacción se aprecia en la Figura 8B. El número de brotes laterales secundarios presentes en la raíz de las plántulas control de *A. thaliana* fue significativamente menor (0.33 brotes ± 0.55 ; $p < 0.001$) en comparación con el número de brotes presentes en las plántulas en interacción con *T. virens* (2.13 brotes ± 1.4) y con *T. atroviride* (1.90 brotes ± 1.15).

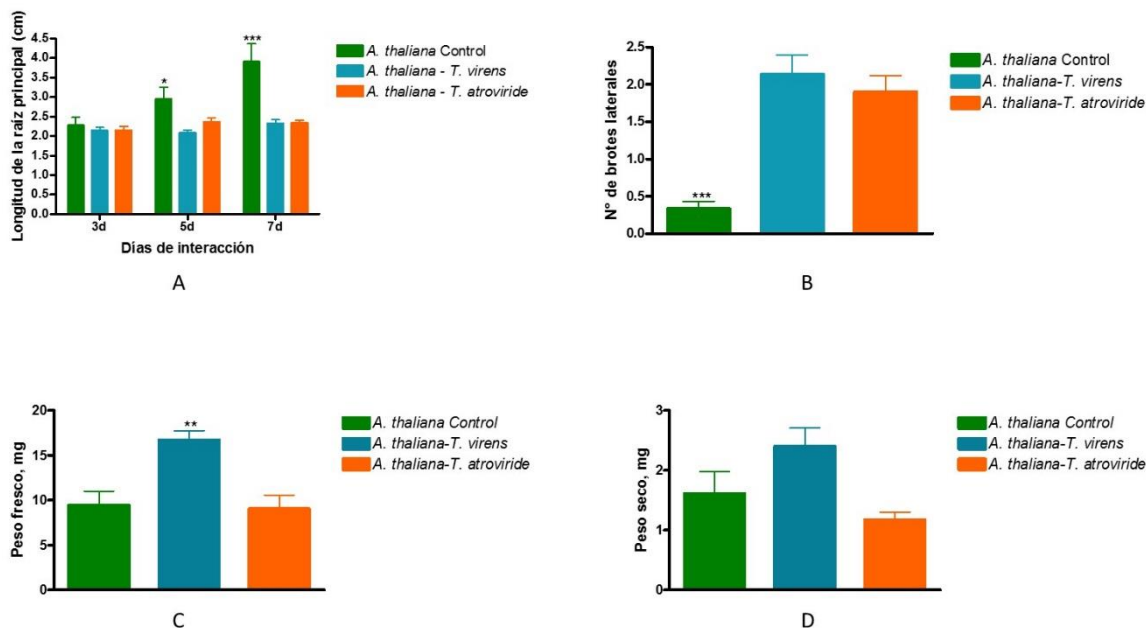


Figura 8. Efecto de la presencia de *Trichoderma* sobre el crecimiento de *A. thaliana*. A, longitud de la raíz principal a los 3, 5 y 7 días de interacción. B, número de brotes laterales secundarios a los 7 días de interacción. C, peso fresco a los 7 días de interacción. D, peso seco a los 7 días de confrontación. En A y B se grafica el promedio de las mediciones de 30 plántulas para cada una de las condiciones. En C y D se grafica el promedio de las mediciones de 90 plántulas para cada una de las condiciones. Para A, se realizó un ANOVA de dos vías; para B, C y D se realizó un ANOVA de una vía. Los datos se compararon con una prueba *post hoc* de Bonferroni, con un valor de significancia $p < 0.05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Las observaciones anteriores sugieren que la presencia de *Trichoderma* representa una barrera para el crecimiento en longitud de la raíz principal de *Arabidopsis*, no así para el desarrollo de brotes secundarios en la raíz. Este efecto concuerda con lo observado en otros estudios (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009) donde indican que *Trichoderma* es capaz de producir compuestos tipo auxina que favorecen el desarrollo de los brotes laterales.

En la Figura 8C y D se aprecia el efecto de *Trichoderma* sobre la biomasa (peso fresco y peso seco) de *A. thaliana* a los 7 días de interacción. Se observó una diferencia significativa ($p < 0.01$, Figura 8C) en el peso fresco de las plántulas en interacción con *T. virens* ($16.70\text{mg} \pm 2.92$) en comparación con las plántulas control ($9.45\text{mg} \pm 4.39$), mientras que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las plántulas en interacción con *T.*

atroviride (9.05mg \pm 4.32) y las plántulas creciendo solas. Sin embargo, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$, Figura 8D) en cuanto al peso seco entre las plántulas control (1.62mg \pm 1.1) y las plántulas en confrontación con *T. virens* (2.40mg \pm 0.92), o las plántulas en co-cultivo con *T. atroviride* (1.18mg \pm 0.38), a diferencia de lo que se ha reportado (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), donde muestran un aumento significativo de la biomasa en las plántulas de *A. thaliana* en co-cultivo con *Trichoderma*.

Análisis de la expresión de los genes seleccionados durante la interacción Arabidopsis – Trichoderma mediante RT-PCR semicuantitativo.

Para determinar la actividad transcripcional de los genes seleccionados, se realizaron ensayos de interacción de la cepa silvestre de *A. thaliana* con las cepas silvestres *T. virens* y *T. atroviride*, como fue descrito anteriormente; en la Figura 9 se muestran fotografías representativas de uno de los experimentos realizados. Se realizó un primer experimento de confrontación, en el cual el micelio se colectó a los 5 días de interacción, con la finalidad de determinar de manera preliminar la expresión de las 16 secuencias seleccionadas, a este experimento se le denominó Experimento 1. Después de este experimento, se llevaron a cabo 4 cinéticas de interacción, donde el micelio de *Trichoderma* se colectó a los 3, 5 y 7 días, como se indica en la sección de materiales y métodos, a estas cinéticas se les denominó Experimentos 2, 3, 4 y 5. Para determinar los patrones de expresión de las secuencias seleccionadas durante la interacción con *Arabidopsis*, se hicieron reacciones de RT-PCR semicuantitativo tomando como templado cDNA proveniente del micelio del hongo creciendo en interacción con la planta (condición de interacción) o micelio del hongo creciendo solo (condición control). Para validar los ensayos, se utilizó como control la expresión de los genes *sm1* de *T. virens* y *epl1* de *T. atroviride*, los cuales se sabe que

incrementan su expresión cuando estos hongos se encuentran en interacción con plantas (Djonović *et al.*, 2006; Seidl *et al.*, 2006).

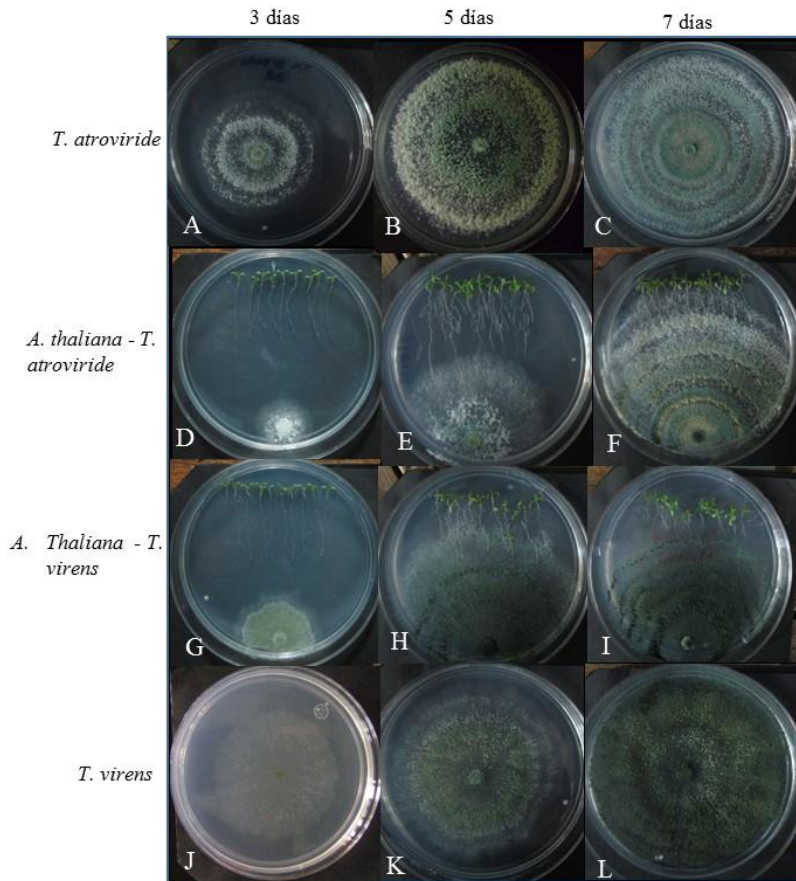


Figura 9. Cinéticas de interacción *A. thaliana* – *Trichoderma*. A-C, placas control de *T. atroviride* a los 3, 5 y 7 días de crecimiento. D-F, placas de confrontación *A. thaliana* – *T. atroviride* a los 3, 5 y 7 días de interacción. G-H, placas de confrontación *A. thaliana* – *T. virens* a los 3, 5 y 7 días. J-K, placas control de *T. virens* a los 3, 5 y 7 días de crecimiento.

En la Figura 10 se muestran los resultados del RT-PCR semicuantitativo correspondientes al experimento 3, donde se puede observar que todos los genes seleccionados, tanto para *T. virens* (Figura 10A izquierda) como para *T. atroviride* (Figura 10A derecha) son transcripcionalmente activos durante la interacción.

Para determinar cuáles de las secuencias seleccionadas tenían un mayor nivel de expresión durante la interacción con *Arabidopsis*, se realizó un análisis densitométrico para los resultados obtenidos del RT-PCR semicuantitativo para los 5 experimentos. La Figura 10B muestra los datos del análisis densitométrico de las bandas obtenidas para la amplificación de cada uno de los genes candidatos de *T. virens* y para *sm1* a los 3, 5 y 7 días de interacción con la planta. La Figura 10C representa los niveles de expresión para los candidatos de *T. atroviride* y para *epl1*.

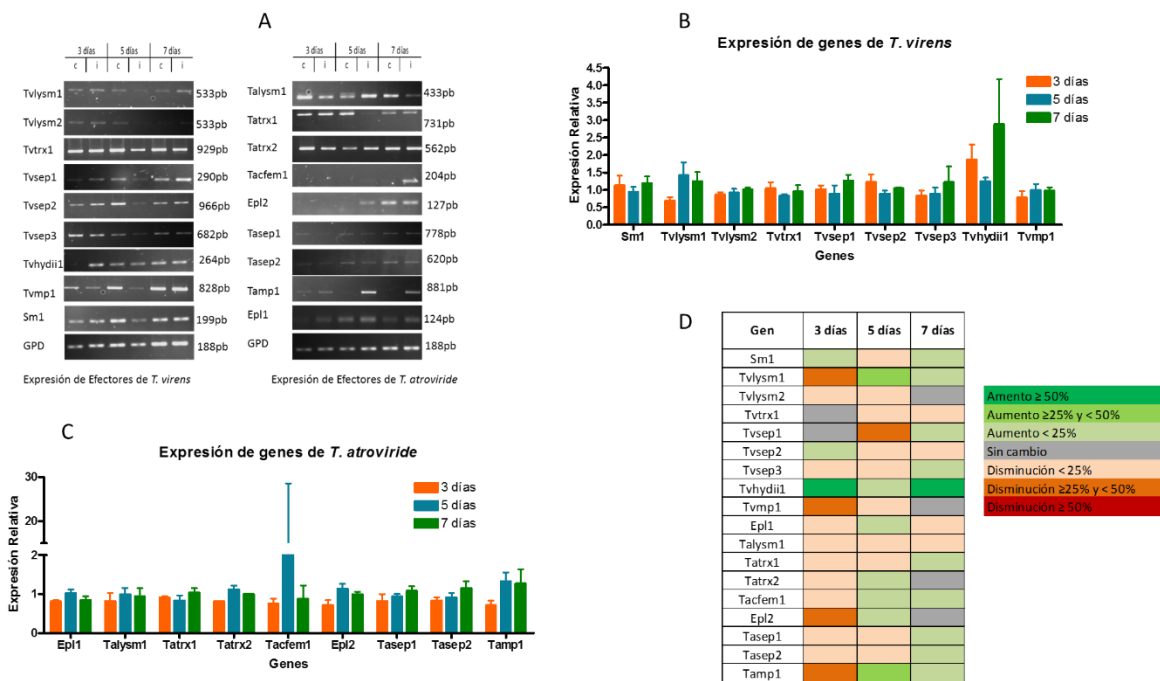


Figura 10. Análisis de la expresión de los genes candidatos a efector de *Trichoderma* durante la interacción con *A. thaliana*. A, RT-PCR semicuantitativo correspondiente al experimento de interacción número 3 de los genes seleccionados de *T. virens* (izquierda) o de *T. atroviride* (derecha) a los 3, 5 y 7 días de interacción (columnas marcadas con la letra “i”) respecto del control (columnas marcadas con la letra “c”). B, expresión relativa de los genes seleccionados de *T. virens* a los 3, 5 y 7 días de interacción con *A. thaliana*, respecto del hongo creciendo solo. C, expresión relativa de los genes seleccionados de *T. atroviride* a los 3, 5 y 7 días de confrontación con *A. thaliana*, respecto del hongo creciendo solo. D, Cuadro representativo del patrón de expresión de las secuencias seleccionadas durante la interacción *Trichoderma* – *Arabidopsis*. Las gráficas representan los datos de los 5 experimentos de confrontación realizados.

Para facilitar la selección de los genes con los que seguiríamos trabajando para llevar a cabo la cuantificación de la expresión mediante qRT-PCR y la caracterización funcional, se

conjuntaron los datos densitométricos obtenidos de los cinco experimentos, los cuales se resumen en la Figura 10D. Se seleccionaron los candidatos *tvlysm1*, *tacfem1*, *tvhydi1* y *tamp1*, debido a que aumentaron su expresión respecto del control en al menos 2 tiempos de la interacción (Figura 10B, C y D), así como los candidatos *tatrx2*, *epl2* y *tvsep1*, que incrementaron su expresión en un tiempo de interacción y no mostraron cambio en el patrón de expresión respecto del control en al menos 2 tiempos de la interacción (Figura 10B, C y D). Adicionalmente, los siete genes fueron seleccionados en base a que mostraron un patrón de expresión más reproducible durante los experimentos realizados. El resto de los candidatos no fueron considerados para su análisis mediante RT-PCR en tiempo real.

Determinación del patrón de expresión de los genes seleccionados durante la interacción Arabidopsis – Trichoderma mediante RT-PCR cuantitativo.

Para validar de manera cuantitativa los niveles de expresión de los siete candidatos descritos previamente, se realizó un análisis por RT-PCR en tiempo real (ver materiales y métodos). En la Figura 11 se observan los resultados del análisis cuantitativo para las 7 secuencias seleccionadas de *Trichoderma*, donde los valores de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ representan el cambio en el nivel del mensajero correspondiente a cada gen con respecto al control, al cual se le asigna un nivel de 1, marcado con una línea roja, los valores estadísticamente significativos ($p < 0.5$) por debajo de esta línea indican una disminución en los niveles detectados del transcrito de cada gen, mientras que los valores estadísticamente significativos por arriba de esta línea representan un aumento en el nivel de mensajero (Livak & Schmittgen, 2001).

Como se puede ver en la Figura 11A, no hubo diferencia significativa ($p > 0.5$) en los niveles del transcrito del gen *tvlysm1* a los 3 y 5 días de interacción (0.67 ± 0.03 , 0.90 ± 0.15 , respectivamente), con respecto al control, sin embargo, a los 7 días de interacción hubo un incremento significativo ($p < 0.001$) de 2.07 ± 0.52 veces con respecto al control. Para el gen *tvsep1* de *T. virens*, no hubo un cambio significativo ($p > 0.5$) en el nivel de expresión a los 3 días de interacción (1.03 ± 0.03), pero sí se observó un aumento significativo ($p < 0.001$) en el nivel del transcrito correspondiente a los 5 días de interacción de 1.69 ± 0.15 veces con respecto del control, así como de 5.69 ± 0.36 a los 7 días de interacción (Figura 11B).

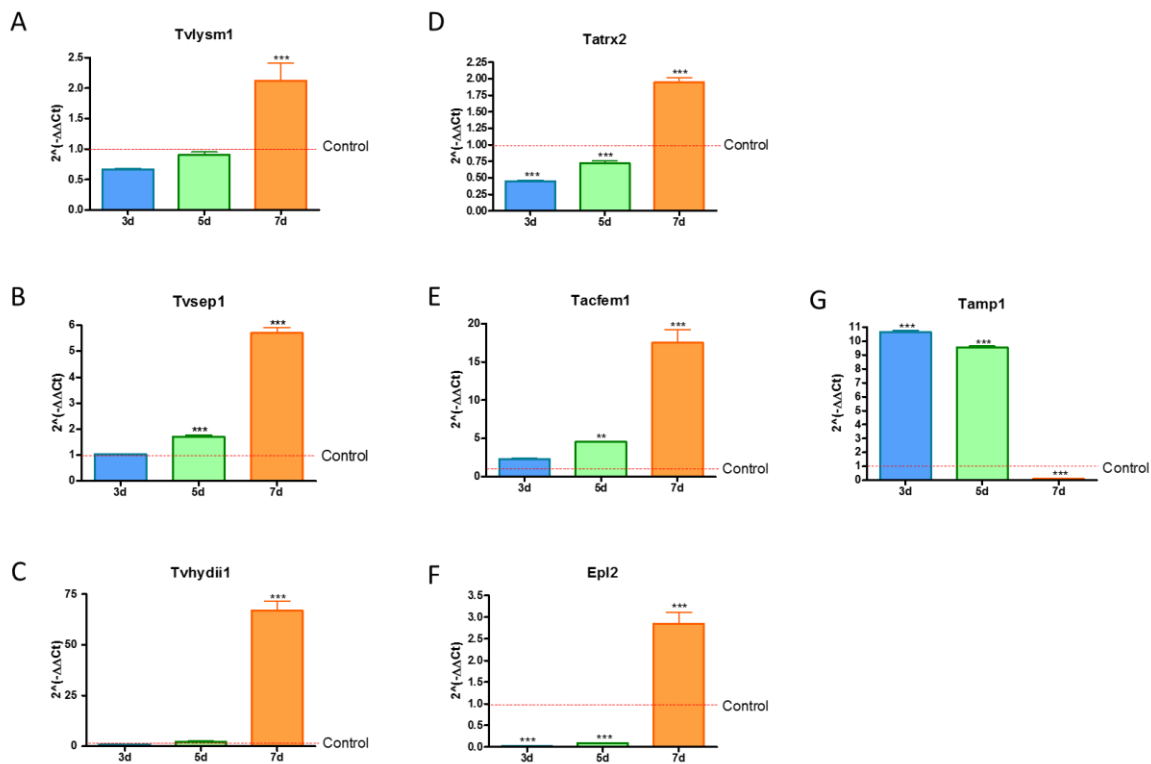


Figura 11. RT-PCR cuantitativo de los niveles de expresión de los 7 genes seleccionados a los 3, 5 y 7 días de la interacción de *Trichoderma* con *A. thaliana*. A-C, Nivel de expresión para los genes *tvlysm1*, *tvsep1* y *tvhydi1*, respectivamente, de *T. virens*. D-G, Nivel de expresión para los genes *tatrx2*, *tacfem1*, *epi2* y *tamp1*, respectivamente, de *T. atroviride*. Línea roja, valor de 1 de la condición control (hongo creciendo solo). Los

datos se analizaron con un ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni y un valor de significancia $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (1 réplica biológica con 3 réplicas técnicas, Experimento 3).

En la Figura 11C se observa que no hubo una diferencia significativa ($p > 0.5$) en el nivel del transcrito del gen *tvhydi1* con respecto del control a los 3 y 5 días de interacción (1.00 ± 0.03 , 2.3 ± 0.36 , respectivamente), pero sí se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) a los 7 días de interacción con la planta de 66.65 ± 7.74 veces.

En la Figura 11D se observa que a los 3 y 5 días de interacción, el transcrito del gen *tatrx2* disminuyó su nivel con respecto al control de manera significativa ($p < 0.001$) a 0.45 ± 0.03 y 0.72 ± 0.06 veces, respectivamente, mientras que a los 7 días de interacción hubo un aumento significativo ($p < 0.001$) de 1.95 ± 0.12 veces. En la Figura 11E se observa que el mRNA del gen *tacfem1* no presentó un cambio significativo ($p > 0.5$) a los 3 días de interacción con *A. thaliana* (2.32 ± 0.11), sin embargo, sí tuvo un aumento significativo a los 5 días (4.58 ± 0.08 , $p < 0.01$) y a los 7 días (17.35 ± 2.93) de interacción, con respecto del control. El transcrito de *epl2* disminuyó su nivel de manera significativa ($p < 0.001$) con respecto al control a los 3 y 5 días de interacción con la planta (0.03 ± 0.00 , 0.09 ± 0.02 , respectivamente; Figura 11F), mismo que aumentó a los 7 días de la interacción 2.83 ± 0.45 veces ($p < 0.001$). Para el gen *tamp1*, se observa en la Figura 11G que aumentó el nivel del transcrito correspondiente a los 3 y 5 días de interacción (10.64 ± 0.25 , 9.57 ± 0.14 , respectivamente; $p < 0.001$) con respecto al control, mientras que, a los 7 días de interacción, disminuyó a 0.08 ± 0.04 del nivel del control ($p < 0.001$).

Como se puede notar en la Figura 11, los niveles de transcrito de los genes seleccionados incrementaron de manera significativa con respecto del control al séptimo día de la interacción, excepto el gen *tamp1* (Figura 11G) cuya acumulación disminuyó de manera significativa en los tiempos más largos de interacción.

Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes y verificación de las transformantes.

Para determinar la posible función biológica de los genes seleccionados, a partir de los datos del qRT-PCR, se planteó obtener cepas mutantes para estos 7 genes. Para cumplir con este objetivo, se generaron construcciones para interrumpir los genes *tvlysm1*, *tvsep1*, *tvhydi1*, *tacfem1*, *epl2*, *tatr2* y *tamp1* por el método de PCR de doble unión (ver detalles en materiales y métodos). En la Figura 12A se muestra la amplificación de los extremos río arriba y río debajo del marco de lectura abierto correspondiente a los genes *tvhydi1*, *tacfem1* y *epl2*, así como del marco de lectura abierto de los marcadores de selección *hph* y *arg2* (Figura 1, PCR1 doble unión). Para el gen *tvhydi1*, los tamaños de los fragmentos que se amplificaron en la PCR1 fueron de 1999pb para el extremo río arriba y de 2004pb para el extremo río abajo (Figura 12A, carriles 1 y 2). Para el gen *tacfem1*, se amplificó un fragmento río arriba de 2206pb, mientras que el fragmento que se amplificó río abajo es de 2153pb (Figura 12A, carriles 4 y 5). Los tamaños de los fragmentos que se amplificaron en la PCR1 para el gen *epl2* son de 2062pb para el extremo río arriba y de 2058pb para el extremo río abajo (Figura 12A, carriles 7 y 8). El marcador de selección *arg2* tiene un tamaño de 2745pb (Figura 12A, carril 3) y el marcador de selección *hph* es de 1397pb (Figura 12A, carriles 6 y 9). Estos fragmentos se purificaron por columna y se utilizaron como templado para la reacción PCR2 de doble unión (Figura 2, PCR2 doble unión).

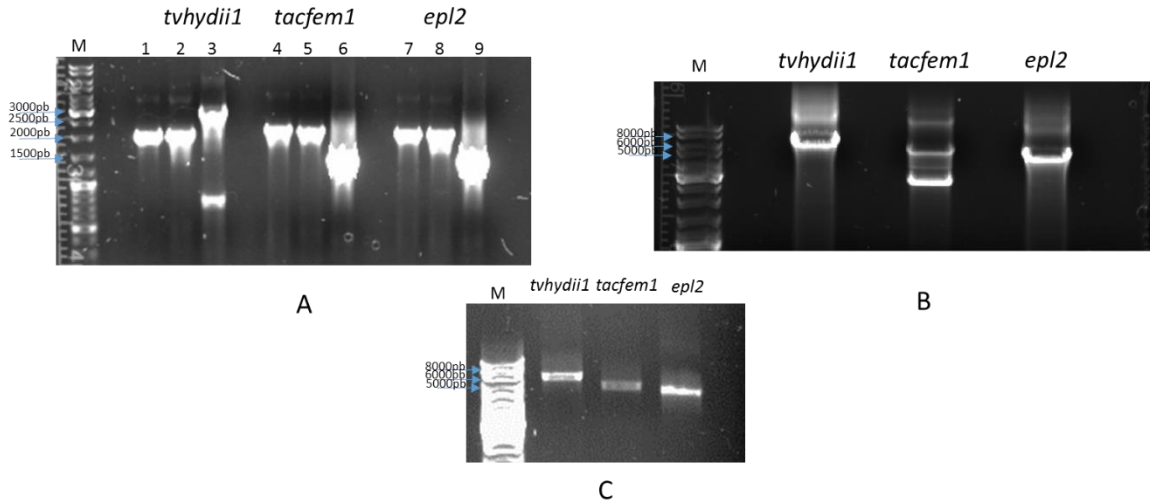


Figura 12. Construcción de los casetes de interrupción para generar mutantes nulas en los genes *tvhydii1*, *tacfem1* y *epl2*. A, Productos de PCR de los extremos río arriba y río abajo del locus de los genes *tvhydii1* (carriles 1 y 2), *tacfem1* (carriles 4 y 5) y *epl2* (carriles 7 y 8) y del marco de lectura abierto de los marcadores de selección *arg2* (carril 3) y *hph* (carriles 6 y 9). B, Amplificación del casete de interrupción para los genes *tvhydii1*, *tacfem1* y *epl2*. C, Fragmentos purificados correspondientes al casete de interrupción para los genes *tvhydii1*, *tacfem1* y *epl2*. M, marcador de peso molecular.

En la Figura 12B se observa la amplificación del casete de interrupción para los genes *tvhydii1* (6050pb), *tacfem1* (5333pb) y *epl2* (4995pb) como productos de la PCR3 de doble unión (Figura 3), los cuales se purificaron por columna y se verificó el tamaño correcto para cada uno de ellos (Figura 12C). Con estas construcciones se transformaron protoplastos de *T. virens* y de *T. atroviride* (ver detalles en materiales y métodos). Para el gen *tvsepl1* de *T. virens* no fue posible la construcción del casete de interrupción, ya que no se obtuvo amplificación con los iniciadores Nest, los cuales fueron diseñados dos veces para este gen, por lo que no se realizaron transformaciones para interrumpir este gen.

De las transformantes obtenidas para los 6 genes seleccionados, se extrajo DNA genómico y se verificó que la construcción correspondiente se hubiera insertado en el locus deseado, como se describe en la sección de materiales y métodos de este trabajo (Figura 5).

Para el gen *tatrx2*, se obtuvieron 34 transformantes independientes. La Figura 13A muestra las amplificaciones obtenidas por PCR donde se confirma la inserción del casete de interrupción en el locus del gen *tatrx2* para tres de las transformantes. La amplificación que se observa en los carriles 1 se obtuvo utilizando un iniciador que se encuentra en el extremo 5' del gen, que no está dentro de la construcción y un iniciador contenido en la secuencia del marcador de selección (2276pb), mientras que la amplificación que se observa en los carriles 2 se obtuvo con un iniciador en el extremo 3' del gen, que no está dentro de la construcción y un iniciador dentro del marcador de selección (2563pb), por lo tanto la amplificación de estos dos fragmentos indica la inserción del casete de interrupción en el locus del gen *tatrx2*. Como control negativo de la inserción en el sitio deseado, se utilizó un iniciador en el extremo 5' del gen, ubicado fuera de la construcción y un iniciador contenido en el marco de lectura abierto del gen que amplifican un fragmento de 3092pb, así como un iniciador hacia el extremo 3' del gen y un iniciador ubicado dentro del marco de lectura abierto del gen *tatrx2*, que amplifican un fragmento de 3398pb, esta amplificación es la que se muestra en los carriles 3 y 4, respectivamente, e indica que aún hay núcleos no transformados. Se seleccionaron las transformantes 6, 7 y 11 para realizar por lo menos cuatro rondas de pases monospóricos para asegurarse de que no hubiera mezcla de núcleos sin transformar, para después corroborar la pérdida del gen de interés en las cepas seleccionadas.

Para el gen *tacfem1*, se obtuvieron 45 transformantes independientes. La Figura 13B muestra las amplificaciones obtenidas por PCR confirmando la inserción del casete de interrupción en el locus del gen para tres de las transformantes. La amplificación que se observa en los carriles 1 (2374pb) y 2 (2303pb) corresponde a los fragmentos que indican

la inserción del casete de interrupción en el locus deseado, mientras que las amplificaciones que se muestran en los carriles 3 (2575pb) y 4 (2464pb) corresponden a la amplificación de los extremos 5' y 3', respectivamente, del locus del gen *tacfem1*, como controles negativos de la inserción del casete de interrupción. Se seleccionaron las transformantes 4, 5 y 6 para llevar a cabo pases monospóricos y asegurarse que no hubiera núcleos sin transformar, para después corroborar la pérdida del gen en las cepas seleccionadas.

Se obtuvieron 50 transformantes independientes para el gen *epl2*. La Figura 13C muestra la confirmación de la inserción del casete de interrupción en el locus del gen para dos de las transformantes. La amplificación que se observa en los carriles 1 (2205pb) y 2 (2228pb) corresponde a los fragmentos que indican la inserción del casete de interrupción en el locus del gen *epl2*, mientras que las amplificaciones que se muestran en los carriles 3 (2653pb) y 4 (2300pb) corresponden a la amplificación de los extremos 5' y 3' respectivamente, del locus del gen *epl2*, como controles negativos de la inserción del casete de interrupción. Se seleccionaron las transformantes 1, 2 y 3 para realizar rondas de pases monospóricos y corroborar la pérdida del gen de interés en las cepas seleccionadas.

Para el gen *tamp1*, se obtuvieron 6 transformantes independientes. La Figura 13D muestra las amplificaciones obtenidas por PCR, confirmando la inserción del casete de interrupción en el locus del gen para tres de las transformantes. La amplificación que se observa en los carriles 1 (2364pb) y 2 (2326pb) corresponde a los fragmentos que indican la inserción del casete de interrupción en el locus deseado. Como control negativo de la inserción, las amplificaciones que se muestran en los carriles 3 (3342pb) y 4 (3477pb) corresponden a la amplificación de los extremos 5' y 3' respectivamente, del locus del gen *tamp1*. Se

seleccionaron las transformantes 1, 2 y 6 para realizar por lo menos 4 pases monospóricos, y verificar la pérdida del gen *tamp1* en las cepas seleccionadas.

Para el gen *tvhdyi1*, se obtuvieron 12 transformantes. La Figura 13E muestra las amplificaciones obtenidas por PCR para dos de las transformantes, donde se muestran las amplificaciones en los carriles 1 (1863pb) y 2 (2184pb), indicando la inserción del casete de interrupción en el locus del gen *tvhdyi1*. Como control negativo de la inserción en el sitio deseado, se muestran las amplificaciones de los extremos 5' y 3' del locus del gen en los carriles 3 (2559pb) y 4 (2234pb) respectivamente. Se seleccionaron las transformantes 2.1 y 2.3 para realizar 4 pases monospóricos, y verificar que el gen *tvhdyi1* ya no se encuentra presente en las cepas seleccionadas.

Para el gen *tvlysm1*, se obtuvieron únicamente 2 transformantes, sin embargo, no se pudo confirmar la inserción del casete de interrupción correctamente, pues no se pudo obtener una amplificación para el extremo 3' de la construcción en el locus del gen. En experimentos posteriores se confirmó que los iniciadores diseñados en la región 3' y río abajo del marco de lectura abierto del gen a partir de la secuencia reportada hasta el momento ('JGI Fungi Portal - Home', n.d.) no producen amplificación.

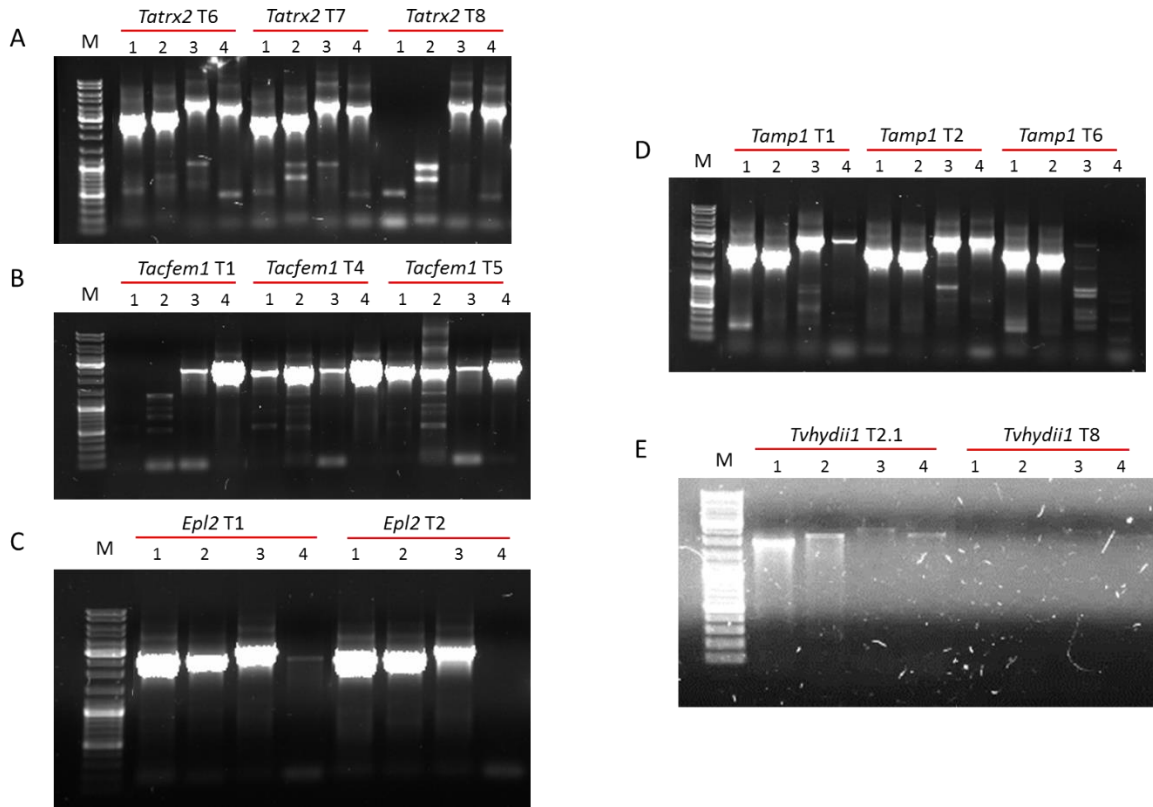


Figura 13. Confirmación de la inserción de los casetes de interrupción en el locus de los genes seleccionados. A, verificación de la inserción del casete de interrupción en tres transformantes del gen *tatr2*; B, inserción del casete de interrupción en tres transformantes del gen *tacfem1*; C, confirmación del casete de interrupción en el locus del gen *epl2*; D verificación del casete de interrupción para el gen *tamp1*; E, confirmación del casete de interrupción en el locus del gen *tvhydi1*. Carriles 1, amplificación del fragmento del extremo 5' de la construcción en el locus de cada gen. Carriles 2, amplificación del extremo 3' de la construcción en el locus de cada gen. Carriles 3, amplificación del fragmento 3' del locus de cada gen. Carriles 4, amplificación del fragmento 5' del locus de cada gen. M, marcador de peso molecular.

Fusiones de los posibles dominios de translocación de genes seleccionados al gen reportero gfp.

Para determinar la posible localización de los candidatos a efectores seleccionados, se planteó probar si los dominios RXLR o similares, presentes en estos productos eran capaces de dirigirlos al tejido vegetal. Se utilizó la base de datos del Joint Genome Institute para obtener la secuencia completa de los 7 genes seleccionados como candidatos a moléculas tipo efector de *Trichoderma*, mediante el programa SnapGene (GSL Biotech, LLC) se ubicó el dominio de translocación indicado en la Tabla 1. En el caso de las secuencias

correspondientes a los genes *tatrx2* y *tvsep1* los aminoácidos que conforman el dominio de translocación para estas proteínas putativas no se encontró hacia el N-terminal, sino hacia el C-terminal, mientras que para el gen *tamp1* no se encontró la secuencia de aminoácidos predicha, por lo que no realizó fusión al gen reportero *gfp* para estos candidatos (ver Apéndice D para la secuencia completa de cada gen).

Para realizar la fusión de los dominios de translocación de los genes seleccionados, se tomó como base el trabajo reportado por Dou y col. (Dou *et al.*, 2008), donde realizan la fusión de 33 aminoácidos, que incluyen el dominio de translocación de la proteína Avr1b del oomiceto *Phytophthora sojae*, al gen reportero *gfp*, tal como se describe en la sección de materiales y métodos (ver Apéndice B para mapa del vector). En la Figura 14 se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína Avr1b, de los genes *tvlysm1*, *epl2*, *tvhydi1* y *tacfem1* y de la secuencia ‘Neg’, correspondiente al gen de actina *T. atroviride*, como un control negativo, que se utilizaron para fusionar al gen reportero *gfp*, cabe destacar que se decidió fusionar en su totalidad el marco de lectura abierto para el gen *tacfem1*, pues carece de un dominio de translocación y codifica para una proteína de tamaño pequeño (89 aminoácidos).

Se amplificaron los fragmentos correspondientes a las regiones señaladas en la Figura 14 para los genes seleccionados, a partir de cDNA de *T. virens* (*tvlysm1* y *tvhydi1*) o de *T. atroviride* (*epl2*, *tacfem1* y Neg). En la Figura 15A se muestran los productos amplificados para fusionar a *gfp* de los genes *tvhydi1* (carril 1, 192pb), *epl2* (carril 3, 213pb) y *tacfem1* (carril 2, 288pb). Los fragmentos se clonaron en el vector de mantenimiento pJET 1.2/Blunt para su digestión con las enzimas de restricción *BglIII* y *AatII*, como se menciona en la sección de materiales y métodos. En la Figura 15B se muestra la purificación de los

fragmentos *tvhydi1*, *epl2* y del vector pAvr1b-GFP linearizado. En esta parte del trabajo ya no se continuó con la fusión para el gen *tacfem*, pues no se logró obtener la liberación del fragmento correspondiente con las enzimas *Bgl*III y *Aat*II del vector de mantenimiento pJET 1.2/Blunt, pero se siguió con los otros candidatos.

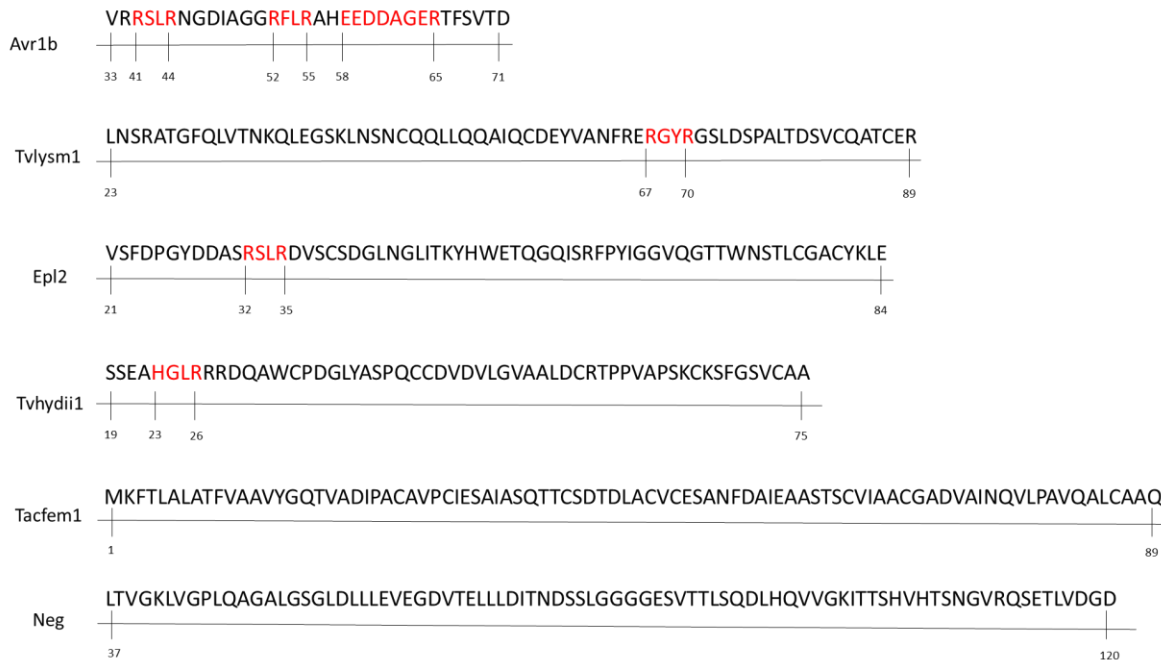


Figura 14. Secuencias de aminoácidos fusionadas al gen reportero *gfp* en el trabajo realizado por Dou y col. (Dou *et al.*, 2008), -Avr1b parte superior- y en este trabajo (secuencias *tvlysm1*, *epl2*, *tvhydi1*, *tacfem1* y Neg). En rojo se resalta el grupo de aminoácidos que corresponden al dominio de translocación y los números indican la ubicación de cada residuo. Para la secuencia Neg se tomaron 84 aminoácidos de la secuencia parcial codificante (cds) para el gen de actina de *T. atroviride*, con número de acceso EF581847.1 en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Una vez purificados los fragmentos, se ligaron con el vector para obtener cada una de las fusiones al gen reportero *gfp*. Con los productos de las ligaciones se transformaron células de *E. coli* BL21 C43 (DE3) y mediante PCR en colonia se verificó la presencia de los vectores en al menos 4 colonias independientes para cada fusión. En la Figura 15C se muestra la confirmación de la presencia de las fusiones correspondientes a *gfp* para los genes *tvhydi1* y *epl2* en 15 colonias independientes para cada uno.

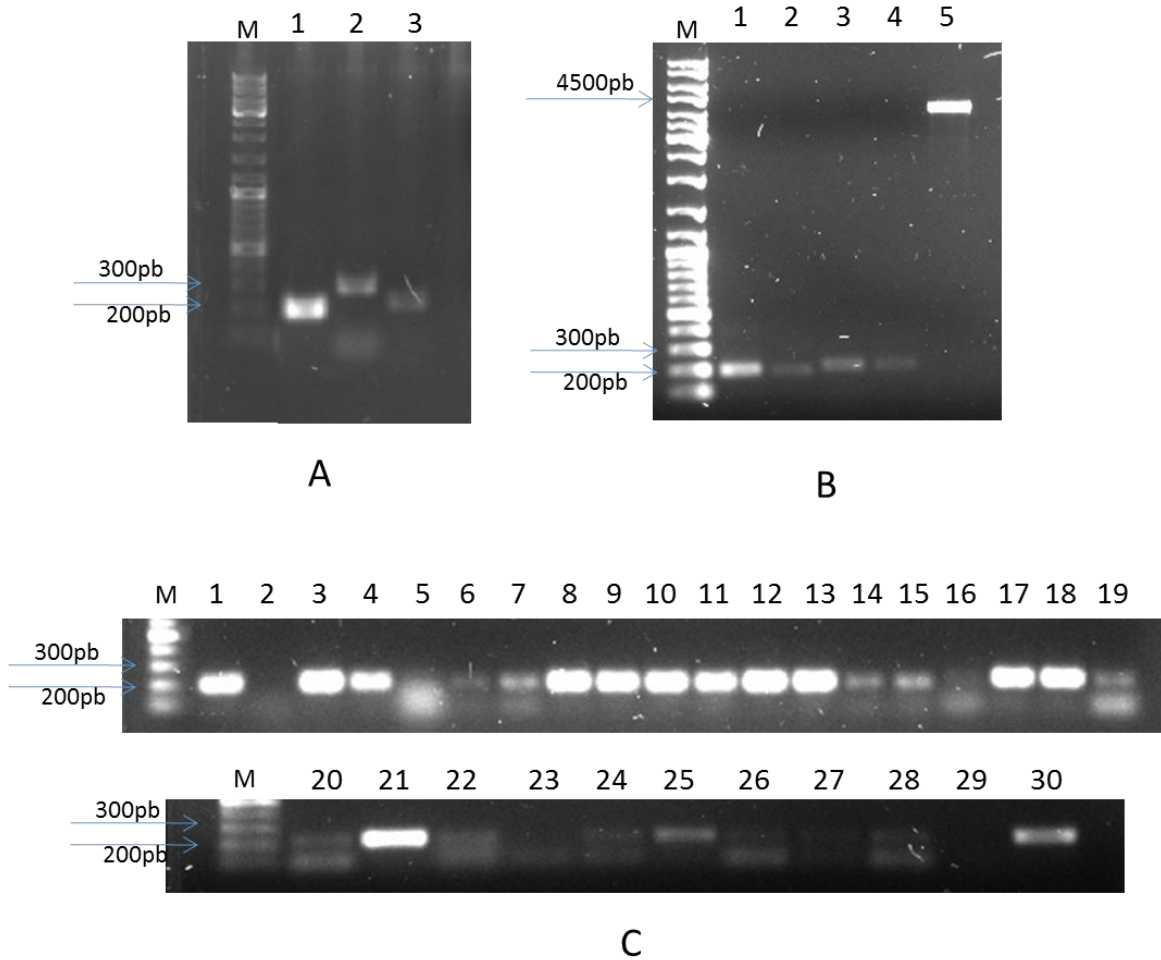


Figura 15. Fusión de posibles dominios de translocación de los genes candidatos con el gen reportero *gfp*. A, Amplificación de los fragmentos que se fusionaron a *gfp* de las secuencias *tvhydiil* (carril 1), *tacfem1* (carril 2) y *epl2* (carril 3). B, verificación de la purificación de los fragmentos de los genes *tvhydiil* (carriles 1 y 2) y *epl2* (carriles 3 y 4) y del vector linealizado pAvr1b-GFP (carril 5). C, PCR en colonia de 15 clonas distintas para las fusiones Tvhydiil1-GFP (carriles 1 a 15) y Epl2-GFP (carriles 16 a 30). M, marcador de peso molecular.

Se extrajo DNA plasmídico a partir las clonas positivas 1, 3 y 13 de la fusión Tvhydiil1-GFP, de las clonas 2, 6 y 15 de la fusión Epl2-GFP y de las clonas 8 y 11 de la fusión Tvlysm1-GFP y se enviaron a secuenciar, corroborando que en todas las clonas, excepto la clona 2 Epl2-GFP, el inserto se encontraba en fase y el marco de lectura abierto de GFP no estaba alterado.

Para purificar las proteínas quiméricas efector-GFP se utilizaron las clonas positivas Tvhydi1GFP13, Epl2-GFP15 y Tvlysm1-GFP8 (ver Apéndice B).

Obtención de las proteínas quiméricas efector – GFP.

Se probaron diferentes condiciones de inducción (cantidad de IPTG, tiempo y temperatura de incubación) para obtener las proteínas quiméricas en cantidades suficientes para probar en ensayos *in vitro* con el tejido vegetal, obteniendo un mejor resultado con las siguientes condiciones: 0.05mM de IPTG y a una temperatura de 37°C para la clona 4 de la fusión Avr1b-GFP y 0.05mM de IPTG y una temperatura de incubación de 20°C para la clona 13 con la fusión Tvhydi1-GFP. La Figura 16 corresponde a un gel de SDS-PAGE con las muestras de los sobrenadantes después de romper las células por sonicación y concentrarlas, sin inducir y con 0.05mM de IPTG, para comparación y verificación de la presencia de la banda de proteína de interés, que se indica con una flecha.

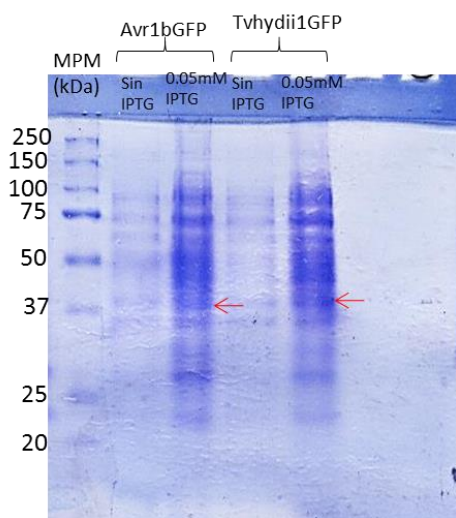


Figura 16. Obtención de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP y Tvhydi1-GFP. Sobrenadantes de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP (38.95kDa, carril 3) y Tvhydi1-GFP (40.3kDa, carril 4) después de sonicar las células, dializar y concentrar las muestras. Las flechas rojas indican la banda de la proteína quimérica. MPM, marcador de peso molecular.

Ensayos de entrada de las proteínas a raíces de soya y plántulas de A. thaliana.

Para probar la capacidad de translocación de los dominios tipo RXLR presentes en nuestros candidatos se realizaron experimentos de internalización de las proteínas quiméricas en tejido vegetal. Seguimos los protocolos descritos por Dou y col. (Dou *et al.*, 2008) y Gu y col. (Gu *et al.*, 2011) en raíces de soya y adicionalmente probamos en raíces de *A. thaliana* de 12 días de crecimiento. Debido a que se tuvieron varios problemas para purificar de manera específica las proteínas quiméricas, se realizó un ensayo preliminar, probando con los sobrenadantes obtenidos de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP y Tvhydi1-GFP sin purificar por columna, asumiendo que la fluorescencia que pudieramos observar sería debida a la presencia de la GFP (Figura 16). Las raíces de soya y las plántulas se incubaron toda la noche con los sobrenadantes correspondientes, se incluyó una muestra incubada únicamente con buffer como control negativo. En la Figura 17A se puede observar que, en comparación con el control, hay mayor fluorescencia en las raíces de las plántulas de *Arabidopsis* incubadas con ambas proteínas quiméricas. En cuanto a las raíces de soya (Figura 17B) se aprecia de igual forma fluorescencia en las raíces incubadas con las proteínas quiméricas, en comparación con la auto fluorescencia de la raíz incubada solamente en buffer MES. Las imágenes de la Figura 17 corresponden a un experimento realizado por duplicado, sin embargo, no se logró obtener la proteína quimérica como control negativo (Neg-GFP), por lo que ya no se continuaron con estos ensayos, y no se pudo corroborar el resultado presentado en la Figura 17.

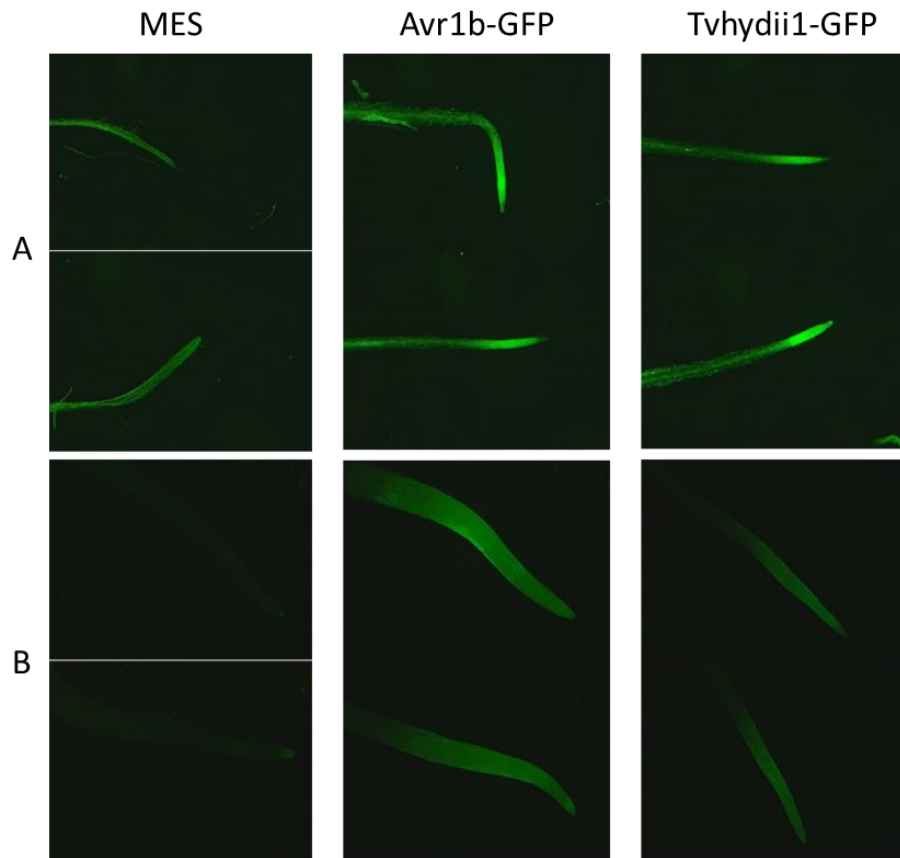


Figura 17. Ensayo de entrada de las proteínas quiméricas Avr1b-GFP y Tvhydi1-GFP a raíces de *A. thaliana* (A, aumento 63x) y raíces de soja (B, aumento 8x). Las raíces de soja o las plántulas de *A. thaliana* se incubaron 15h a 28°C con una solución conteniendo las proteínas quiméricas o con el buffer solo (MES).

Construcción de las fusiones a la proteína rojo fluorescente mCherry.

Para complementar el trabajo sobre la capacidad de entrada de los efectores a las células del hospedero, se optó por realizar otras fusiones para observar la ubicación de los productos de los genes seleccionados, y verificar si los productos tienen la capacidad de ser secretados por el hongo al medio exterior o no.

Para determinar la ubicación de los genes, se decidió realizar la fusión del marco de lectura abierto de la proteína rojo fluorescente mCherry a los marcos de lectura abiertos de los genes *tvhydi1*, *tatr2*, *tacfem1* y *epl2* para continuar con este trabajo. La fusión de los marcos de lectura se llevó a cabo mediante PCR de doble unión, como se menciona en

materiales y métodos. En la Figura 18A se muestran las amplificaciones correspondientes a la PCR 1 (Figura 1) de los marcos de lectura abiertos de cada uno de los genes y de *mcherry*. La PCR 2 se llevó a cabo utilizando como plantados los productos de la PCR 1. La Figura 18B muestra los productos obtenidos de la PCR 3, es decir, la fusión de los marcos de lectura abiertos de los genes seleccionados, a *mcherry*. Una vez purificados estos productos, se clonaron en el vector de mantenimiento pJET 1.2/blunt para su digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Con las enzimas mencionadas, se linearizó el vector de expresión pUE08 (Figura 18C), y una vez purificadas todas las construcciones, se clonaron con el vector para después transformar protoplastos de *Trichoderma*, una vez que se confirmó la secuencia correcta de las construcciones mediante secuenciación.

Se obtuvieron muy pocas transformantes resistentes a higromicina (3 transformantes por cada construcción), por lo que se hicieron por lo menos 3 pases monospóricos para cada una.

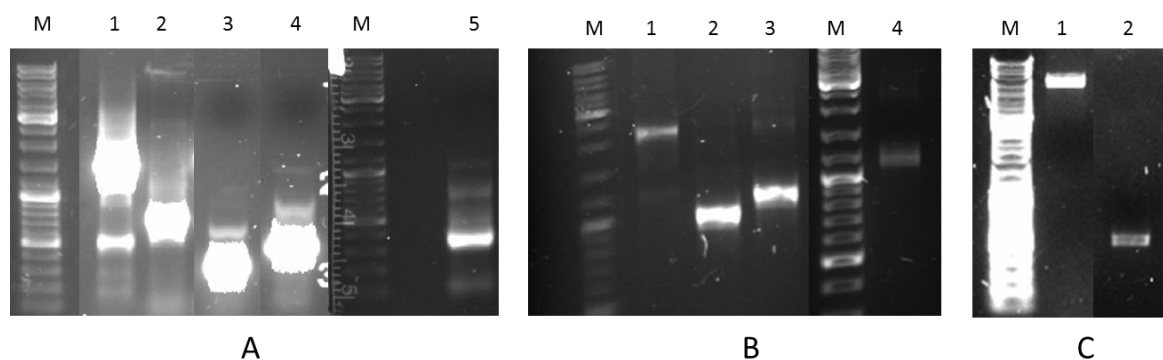


Figura 18 . Construcción de la fusión de los genes seleccionados a la proteína rojo fluorescente mCherry. A, amplificación de los marcos de lectura abiertos de los genes *tatr2* (carril 1, 1521pb), *mcherry* (carril 2, 711pb), *tacfem1* (carril 3, 303pb), *epl2* (carril 4, 471pb) y *tvhydiil* (carril 4, 342pb). B, PCR 3 de doble unión para la fusión del marco de lectura abierto de mCherry al gen *tatr2* (carril 1, 2232pb), al gen *tacfem1* (carril 2, 1014pb), al gen *epl2* (carril 3, 1182pb) y al gen *tvhydiil* (carril 4, 1053pb). C, vector pUE08 linearizado (carril 1, 6100pb) con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Hind*III y la construcción *epl2*-Cherry (carril 2, 1182pb) liberada del vector pJET 1.2/blunt con las enzimas mencionadas. M, marcador de peso molecular.

La determinación de la localización del producto del gen *tacfem1* de *T. atroviride* fue una parte del trabajo de tesis de la alumna de licenciatura Karina Rodríguez Valtierra (Rodríguez-Valtierra, 2016). En ese trabajo, la estudiante realizó microcultivos de las cepas de *T. atroviride* silvestre, silvestre transformada con el vector mCherry como controles, y la cepa que expresa la fusión Tacfem1-Cherry para observar la localización del producto de este gen.

Como se puede observar en la Figura 19G-I, el producto del gen *tacfem1* se encuentra distribuido de manera uniforme sobre la hifa del hongo, sugiriendo que puede encontrarse en la membrana. Lo anterior está en concordancia con lo reportado pues se sabe que las proteínas con dominio CFEM se ubican en este organelo celular (Kulkarni *et al.*, 2003, 2005).

La localización del producto del gen *tatrx2* también de *T. atroviride*, se está realizando como parte del trabajo de maestría de la estudiante Alma María de Jesús Ortega Olmos (tesis de maestría en progreso). Para las cepas con la fusión Epl2-Cherry, no se han realizado experimentos para determinar la localización del producto del gen *epl2*, por lo que en este trabajo únicamente se llegó hasta obtener las cepas correspondientes.

No se pudo determinar con exactitud la localización del producto del gen *tvhydi1* de *T. virens*, pues el micelio de las cepas que expresan la fusión Tvhydi1-Cherry crecía muy denso, y no permitía observar con precisión la fluorescencia en las hifas.

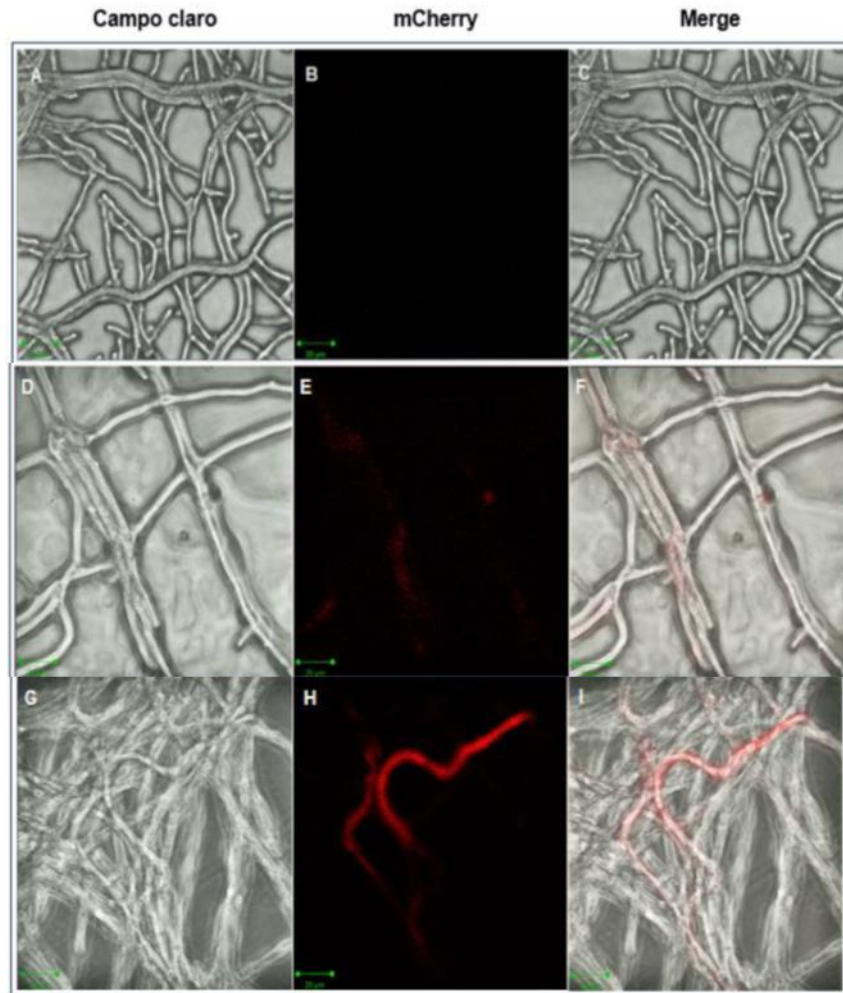


Figura 19. Localización del producto del gen *tacfem1*. A-C, *T. atroviride* silvestre, D-F, *T. atroviride* silvestre expresando la proteína mCherry. G-H, cepa de *T. atroviride* que contiene la fusión Tacfem-Cherry. Vistas con aumento 40X y escala de 20 μ m. Imagen tomada y modificada de la tesis de licenciatura de Karina Rodríguez Valtierra (Rodríguez-Valtierra, 2016).

Construcción de los vectores para sobreexpresar los genes seleccionados.

Para determinar la participación de los genes seleccionados durante las interacciones de *Trichoderma*, decidimos generar, además de las mutantes nulas en los genes seleccionados, cepas que sobreexpresaran estos genes.

Para esta parte del trabajo se utilizó el vector de expresión pUE08, como se describe en materiales y métodos. En la Figura 20A se muestran las amplificaciones de los marcos de

lectura abiertos de los genes *tacfem1* (carril 1), *tatrx2* (carril 2), *epl2* (carril 3) y *tvhydi1* (carril 4). Estos fragmentos se purificaron y se clonaron en el vector de mantenimiento pJet 1.2/blunt, para después hacer una digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (Figura 20B, carril 2, marco de lectura abierto del gen *epl2* liberado del vector de mantenimiento) y clonar estos fragmentos en el vector pUE08 linearizado con las enzimas mencionadas (Figura 20B, carril 1), y así obtener los vectores pUE08-TacfemOE, pUE08-Epl2OE, pUE08-Tatrx2OE y pUE08-Tvhydi1OE. Estos vectores se mandaron secuenciar para verificar que la secuencia del marco de lectura abierto de cada gen fuera la correcta, y se transformaron protoplastos de *Trichoderma* para obtener las cepas sobreexpresantes de los genes seleccionados.

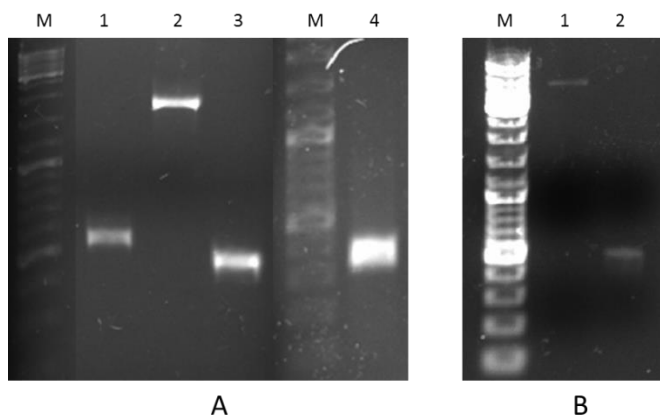


Figura 20. Construcción de los vectores para sobreexpresar los genes seleccionados. A, amplificación del marco de lectura abierto del gen *tacfem1* (carril 1, 536pb), del gen *tatrx2* (carril 2, 1749pb), del gen *epl2* (carril 3, 450pb) y del gen *tvhydi1* (carril 4, 321pb). B, vector pUE08 linearizado (carril 1, 6100pb) con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Hind*III y el marco de lectura abierto del gen *epl2* (carril 2, 450pb) liberado del vector pJET 1.2/blunt con las enzimas mencionadas. M, marcador de peso molecular.

Para el gen *tacfem1* se obtuvieron 4 transformantes independientes, y se determinó el nivel de expresión del transcrito mediante un análisis de RT-PCR semicuantitativo (Rodríguez-Valtierra, 2016), como se muestra en la Figura 21, donde se observa que las 4 cepas

sobreexpresantes tienen un nivel de expresión de 2 a 4 veces mayor que la cepa silvestre, siendo la transformante T1 la de mayor nivel (Figura 21B).

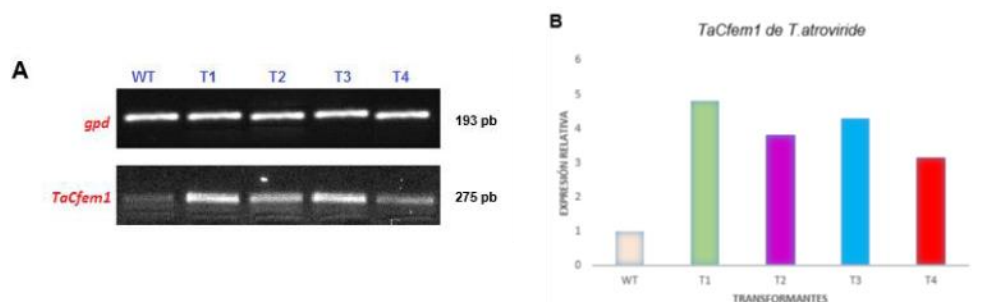


Figura 21. Análisis de expresión del gen *tacfem1* en las cepas sobreexpresantes. A, RT-PCR de la expresión relativa de las cepas sobreexpresantes *tacfem1* y de la cepa silvestre de *T. atroviride*. B, análisis densitométrico de la expresión relativa del gen *tacfem1* en las cepas sobreexpresantes. Se utilizó el gen *gpd* como control de expresión. Imagen tomada y modificada de (Rodríguez-Valtierra, 2016).

Para el gen *tatr2* se obtuvieron 8 transformantes independientes, las cuales están siendo caracterizadas en el trabajo de maestría de Alma María de Jesús Ortega Olmos. Para el gen *tvhdi1* se obtuvieron 5 transformantes, las cuales se mencionan más adelante.

Caracterización del gen tvhdi1 durante la interacción benéfica con plantas y en micoparasitismo.

De acuerdo al patrón y al nivel de expresión observado para los genes seleccionados (Figura 11), se seleccionó el gen *tvhdi1* de *T. virens*, que codifica para una hidrofobina clase II, para determinar su participación durante la interacción benéfica con plantas. Para lograr lo anterior, se obtuvieron mutantes nulas y cepas sobreexpresantes para este gen, como se mencionó anteriormente, de las cuales se seleccionaron dos para cada tipo y se realizaron 4 rondas de pases monospóricos para obtener las cepas mutantes nulas $\Delta tvhdi1$ T2.1 y $\Delta tvhdi1$ T2.3, y las cepas sobreexpresantes *tvhdi1*OE T2 y *tvhdi1*OE T5.

No se observaron diferencias significativas en el crecimiento y conidiación de las colonias de las cepas mutantes nulas y de las cepas sobreexpresantes en comparación con la cepa silvestre *T. virens* 29.8 (Figura 22A-E) a las 72h de crecimiento.

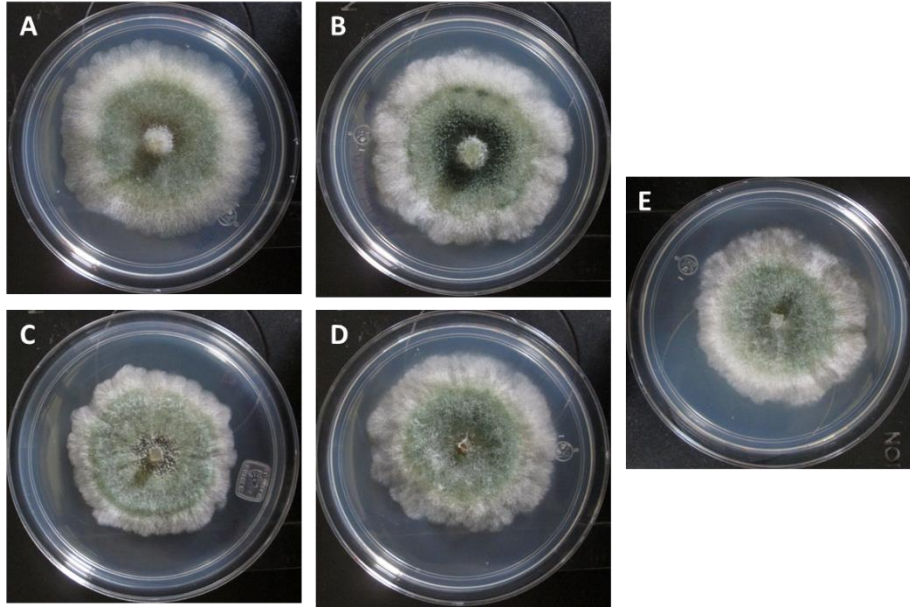


Figura 22. Crecimiento de las cepas mutantes nulas $\Delta tvhydi1$ T2.1 (A) y $\Delta tvhydi1$ T2.3 (B) y de las cepas sobreexpresantes *tvhydi1*OE T2 (C) y *tvhydi1*OE T5 (D) en comparación con la cepa silvestre *T. virens* 29.8 (E) a 3 días de crecimiento.

Nivel de expresión del transcrito del gen *tvhydi1* y corroboración de las cepas mutantes nulas.

Para verificar que el casete de interrupción para el gen *tvhydi1* se había insertado en el lugar correcto en ambas cepas mutantes, se realizó la amplificación del gen a partir de DNA genómico. Como se observa en la Figura 23A, ninguna de las cepas $\Delta tvhydi1$ T2.1 y $\Delta tvhydi1$ T2.3 presento amplificación del gen *tvhydi1* (carril 3) en comparación con la cepa silvestre *T. virens* (carril 2).

Para determinar el nivel de expresión del gen *tvhydi1* en las cepas sobreexpresantes y en las mutantes nulas, se extrajo RNA de micelio creciendo activamente, y se llevó a cabo la síntesis de cDNA correspondiente. Mediante RT-PCR semicuantitativo se determinó la

ausencia de transcritos del gen *tvhydi1* en las cepas mutantes, en comparación con la cepa silvestre. Mientras que las dos cepas sobreexpresantes *tvhydi1*OE T2 y *tvhydi1*OE T5 mostraron un nivel de expresión entre 6 y 8 veces mayor que la cepa silvestre, siendo la cepa *tvhydi1*OE T5 la de mayor nivel (Figura 23B).

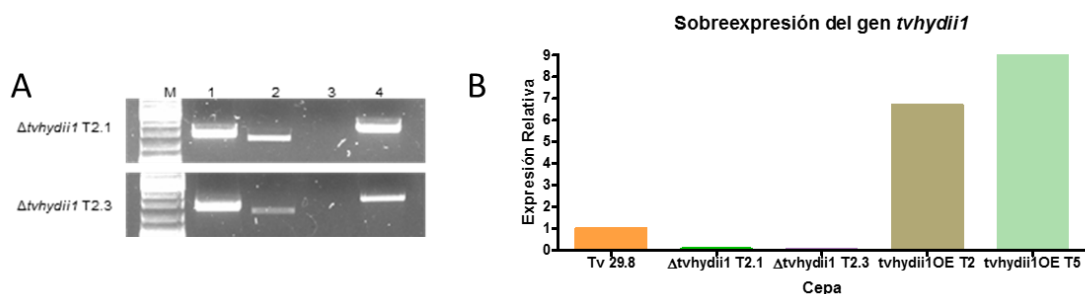


Figura 23. Corroboración de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *tvhydi1*. A, confirmación de la delección del gen *tvhydi1*; carril 1, amplificación del extremo 5' del casete de interrupción en el locus del gen *tvhydi1*; carril 2, amplificación del gen *tvhydi1* en la cepa silvestre *T. virens* 29.8 como control; carril 3, amplificación del gen *tvhydi1* en las cepas mutantes nulas; carril 4, amplificación del extremo 3' del casete de interrupción en el locus del gen *tvhydi1*. B, RT-PCR semicuantitativo de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *tvhydi1*; las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando como control de amplificación el gen *gpd*.

Ensayo de hidrofobicidad.

Debido a que el gen *tvhydi1* codifica para una hidrofobina clase II, se decidió determinar su participación en la hidrofobicidad del micelio de las cepas, como se ha reportado previamente para mutantes nulas del gen *sm2* de *T. virens* (Crutcher *et al.*, 2015). En la Figura 24 se puede observar que, mientras las cepas sobreexpresantes del gen y la cepa silvestre de *T. virens* logran mantener la gota sobre el micelio, las cepas mutantes nulas no lo hacen, y la gota se resbala al poco tiempo de haberla colocado sobre el bocado. Lo anterior indica que esta proteína confiere hidrofobicidad al micelio de *T. virens*.



Figura 24. Determinación de hidrofobicidad en micelio de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *tvhdyii1*. Se colocó una gota de 20 μ L de agua destilada sobre bocados de micelio de 72h de crecimiento y se observó la permanencia de la gota sobre el bocado durante por lo menos 5 minutos para las cepas silvestre y sobreexpresantes. Las imágenes fueron tomadas justo después de colocar la gota.

Debido a que las hidrofobinas se encuentran recubriendo las hifas de los hongos, estas podrían participar en el reconocimiento de superficies como las raíces de plantas o las hifas de otros hongos hospederos de *Trichoderma* (Bayry *et al.*, 2012; Tucker & Talbot, 2001). Es probable que la hidrofobina codificada por el gen *tvhdyii1* pudiera participar en este reconocimiento. De ser así, la ausencia o sobreexpresión de dicho gen podría alterar el reconocimiento de *T. virens* por parte de la planta, modificando las vías de defensa vegetal, o su desempeño durante una interacción micoparasítica. Para verificar lo anterior, determinamos el efecto de la presencia de las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes del gen *tvhdyii1* en la activación de vías de defensa vegetal y el desempeño de dichas cepas durante la interacción micoparasítica con el fitopatógeno *R. solani*.

Participación del gen *tvhdyii1* en la inducción de la expresión de genes de defensa en plantas de *A. thaliana*.

Para determinar la participación del gen *tvhdyii1* en la activación de las vías de defensa vegetal se midió el nivel de expresión de genes relacionados a la vía de defensa mediada por ácido salicílico (*sid2*, *pr5*) y a la biosíntesis de la fitoalexina camalexina (*pad3*) en plantas de *A. thaliana* en interacción con las cepas mutantes nulas y sobreexpresantes de dicho gen. En la Figura 25 se muestra el análisis cuantitativo de la expresión de los genes *pad3*, *sid2* y *pr5* a los 7 días de interacción.

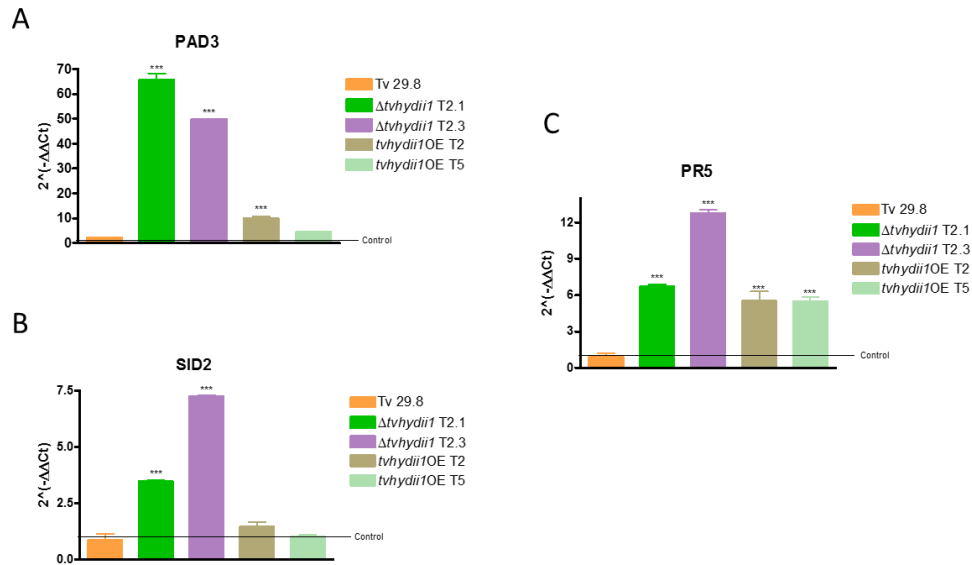


Figura 25 . Inducción de la expresión de genes de defensa y de la biosíntesis de camalexina en plantas de *A. thaliana*. qRT-PCR de la expresión de los genes *pad3* (A), *sid2* (B) y *pr5* (C) a los 7 días de interacción con las cepas mutantes nulas $\Delta tvhdyii1$ T2.1 y T2.3, las cepas sobreexpresantes $tvhdyii1OE$ T2 y T5. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Bonferroni y un valor de significancia $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (1 réplica biológica con 3 réplicas técnicas).

Como se puede observar en la Figura 25A, las cepas $\Delta tvhdyii1$ T2.1 y $\Delta tvhdyii1$ T2.3 inducen la acumulación del transcrito del gen *pad3* significativamente más, en comparación con la cepa silvestre, siendo la cepa $\Delta tvhdyii1$ T2.1 la que tiene un mayor nivel de inducción (65.54 ± 4.903 ; $p < 0.001$). Mientras que, de las cepas sobreexpresantes, la cepa $tvhdyii1OE$ T2 induce significativamente la expresión de *pad3* en comparación con la cepa silvestre, con un nivel de expresión relativa de 9.815 ± 1.392 veces ($p < 0.001$). La cepa $tvhdyii1OE$ T5 no mostró diferencia significativa respecto de la silvestre ($p > 0.05$).

La Figura 25B muestra la expresión relativa del gen *sid2*, donde se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de este gen en las plántulas en interacción con ambas cepas sobreexpresantes ($p > 0.05$), en comparación con la cepa silvestre. Mientras que la presencia de las cepas $\Delta tvhdyii1$ T2.1 y $\Delta tvhdyii1$ T2.3 induce la

expresión relativa de *sid2* 3.482 ± 0.063 y 7.267 ± 0.072 veces, respectivamente ($p<0.001$), siendo la cepa $\Delta tvhydi1$ T2.3 la que induce mayor expresión de este gen.

En cuanto a la expresión relativa del gen *pr5*, se puede observar en la Figura 25C que tanto las cepas mutantes nulas como las cepas sobreexpresantes son capaces de inducir significativamente ($p<0.001$) la expresión de *pr5*, en comparación con la cepa silvestre, siendo la cepa $\Delta tvhydi1$ T2.3 la que induce el mayor nivel de expresión (12.74 ± 0.488).

Participación del gen *tvhydi1* en confrontación con el fitopatógeno *R. solani*.

Para determinar la participación del gen *tvhydi1* en interacción micoparasítica, se realizaron confrontaciones de cada una de las cepas con dos grupos de anastomosis del fitopatógeno *R. solani*, AG2 y AG5. Las confrontaciones se hicieron en medio rico en nutrientes (medio agar papa dextrosa, PDA) y en medio con menor cantidad de nutrientes (medio mínimo para *Trichoderma*, MMT). Se emplearon dos medios con cantidades de nutrientes diferentes para observar si había diferencias en la interacción entre un medio que simula las condiciones de bajos recursos en el ambiente (MMT) y uno en el que la cantidad de recursos disponibles es mayor (PDA). Las placas se incubaron a 28°C en total oscuridad durante 14 días, tomando fotografías de la parte del frente y detrás de las cajas a distintos días de la interacción.

En cuanto a la confrontación con el grupo de anastomosis AG5, en ninguno de los casos se observaron diferencias entre las cepas sobreexpresantes y las mutantes nulas del gen *tvhydi1*, como se puede observar en la Figura 26.

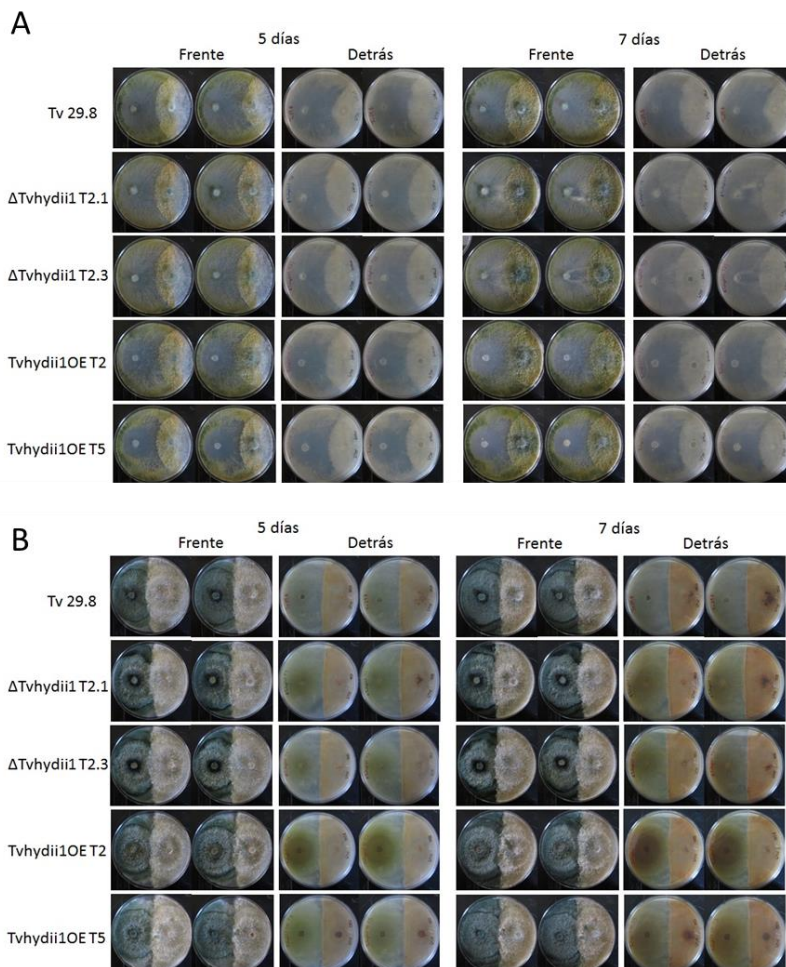


Figura 26. Ensayos de micoparasitismo de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen *tvhydiil* de *T. virens* con el fitopatógeno *R. solani* AG5. A, confrontaciones en cajas de Petri con medio MMT a los 5 y 7 días de interacción. B, confrontaciones en cajas de Petri con medio PDA a los 5 y 7 días de interacción. Frente, imágenes tomadas por el frente de la caja para observar el crecimiento de las colonias; Detrás, imágenes tomadas por la parte de atrás de las cajas para observar la zona de contacto entre los dos hongos. Las cajas se incubaron durante 14 días a 28°C en total oscuridad.

Para la confrontación con el grupo de anastomosis AG2, en medio MMT no se observaron diferencias entre los tratamientos (Figura 27A) en ninguno de los tiempos observados. En el caso de las confrontaciones en medio PDA (Figura 27B), se observa que, a los 5 y 7 días de confrontación, las cepas sobreexpresantes son capaces de limitar el crecimiento de la colonia de *R. solani* AG2 ligeramente mejor que las cepas mutantes nulas. Sin embargo, después de los 7 días de confrontación, las diferencias fueron menos evidentes. Estos datos sugieren que la sobreexpresión del gen *tvhydiil* de *T. virens* ayuda al crecimiento de *T. virens* sobre el fitopatógeno, posiblemente favoreciendo la adhesión a las hifas del

fitopatógono, aunque no es suficiente para mejorar la capacidad antagónica de *Trichoderma* contra las dos cepas analizadas.

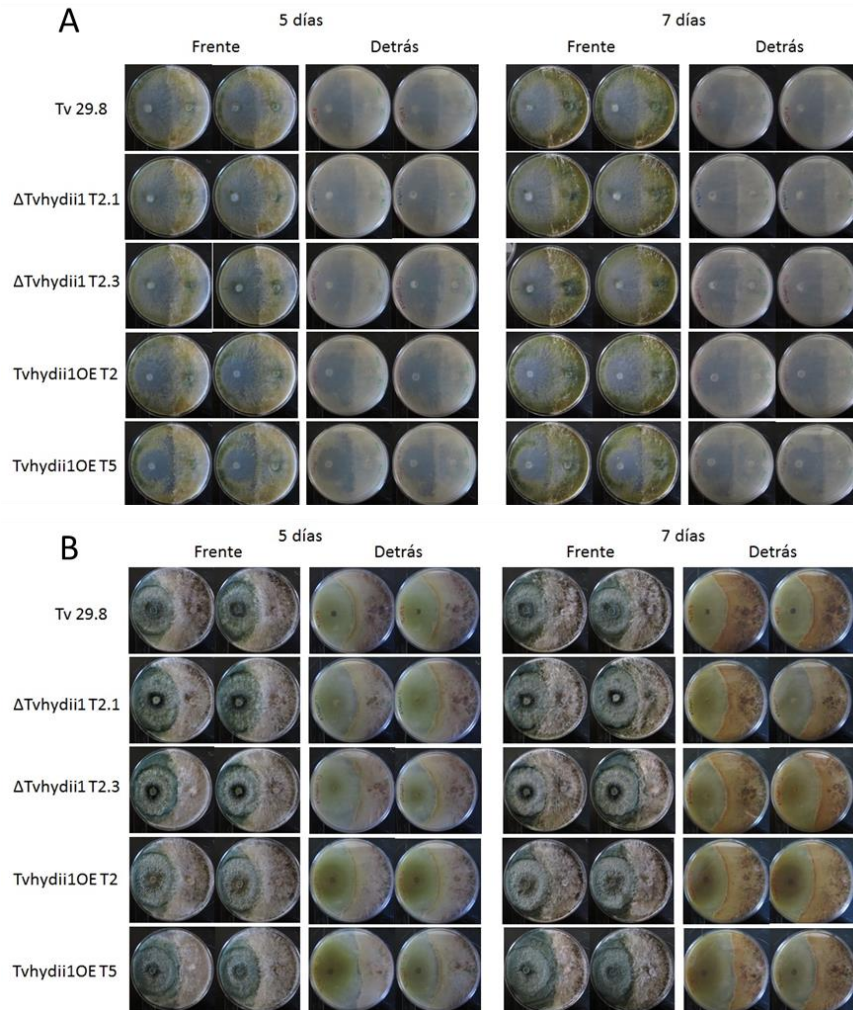


Figura 27. Ensayos de micoparasitismo de las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen *tvhydi1* de *T. virens* con el fitopatógono *R. solani* AG2.

A, confrontaciones en cajas de Petri con medio MMT a los 5 y 7 días de interacción.

B, confrontaciones en cajas de Petri con medio PDA a los 5 y 7 días de interacción.

Frente, imágenes tomadas por el frente de la caja para observar el crecimiento de las colonias; Detrás, imágenes tomadas por la parte de atrás de las cajas para observar la zona de contacto entre los dos hongos. Las cajas se incubaron durante 14 días a 28°C en total oscuridad.

Participación del gen *tvhydi1* en la colonización de raíces de tomate por *T. virens*.

Se ha propuesto que *Trichoderma* emplea hidrofobinas para adherirse a la superficie de las raíces vegetales, favoreciendo la colonización (Kim *et al.*, 2005; Viterbo & Chet, 2006).

Para determinar la posible función de la hidrofobina Tvhydi1 en la interacción con plantas,

se llevaron a cabo ensayos de colonización de raíces de tomate con las cepas nulas y sobreexpresantes del gen *tvhdyi1*. Para confirmar la presencia de DNA proveniente del hongo se utilizó el gen *sm1*, mientras que para distinguir el DNA vegetal se utilizaron los genes *apt*, para el análisis por PCR semicuantitativo y *expressed*, para el análisis por qPCR, reportados por Expósito-Rodríguez y col. (2008).

La Figura 28A muestra el PCR semicuantitativo de la amplificación de *sm1* en las raíces de tomate en interacción con las cepas utilizadas, donde se puede apreciar que todas las cepas son capaces de colonizar las raíces de tomate, en particular las dos cepas sobreexpresantes del gen *tvhdyi1*.

Para corroborar lo observado en el análisis semicuantitativo, se realizó un análisis en tiempo real de la amplificación relativa de *sm1* en las raíces de tomate en interacción con las cepas mencionadas. Como resultado de este análisis se obtuvo que *sm1* es más abundante en las raíces de las plantas de tomate inoculadas con ambas cepas sobreexpresantes, en comparación con la cepa silvestre. Mientras que *sm1* es menos abundante en las plantas en interacción con las mutantes nulas que en las plantas colonizadas por la cepa silvestre (Figura 28B).

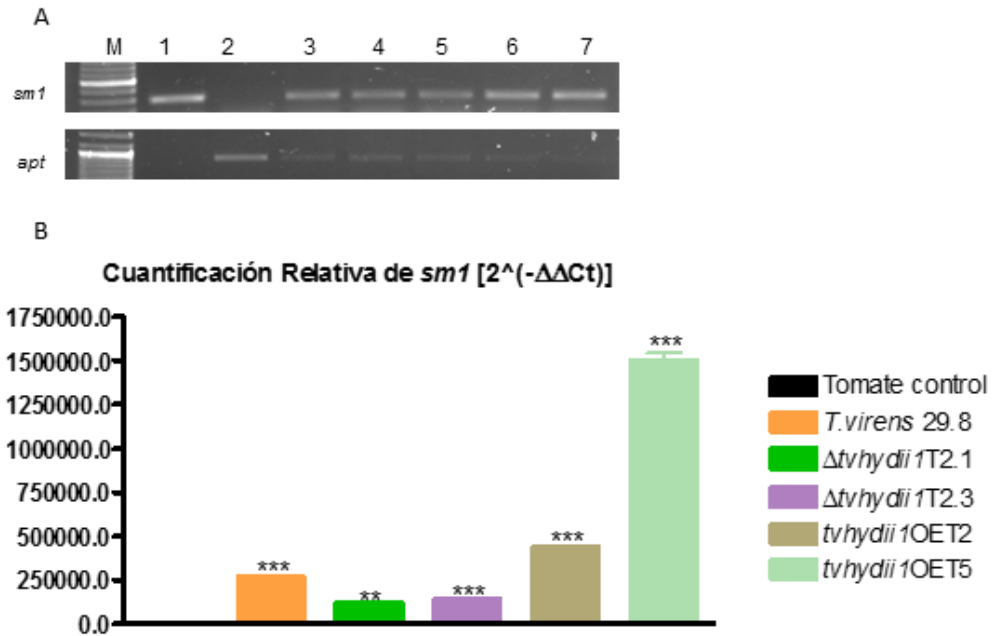


Figura 28 . Colonización de raíces de tomate por las cepas sobreexpresantes y mutantes nulas del gen *tvhydii1* de *T. virens*. A, PCR semicuantitativo de la amplificación de *sm1* en raíces de tomate colonizadas con las cepas *T. virens* 29.8 (carril 3), $\Delta tvhydii1$ T2.1 (carril 4), $\Delta tvhydii1$ T2.3 (carril 5), *tvhydii1*OE T2 (carril 6) y *tvhydii1*OE T5 (carril 7). Como control del DNA vegetal se utilizó el gen *apt*, y se empleó DNA de *T. virens* y de *S. lycopersicum* como controles de amplificación (carriles 1 y 2, respectivamente). B, qPCR de la amplificación relativa de *sm1* en raíces de tomate colonizadas con las cepas *T. virens* 29.8, *tvhydii1* T2.1, $\Delta tvhydii1$ T2.3, *tvhydii1*OE T2 y *tvhydii1*OE T5. Los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representan el nivel de amplificación del gen *sm1* en relación con el nivel de expresión del gen de tomate *expressed*, en comparación con la condición control (DNA de plantas de tomate creciendo solas). Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Bonferroni y un valor de significancia $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. (1 réplica biológica con 3 réplicas técnicas).

Estos resultados indican que el gen *tvhydii1* de *T. virens* desempeña un papel en la colonización de las raíces vegetales, posiblemente facilitando la adhesión de las hifas a las raíces.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo identificamos genes que codifican para posibles moléculas tipo efector en dos especies de *Trichoderma*, las cuales podrían participar en el establecimiento de la interacción benéfica que éstos desarrollan con plantas. Seleccionamos 16 genes a partir de una lista de posibles efectores del secretoma de *T. virens* y *T. atroviride* (Guzmán-Guzmán *et al.*, artículo sometido) considerando que fueran representantes de cada una de las 7 familias principales en las que están clasificados los posibles efectores en la lista obtenida, y que tuvieran un dominio de translocación RXLR o similar, ya que éste ha sido relacionado con la entrada de los efectores a la célula del hospedero, favoreciendo el establecimiento de las interacciones entre dos organismos (Dou *et al.*, 2008; Grouffaud *et al.*, 2010; Wawra *et al.*, 2012). Sin embargo, al analizar las secuencias nucleotídicas obtenidas de la base de datos de los genomas, no en todos los casos fue posible ubicar el dominio de translocación indicado en la lista de posibles efectores de *Trichoderma*, como en el caso de los candidatos *tacfem1* (CFEM) y *tamp1* (Metaloproteasa). Lo anterior podría explicarse considerando que no todas las proteínas efectoras caracterizadas tienen un dominio de translocación tipo RXLR, tal es el caso de los efectores apoplásticos y los efectores que cuentan con el dominio CFEM, como en el efector citoplasmático BAS1 del hongo fitopatógeno *M. oryzae*, el cual carece de un dominio conocido, sin embargo se localiza en el interior de las células arroz (Zhang & Xu, 2014), por lo que la ausencia de un dominio de translocación definido no eliminaba la posibilidad de que esas proteínas pudieran tener la capacidad de entrar a las células vegetales.

En la mayoría de los casos, cuando ese dominio de translocación está presente, se encuentra hacia el N-terminal, como en Avr1b de *P. sojae*, cuyo dominio se localiza en los residuos

41 a 65 (Dou *et al.*, 2008) y en Avr3a de *P. infestans*, que se encuentra en los residuos 44 a 59 (Bos *et al.*, 2010). En ambos casos, el dominio es funcional y permite a las proteínas entrar en las células de las plantas. En los genes *tatr2* y *tvsep1* el dominio se localizó hacia la región C-terminal, como se ubica en la proteína MiSSP7 del hongo micorrízico *Laccaria bicolor* (Plett *et al.*, 2011), por lo que la presencia de los dominios hacia el C-terminal en nuestros candidatos no descarta la posibilidad de que puedan ser funcionales, teniendo la capacidad de entrar a las células vegetales; por otro lado, es posible que estos dos candidatos sean apoplásticos, y que lleven a cabo su función desde los espacios intercelulares de la planta.

A partir de co-cultivos de la planta *A. thaliana* con *T. virens* o *T. atroviride*, se corroboró el efecto benéfico de esta interacción sobre el desarrollo del sistema radicular, evidenciado por la presencia de un mayor número de brotes laterales, coincidiendo con lo reportado anteriormente (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009), donde indican que debido a que *Trichoderma* es capaz de producir compuestos tipo auxina, puede favorecer el desarrollo de brotes laterales en las raíces. Sin embargo, en las condiciones en las que se realizaron nuestros ensayos de interacción, no se observó una diferencia significativa en la biomasa de las plantas co-cultivadas con *Trichoderma* en comparación de las plantas control, como los mismos autores reportan (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Esto podría deberse a diferencias en la manipulación de los cultivos, pues se ha observado dentro del grupo de trabajo que cambios en la cantidad de agar presente en la placa de Petri, así como variaciones en el pH del medio de cultivo, son capaces de modificar el resultado de la interacción *Arabidopsis*–*Trichoderma*.

Con la finalidad de determinar la actividad transcripcional de los genes seleccionados, durante la interacción *Arabidopsis-Trichoderma*, llevamos a cabo ensayos de RT-PCR y observamos que los 16 genes seleccionados son transcripcionalmente activos durante la interacción. El análisis por RT-PCR en tiempo real de siete de estos genes : *tvlysm1*, *tatrx2*, *tacfem1*, *epl2*, *tvsep1* y *tvhydi1* nos mostró un nivel de transcrito que se incrementa con el tiempo de interacción, mientras que el gen *tamp1* presenta un patrón contrario, es decir, su nivel disminuye con el tiempo. Se sabe que los efectores pueden ser secretados por los organismos en distintos tiempos del establecimiento de una interacción, pudiendo cada uno de ellos actuar a diferentes niveles, según sus funciones, ejerciendo un efecto tal sobre el hospedero que permita el establecimiento de la interacción (Boyd *et al.*, 2013; Pozo & Azcón-Aguilar, 2007). También es posible que la expresión de los efectores pudiera estar regulada de forma negativa por la presencia de la planta, pues como se observa en el análisis de RT-PCR en tiempo real, en general a los 3 días de la interacción parece que la expresión de 3 de los genes disminuye cuando el hongo se encuentra en presencia de la planta, en comparación con el hongo creciendo solo, siendo estadísticamente significativo para el gen *tatrx2*. Se conoce que compuestos secretados en los exudados de las raíces de las plantas, como las estrigolactonas, inducen la expresión de factores de nodulación, permitiendo el establecimiento de la interacción (Smith, 2014; Steinkellner *et al.*, 2007). Otros efectores, como MiSSP7 de *Laccaria bicolor*, incrementan su expresión únicamente durante la primer fase de la interacción micorrícica, modulando al vía de defensa vegetal mediada por ácido jasmónico (Plett *et al.*, 2011, 2014a). Hasta el momento, no tenemos conocimiento de algún trabajo donde reporten regulación negativa de la expresión de efectores por parte la planta, aunque, debemos tomar en cuenta que los tiempos que consideramos para los co-cultivos son tempranos en el establecimiento de la interacción,

por lo que el comportamiento transcripcional que observamos en varios de los genes fue una ligera disminución en la expresión al inicio del co-cultivo, seguido de un aumento en el último tiempo considerado.

El gen *tvlysm1* de *T. virens*, de la familia con repetidos LysM, incrementa su expresión con respecto del control al séptimo día de la interacción, pudiendo tener una participación importante en la confrontación con *Arabidopsis*, pues se sabe que este tipo de proteínas se encargan de unir quitina, proveniente de la pared celular del hongo, y de esta forma evitar que sean percibidos por la planta, previniendo que se desencadenen las respuestas de defensa del hospedero (Buist *et al.*, 2008; Gust *et al.*, 2012; de Jonge & Thomma, 2009), como lo hace el efector Mg3LysM de *Mycosphaerella graminicola* (Marshall *et al.*, 2011), o el efector Ecp6 de *C. fulvum* que también une esos oligómeros (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013).

El gen *tatr2* de *T. atroviride*, una tioredoxina, que incrementa su expresión respecto del control a los siete días de interacción con *A. thaliana*, pudiera tener una función similar a la de la tioredoxina CITRX de tomate, la cual durante la infección con *Cladosporium fulvum* regula negativamente la muerte celular y las respuestas de defensa mediadas por la interacción Cf9/Avr9 (Rivas *et al.*, 2004). La muerte celular en el tejido vegetal durante el encuentro con un patógeno es un proceso muy importante ya que, eliminar de manera selectiva y localizada las células infectadas, evita la dispersión del patógeno y el desarrollo de la enfermedad.

Las proteínas con dominio CFEM, como el gen *tacfem1* de *T. atroviride*, pueden tener funciones relacionadas a la transducción de señales y a la adhesión celular en interacciones

hospedero–patógeno, debido a su capacidad hidrofóbica y a que generalmente se encuentran en la parte externa de la membrana en varias especies de hongos (Kulkarni *et al.*, 2003); algunas de estas proteínas participan en la formación de apresorios, como la proteína Pth11p de *M. griseae* (DeZwaan *et al.*, 1999), por lo que es importante en la capacidad de colonización del hospedero. El gen *tacfem1*, que presenta un aumento significativo en su expresión con respecto del control a los cinco y siete días de confrontación, podría participar facilitando la colonización de las raíces de *Arabidopsis*.

De acuerdo a los resultados del RT-PCR en tiempo real para el gen *epl2* de *T. atroviride*, una cerato platanina, se puede apreciar que éste incrementa su expresión respecto del control a los 7 días de interacción. Recientemente se reportó la participación de *epl2* y su ortólogo *sm2* en *T. virens*, durante la interacción con maíz, al conferir protección a la planta contra el patógeno *Cochliobolus heterostrophus*, siendo más importantes que sus ortólogos *sm1/epl1* (Gaderer *et al.*, 2015). Por lo tanto, en la interacción de *T. atroviride* con *A. thaliana*, *epl2* pudiera participar hasta el momento del contacto con la planta, de acuerdo al patrón de expresión observado en los resultados.

Las serin proteasas, debido a su actividad hidrolítica, pueden degradar enlaces peptídicos (Donofrio *et al.*, 2006); esta enzima, codificada por el gen *tvsep1* de *T. virens*, podría proteger al hongo cuando se encuentra en contacto con la planta, contra enzimas secretadas por ésta y así permitir la colonización de las raíces. Este gen incrementa su expresión a los 5 y 7 días de la interacción, antes de que el hongo haga contacto directo con la planta, y una vez que ya está sobre las raíces. Se sabe que algunas serin proteasas, como la proteína Tvsp1 de *T. virens*, inducen protección en semillas de algodón contra el fitopatógeno *R. solani* (Pozo *et al.*, 2004).

A los 3 y 5 días de interacción, el gen *tamp1* de *T. atroviride*, perteneciente a la familia de las metaloproteasas, presenta un aumento significativo en su expresión respecto del control, sugiriendo que podría tener un papel en estas etapas de la interacción. Se sabe que la proteína Avr-Pita de *M. griseae*, que tiene homología a metaloproteasas de *Aspergillus* spp. y de *Penicillium*, es capaz de inducir resistencia en plantas de arroz una vez que el hongo ha penetrado las hojas de la planta (Khang *et al.*, 2008). No obstante, nuestros resultados indican que, para el tiempo en el que el hongo se encuentra sobre las raíces de *Arabidopsis* (7 días de interacción), la expresión del gen *tamp1* disminuye significativamente respecto del control, es probable que para el tiempo en que el hongo está sobre las raíces aún esté la proteína presente o que su función pudiera ser la de participar en la protección del hongo contra compuestos secretados por la planta, debido a su actividad catalítica (Jongeneel *et al.*, 1989; Staats *et al.*, 2013).

Sería interesante, por lo tanto, determinar si el producto de los genes *tamp1* y *tvsep1* proporcionan protección contra compuestos liberados por la planta, o pudieran inducir respuestas de defensa vegetal.

En la bibliografía, no se ha reportado la presencia de dominios de translocación en efectores con función de hidrofobina y que sean capaces de entrar a las células vegetales. Nosotros intentamos probar la funcionalidad del dominio identificado en la proteína Tvhyii, mediante la obtención de la proteína quimérica Tvhydii1-GFP. No fue posible estandarizar las condiciones de inducción y purificación adecuadas para la obtención de las proteínas quiméricas, pero probamos extractos totales, conteniendo las proteínas quiméricas tanto en raíces de soya como en raíces de *Arabidopsis*. Sin embargo, los resultados obtenidos no son

concluyentes debido a que no pudimos obtener el control negativo para el ensayo de entrada de la proteína quimérica a las raíces de las plantas.

Adicionalmente, decidimos realizar fusiones a la proteína mCherry del marco de lectura abierto de los genes, para determinar la localización de los productos de este gen y de tres genes más. Se obtuvieron las cepas de *Trichoderma* expresando las fusiones Tvhydi1-Cherry, Tatr2-Cherry, Tacfem1-Cherry y Epl2-Cherry. Los resultados para el producto del gen *tacfem1* sugieren que la proteína se localiza en la superficie de la hifa, aparentemente recubriéndola, lo que coincide con lo que se ha reportado para las proteínas con dominio CFEM (Kulkarni *et al.*, 2003, 2005). Será interesante determinar la localización de los productos de los demás genes, así como corroborar la funcionalidad del péptido señal de secreción y del dominio de translocación predichos.

Se ha descrito la participación de hidrofobinas en interacciones de hongos con plantas, como la hidrofobina Tashyd1 de *T. asperellum*, la cual incrementa su expresión durante la interacción con pepino, dicha expresión se detectó hasta los 5 días después de la colonización de las raíces, y además se identificó su participación en la colonización de las raíces, pues las mutantes deficientes en esta proteína perdieron esta capacidad (Viterbo & Chet, 2006). La hidrofobina MHP1 de *M. griseae* incrementa su producción durante la colonización de hojas de arroz, además de participar en la patogenicidad y en la formación del apresorio de este hongo (Kim *et al.*, 2005). El gen *tvhydi1*, que codifica para una hidrofobina clase II, incrementa su expresión considerablemente a los 7 días de interacción con *A. thaliana* y los resultados obtenidos del ensayo de colonización de raíces, indican que este gen participa en la adhesión a las raíces vegetales, facilitando la colonización por parte

de *T. virens*, lo que se evidencia en la mayor capacidad de las cepas sobreexpresantes para colonizar las raíces, a diferencia de las mutantes nulas.

Sobre la participación de hidrofobinas durante interacciones micoparasíticas, se sabe que los genes, *pgh1* y *pgh2*, de *Phlebiopsis gigantea*, incrementan su expresión durante la confrontación con el patógeno *Heterobasidium annosum*, sugiriendo su participación durante el micoparasitismo (Mgbeahuruike *et al.*, 2012). Nosotros confrontamos las cepas mutantes nulas y las cepas sobreexpresantes del gen *tvhydii*, generadas en este trabajo, con dos grupos de anastomosis del fitopatógeno *R. solani*. Encontramos sólo diferencias leves con el grupo de anastomosis AG2, donde las cepas sobreexpresantes fueron capaces de restringir el crecimiento de la colonia de *R. solani* AG2, en tiempos tempranos de la confrontación, en comparación con las mutantes nulas y la cepa silvestre. Sin embargo, de manera general, no se ve afectada la capacidad micoparasítica de *T. virens* contra el patógeno. Lo anterior sugiere que, si *Tvhydii1* participa en el micoparasitismo, posiblemente lo haga en la adhesión inicial del hongo a las hifas del hospedero, por lo que no se observaron diferencias en tiempos posteriores de la confrontación.

En cuanto a la activación de las vías de defensa vegetal, la presencia de las cepas mutantes nulas en el gen *tvhydii1* incrementó notablemente la expresión de genes relacionados a la vía de defensa mediada por ácido salicílico, como *sid2* y *pr5*, en las plántulas de *Arabidopsis*. Se ha reportado que la vía de defensa mediada por esta fitohormona es la que modula el establecimiento de *Trichoderma* en el interior de las raíces de *Arabidopsis*, pues en plantas deficientes en la acumulación de SA (mutantes en *sid2*), *T. harzianum* fue capaz de entrar hasta el tejido vascular, llegando hasta la parte aérea (Alonso-Ramírez *et al.*, 2014).

Si *T. virens* no es capaz de adherirse lo suficiente a la raíz como para colonizar a la planta posiblemente no pueda modular adecuadamente la respuesta de defensa vegetal a su favor, por lo que la planta responderá activando la vía del ácido salicílico, como ocurre cuando probamos las mutantes nulas *tvhdyi1*. En cambio, si *T. virens* es capaz de adherirse eficientemente (o mucho más que la cepa silvestre) a las raíces, como es el caso de las cepas que sobreexpresan al gen *tvhdyi1*, la planta deberá restringir la entrada masiva del hongo, y esto podría estar modulado también a través de los niveles de SA, sólo que en este caso es una respuesta intermedia, donde se observa un incremento de la expresión del gen *pr5*, mayor que con la cepa silvestre y menos que la activada por las cepas mutantes.

Gracias a las herramientas bioinformáticas, moleculares y bioquímicas disponibles se ha hecho posible la identificación de genes que codifican para posibles efectores en los distintos organismos, así como la caracterización de sus posibles funciones, adquiriendo un mayor conocimiento sobre los procesos moleculares que median el establecimiento de interacciones tanto patogénicas como benéficas.

La interacción entre organismos comprende una percepción simultánea de diversas señales provenientes de los participantes que no únicamente involucra la presencia de las hormonas, sino la concentración de cada una de ellas, lo que lleva a una regulación hormonal formada por una amplia red de interconexiones. Por lo que, integrar el impacto de esta regulación hormonal es muy complejo, y aún falta mucho trabajo para definir esto, sin embargo, hemos iniciado el estudio en esa dirección, y los datos de este trabajo servirán de soporte para continuar elucidando el establecimiento de las interacciones benéficas planta – *Trichodemra*.

CONCLUSIONES

Identificamos 7 genes que codifican para posibles moléculas tipo efector de *Trichoderma* que pudieran tener un papel en establecimiento de la interacción benéfica con *A. thaliana*, particularmente en la etapa de colonización de las raíces de la planta. No obstante, es necesario la obtención de las mutantes nulas en estos genes para corroborar su papel durante la interacción.

El gen *tvhydii1* codifica para una proteína que confiere hidrofobicidad al micelio de *T. virens*. La proteína posee un dominio de translocación HGLR que podría ser internalizado a las células de raíces de soya y de *Arabidopsis*. Además, participa posiblemente en la adhesión de *T. virens* a las hifas de *R. solani* durante el micoparasitismo. La presencia de esta hidrofobina favorece la colonización de las raíces de plantas de tomate, posiblemente facilitando la adhesión de *T. virens* a la superficie de la raíz, para entonces modular la respuesta de defensa vegetal, y poder establecer la interacción benéfica con la planta.

APÉNDICES

APÉNDICE A. Lista de iniciadores.

Iniciador	Secuencia 5'→3'	Templado	Tamaño del fragmento	Observaciones
Tvlysm1AS	TTGAGAGCCA GGTCCACTT GACA	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	647pb en DNA. 533pb en cDNA	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvlysm1S1	TGCCTCAAAG ACAAGGACA CTGGA			
Tvlysm1S2TR	TGTTTGCCAG AGAAATGCA GCGAG	cDNA de <i>T. virens</i>	122pb	Con el iniciador Tvlysm1AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Tasep1AS	AGGTGACTCT GTTCTTGCTG GTGT	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	778pb en DNA y cDNA	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tasep1S1	ATTGCAGACG ATGGATGCTC TCCT			
Tasep1S2TR	AGCTGTTCAA CGATGGTACC CAGT	cDNA de <i>T. atroviride</i>	198pb	Con el iniciador Tasep1AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tvsep2AS	ACTTCTTCCA CGTCTTGCC TTCT	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	1025pb en DNA. 966pb de cDNA	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvsep2S1	AGCAATGGCA TCTGTTCAAC ACGG			
Tvsep2S2TR	TGGCGGGATA TCCAATACCT	cDNA de <i>T. virens</i>	166pb	Con el iniciador Tvsep2AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-

	TGCT				PCR.
Tasep2AS	AAGGCGGAG CAGTGTTCTG AGTAA	DNA genómico y cDNA de <i>T.</i> <i>atroviride</i>	620pb en DNA y cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tasep2S1	GTGCAGGTTG GCCATGATGT CAAT				
Tasep2S2TR	TACGTCTTCG CAAGTGGTAA CGGT	cDNA de <i>T.</i> <i>atroviride</i>	143pb		Con el iniciador Tasep2AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tvsep3AS	ATACCACGCA GTCCCATCAA TCCA	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	682pb en DNA y cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvsep3S1	TTGTGGGCCA TGTCGATCTC ATCT				
Tvsep3S2TR	TCTGTTGTCG AAGCCCAACA GAGA	cDNA de <i>T. virens</i>	132pb		Con el iniciador Tvsep3AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tvhydi1 AS	TCAGTGCAGA GAACAGCAA CTCCA	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	378pb en DNA. 264pb en cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvhydi1S1	TCTCCTCTTC ACCGCAGCTT T				
Tvhydi1S2TR	AAATGCAAGT CGTTTGGCAG CGTC	cDNA de <i>T. virens</i>	95pb		Con el iniciador Tvhydi1AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Tamp1AS	CATTGCGGCT GTCGAATGCT TGTA	DNA genómico y cDNA de	1002pb en DNA. 881pb en		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR

Tamp1S1	GCCCAATGAA GTCCGCAGTT TCAA	<i>T. atroviride</i>	cDNA		
Tamp1S2TR	ACATGCAACA CCTCTCAGTA CCCA	cDNA de <i>T. atroviride</i>	97pb		Con el iniciador Tamp1AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Tvmp1AS	ACAGGAAGC CTGCTAACTG ATGCT	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	950pb en DNA. 828pb de cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvmp1S1	CAACGCCATT ACCGGCATTC ACTT				
Tvmp1S2TR	TGGCTCCAGC GTCGATTATG TGAA	cDNA de <i>T. virens</i>	192pb		Con el iniciador Tvmp1AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Talysm1AS	AGAGTACGGC GACTGCTGCA TTAT	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	498pb en DNA.435pb de cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Talysm1S1	ACCAACAAGC AGCTAGAAG GCTCT				
Talysm1S2TR	TGCCTCAAAG ACAAGGACA CTGGA	cDNA de <i>T. atroviride</i>	213pb		Con el iniciador Talysm1AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tvlysm2AS	TTGAGAGCCA GGTCCACTT GACA	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	647pb en DNA. 533pb de cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvlysm2S1	TGCCTCAAAG ACAAGGACA CTGGA				

Tvlysm2S2TR	TGTTTGCCAG AGAAATGCA GCGAG	cDNA de <i>T. virens</i>	122pb		Con el iniciador Tvlysm2AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tatrx1AS	AGGAATTCGG CGTATCGTTG AGCT	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	1110pb en DNA. 731pb en cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tatrx1S1	GTGGTGCTTT GTGCCTCTGA GTTT				
Tatrx1S2TR	AGCTGATTGA TCTTTGCACC GCAG	cDNA de <i>T. atroviride</i>	172pb		Con el iniciador Tatrx1AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tatrx2AS	AGGGAACTTG TCGGTCTTGA GGTT	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	562pb en DNA y cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tatrx2S1	TGGTGGCATC ACCTCATACA TGGT				
Tatrx2S2TR	TGCCGGTATC CCTTTGGCTT ACAT	cDNA de <i>T. atroviride</i>	178pb		Con el iniciador Tatrx2AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Tvtrx1AS	TGTAGGTGAC AGGGTTCTGC TTGT	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	929pb en DNA y cDNA		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Tvtrx1S1	TGAGGACTTC AAGACCGCTG ACAA				
Tvtrx1S2TR	TAGCCTGTAT GCCAACAGCG AGTT	cDNA de <i>T. virens</i>	146pb		Con el iniciador Tvtrx1AS, este par de oligos se diseñó para las reacciones de qRT-PCR.
Tacfem1AS	CATCGGCACC ACAAGCAGC	DNA genómico y cDNA de	204pb en DNA y		Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-

	AATTA	<i>T. atroviride</i>	cDNA	PCR
Tacfem1S1	TTGCTCTTGC TACCTTTGTT GCCG			
Tacfem1S2TR	CAGACACTGA CTTGGCATGC GTTT	cDNA de <i>T. atroviride</i>	96pb	Con el iniciador Tacfem1AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Epl2AS	TGGTTATGAG TCCGTTGAGG CCAT	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	190pb en DNA. 127pb en cDNA	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR
Epl2S1	TTCACCGTTG CTACACTCGT CACA			
Epl2S2TR	TTGCTACACT CGTCACAGCC ATCA	cDNA de <i>T. atroviride</i>	120pb	Con el iniciador Epl2AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Tvsep1AS	CGCAGCTTGT CGATTTGGGT CATT	DNA genómico y cDNA de <i>T. virens</i>	290pb en DNA y cDNA	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR.
Tvsep1S1	TATAAGCAGC TCAATGGCGA GGGT			
Tvsep1S2TR	ACCATGAGGA CAAAGCCCAG AAGA	cDNA de <i>T. virens</i>	199pb	Con el iniciador Tvsep1AS, este par de oligos se utilizó en las reacciones de qRT-PCR.
Sm1s1	TCTCCTACGA CACCGGCTAC	DNA y cDNA de <i>T. virens</i>	199pb	Junto con el oligo Sm1as1, estos iniciadores se utilizaron para las reacciones de RT-PCR.
Sm1cs1	CTGCCGCCGT CTCCGCGGAC AC	DNA genómico y cDNA de	289pb en DNA y 223pb en	Este par de iniciadores sirve para distinguir entre DNA genómico y cDNA de <i>T.</i>

Sm1as1	CTGTATTGCA GCTTCCAGCA	<i>T. virens</i>	cDNA	<i>virens</i> . Se utilizó para las reacciones de RT-PCR, qRT-PCR, PCR y qPCR.
Epl1-F	GCCGCAGTCT CTGCTGATAC	DNA genómico y cDNA de <i>T. atroviride</i>	129pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR.
Epl1-R	GGGTTTGCCA GTGGTATCT			
Tvhydii1FusF	<u>agatct</u> TCTTCTG AGGCCACGG ACTCCGT	cDNA de <i>T. virens</i>	192pb	Este par de iniciadores amplifica el dominio de translocación de <i>tvhydii1</i> . Tvhydii1FusF tiene el sitio de corte para BglII. Tvhydii1FusR tiene sitio de corte para AatII (subrayado) y 15nt de la etiqueta HA (minúsculas).
Tvhydii1FusR	<u>gacgtcatatggata</u> G GCGGCACAG ACGCT			
Tacfem1FusF	<u>agatct</u> ATGAAG TTCACCTTG CTCTTGCTAC C	cDNA de <i>T. atroviride</i>	288pb	Este par de iniciadores amplifica el marco de lectura abierto <i>detacfem1</i> . Tacfem1FusF tiene el sitio de corte para BglII. Tacfem1FusR tiene sitio de corte para AatII (subrayado) y 15nt de la etiqueta HA (minúsculas).
Tacfem1FusR	<u>gacgtcatatggata</u> C TGTGCGGCGC AGAGAG			
Epl2FusF	<u>agatct</u> GTATCTT TCGATCCAGG CTACGACGAT	cDNA de <i>T. atroviride</i>	213pb	Este par de iniciadores amplifica el dominio de translocación de <i>epl2</i> . Epl2FusF tiene el sitio de corte para BglII. Epl2FusR tiene sitio de corte para AatII (subrayado) y 15nt de la etiqueta HA
Epl2FusR	<u>gacgtcatatggata</u> C TCTAGCTTGT AGCAGG			

				(minúsculas).
Tvlysm1FusF	<u>agatct</u> CTCAAT AGCCGCGCTA CCGGGT	cDNA de <i>T. virens</i>	222pb	Este par de iniciadores amplifica el dominio de translocación de <i>tvlysm1</i> . Tvlysm1FusF tiene el sitio de corte para BglII. Tvlysm1FusR tiene sitio de corte para AatII (subrayado) y 15nt de la etiqueta HA (minúsculas).
Tvlym1FusR	<u>gacgtcatatggata</u> T CTCTCACAGG TGCC			
NegFusF	<u>agatct</u> CTGACC GTCGGGAAGC TCGTA	cDNA de <i>T. atroviride</i>	273pb	Este par de iniciadores amplifica una región del gen de actina de <i>T. atroviride</i> que no cuenta con dominio de translocación RXLR ni similar, como control negativo en los ensayos de entrada de las proteínas a raíces de soya.
NegFusR	<u>gacgtcatatggata</u> G TCCCCATCTA CGAGGT			
HygF	GATCGACGTT AACTGATATT GAAGGAG	Vector pUE08	1397pb	Par de iniciadores para amplificar el marco de lectura abierto del gen que confiere resistencia a higromicina (<i>hph</i>). Se utilizan en la PCR1 para interrumpir los genes de interés.
HygR	CTATTCCTTT GCCCTCGGAC GAGTGCTG			
Tacfem1MutF	CGATTGCAAA CTCCGAACAG GCC	DNA de <i>T. atroviride</i>	2206pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tacfem1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tacfem1QuimR	TGCTCCTTCA ATATCAGTTA ACGTCGATCG			

	CGGGGATGTC AGCAACGGTC TGGCCG			
Tacfem1QuimF	CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATA GGGTTCTCCC TGCCGTTTCAG GCTCTCT	DNA de <i>T. atroviride</i>	2153pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>tcfem1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tacfem1MutR	CCATGGCCGT GCACAACACG CAT			
Tacfem1NestF	GGCTCTGTGG TTGCATCGGC CA	PCR2 de <i>tcfem1</i>	5333pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir al gen <i>tcfem1</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tacfem1NestR	CCTCAGGTTC GTGCCTTGGC CA			
Epl2MutF	CGAGTTTAGT CGCCGACCAA AAGAGCT	DNA de <i>T. atroviride</i>	2062pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>epl2</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Epl2QuimR	TGCTCCTTCA ATATCAGTTA ACGTCGATCG GTGGCAGTGA TGGCTGTGAC GAGTGTAGC			
Epl2QuimF	CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATA GGGGCTGTGG CCTCCCAAAT GCACAT	DNA de <i>T. atroviride</i>	2058pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>epl2</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Epl2MutR	GCCGTTTCTT CTGGGCTGTG CGAA			

Epl2NestF	GGGACCGTCT GTGAGTGCCA CT	PCR2 de <i>epl2</i>	4995pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir el gen <i>epl2</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Epl2NestR	GGGCCAGCG AGATGGCAAC TACA			
Tatrx2MutF	CGGATAACGC ATGGGATAGA CGT	DNA de <i>T. atroviride</i>	2115pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tatrx2</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tatrx2QuimR	TGCTCCTTCA ATATCAGTTA ACGTCGATCG GCGCCCATCA GGCCAAAAG C			
Tatrx2QuimF	CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATA GCACTGTCAA GGTCCCTGAG CCCCC	DNA de <i>T. atroviride</i>	2278pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>tatrx2</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tatrx2MutR	CCTCTTCTG TAGGCCTGGC G			
Tatrx2Nest2F	CAACACAGCC ATGGTGATCC TGAG	PCR2 de <i>tatrx2</i>	5163pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir al gen <i>tatrx2</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tatrx2Nest2R	TGCGCTTGTA TCGCCAGAAA GTCG			
Tamp1MutF	CCCACCAAAG CCAATCTAGC TGGGA	DNA de <i>T. atroviride</i>	2036pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tamp1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tamp1QuimR	TGCTCCTTCA ATATCAGTTA ACGTCGATCG CGCGATGCCA			

	CCAGAGGCGC CAGGA			
Tamp1QuimF	CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATA GGCCTCCAGC AAATATTTGG CCTGT	DNA de <i>T. atroviride</i>	2093pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>Tamp1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.15
Tamp1MutR	CATATGGGGC GATAAACCGC			
Tamp1NestF	GGCAAGGCC ACTGCCATCG CCT	PCR2 de <i>tamp1</i>	5119pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir el gen <i>tamp1</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tamp1NestR	GCCGCGAATC GCTTGCCGGA			
Arg2F	GACCAAGGA GATTGACGGC GGCGTGGA	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	2745pb	Par de iniciadores que amplifican el gen silvestre de la subunidad pequeña de la carbamoil fosfato sintasa (<i>arg2</i>) de <i>T. virens</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir los genes de interés.
Arg2R	TTAAGCAAAG CCGACAAGA GGAACAGGC			
Tvhydii1MutF	CGGACAGAC GGAAATGATG TG	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	1999pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tvhydii1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvhydii1QuimR	ACCGTCTCCA CGCCGCCGTC AATCTCCTTG GTCGGAAGT CATCTTGACT GATGGG			

Tvhydi1QuimF	TCGAGCCTGT TCCTCTTGTC GGCTTTGCTT AAGCACACAT TCGCCAAACC CTTGGCCGA	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	2004pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>tvhydi1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvhydi1MutR	GGCTAAAATC ACCCCCAGA C			
Tvhydi1NestF	GGCTGAGCTG ATCCACTCGA GGG	PCR2 de <i>tvhydi1</i>	6050pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir el gen <i>tvhydi1</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tvhydi1NestR	GCGAAGGTGC GGCCATGAAC ACG			
Tvlysm1MutF	GAGGCGCCA AGTTGCAGCA TCAT	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	1791pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tvlysm1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvlysm1QuimHigR	TGCTCCTTCA ATATCAGTTA ACGTCGATCT TGATCCTGAA TCTCTCGACG GG			
Tvlysm1QuimHigF	CCCAGCACTC GTCCGAGGGC AAAGGAATA GCAAGACCCC CTCCCCATT CAGCCCGA	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	1836pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>tvlysm1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvlysm1MutR	GTTGCAGCTT CCTGCACCAA			
Tvlysm1Nest3F	AGCCGGGATC TGTCAGGGTG	PCR2 de <i>tvlysm1</i>	5195pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir el gen

Tvlysm1Nest3R	GCTTCGACGA CTGCGCCAGC			<i>tvlysm1</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tvsep1MutF	CACCAAGGA GCATCTCGGG G	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	2035pb	Par de iniciadores que amplifican la región río arriba de <i>tvsep1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvsep1QuimR	ACCGTCTCCA CGCCGCCGTC AATCTCCTTG GTCGGTCGCC AGCAGCGAC ACAAAC			
Tvsep1QuimF	TCGAGCCTGT TCCTCTTGTC GGCTTTGCTT AAGGGATGTA AGCGAGTCCC CTGCG	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	2149pb	Par de iniciadores que amplifican la región río abajo de <i>tvsep1</i> . Se utilizan en la PCR1 para interrumpir el gen.
Tvsep1MutR	GGGGGAAAG AGATATACCA GGCCA			
Tvsep1Nest2F	GTCCGCAATA GTCCTCGACT AGCC	PCR2 de <i>tvsep1</i>	6693pb	Par de iniciadores que amplifican la construcción para interrumpir el gen <i>tvsep1</i> . Se utilizan en la PCR3 para interrumpir el gen.
Tvsep1Nest2R	CTCCTAGGGT CGATTTGCTG GGGA			
ArgExtR	CGCCGTCAAT CTCCTTGGTC	DNA de las transformantes de <i>T. virens</i>		Se utiliza junto con los iniciadores "ExtF" para verificar si la construcción para interrumpir los genes se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus.

ArgExtF	TGTCCTCTT GTCGGCTTTG C			Se utiliza junto con los iniciadores "ExtR" para verificar si la construcción para interrumpir los genes se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus.
Tvlysm1ExtF	CCAGACGGGC AACCTCGTA	DNA de las transformantes <i>Δtvlysm1</i>	2148pb	Junto con el iniciador ArgExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>tvlysm1</i> .
Tvlysm1ExtR	CCAGCAAGTG GGGTAATGGA AG	DNA de las transformantes <i>Δtvlysm1</i>	2168pb	Junto con el iniciador ArgExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>tvlysm1</i> .
Tvsep1ExtF	TCCTCGGGCT CCCAATGAGA	DNA de las transformantes <i>Δtvsep1</i>	2262pb	Junto con el iniciador ArgExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>tvsep1</i> .
Tvsep1ExtR	TGTGGAAGAG GTGACGCCCG	DNA de las transformantes <i>Δtvsep1</i>	2511pb	Junto con el iniciador ArgExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>tvsep1</i> .

Tvhydii1ExtF	GCCGTAGGAC AGCCGCATAA	DNA de las transformantes <i>Δtvhydii1</i>	1863pb	Junto con el iniciador ArgExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>tvhydii1</i> .
Tvhydii1ExtR	TCGAAGATGA GCACGCCAC	DNA de las transformantes <i>Δtvhydii1</i>	2184pb	Junto con el iniciador ArgExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>tvhydii1</i> .
HygExtF	CGTCCGAGGG CAAAGGAAT AG	DNA de las transformantes de <i>T. atroviride</i>		Se utiliza junto con los iniciadores "ExtF" para verificar si la construcción para interrumpir los genes se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus.
HygExtR	CCACTAGCTC CAGCCAAGCC			Se utiliza junto con los iniciadores "ExtR" para verificar si la construcción para interrumpir los genes se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus.
Tatrx2ExtF	GGCTTTTGGC GATAAGGAA GC	DNA de las transformantes <i>Δtatrx2</i>	2176pb	Junto con el iniciador AHygExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>tatrx2</i> .

Tatrx2ExtR	AATGGATCGT TGTCGCCCGG	DNA de las transformantes <i>Δtatrx2</i>	2360pb	Junto con el iniciador HygExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>tatrx2</i> .
Tacfem1ExtF	GGCAACAGCT AGTGTCGCC	DNA de las transformantes <i>Δtaefem1</i>	2374pb	Junto con el iniciador AHygExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>taefem1</i> .
Tacfem1ExtR	CTTGAACCGA GCCCGAATGC	DNA de las transformantes <i>Δtaefem1</i>	2303pb	Junto con el iniciador HygExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>taefem1</i> .
Epl2ExtF	GACCGGTTGC CAGCAATGGC	DNA de las transformantes <i>Δepl2</i>	2205pb	Junto con el iniciador AHygExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>epl2</i> .
Epl2ExtR	GTCCGTGCTT ATGGCCATGG	DNA de las transformantes <i>Δepl2</i>	2228pb	Junto con el iniciador HygExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>epl2</i> .

Tamp1ExtF	CCGAATCCAG CGACTTTGCA AC	DNA de las transformantes <i>Δtamp1</i>	2364pb	Junto con el iniciador AHygExtR, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río arriba del locus de <i>tamp1</i> .
Tamp1ExtR	ACAGGCCGCT GAGTGGCTGA	DNA de las transformantes <i>Δtamp1</i>	2216pb	Junto con el iniciador HygExtF, se utilizan para verificar que la construcción para interrumpir al gen se insertó en el locus correcto. Amplifican río abajo del locus de <i>tamp1</i> .
Tacfem1SER	<u>aagctt</u> TTACTGT GCGGCGCAG A	cDNA de <i>T. atroviride</i>	282pb	Junto con el oligo Tacfem1GFPS F. Amplifican el marco de lectura abierto de <i>tacfem1</i> para sobreexpresarlo en pUE08. Este iniciador tiene sitio de corte para EcoRV (subrayado).
Tacfem1GFPSE F	<u>gatatc</u> ATGAAG TTCACCTCTG CTCTTGCTAC C	Vector pTacfem1-GFP	1089pb	Para amplificar de pTacfem1-GFP el marco de lectura abierto completo de <i>tacfem1</i> fusionado a GFP y sobreexpresarlo en el vector pUE08. El iniciador Tacfem1GFPSEF tiene sitio de corte para EcoRV. El iniciador Tacfem1GFPSER tiene sitio de corte HindIII (subrayados).
Tacfem1GFPSE R	<u>aagctt</u> TCACTTG TACAGCTCGT CCATGCC			
Tvhydi1CompF	<u>ctcgag</u> AATCAA GAAAGATGC ACGCG	DNA de <i>T. virens</i> 29.8	1935pb	Amplifican el gen de <i>tvhydi1</i> con 1500pb río arriba, para complementar

Tvhydi1CompR	<u>gatatc</u> TTAGAA AGCAGGGGG GAGGG			la mutante $\Delta tvhydi1$. El iniciador Tvhydi1CompF tiene sitio de corte para XhoI, y el iniciador Tvhydi1CompR tiene sitio de corte para EcoRV. Para clonar en el vector pUE08.
PR1b-F	CCCACAAGAT TATCTAAGGG TTCAC	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	77pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR
PR1b-R	CCCTCTCGTC CCACTGCAT			
PR5-F	ACAGGCTGCA ACTTTGACG	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	139pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR
PR5-R	ACAGGCTGCA ACTTTGACG			
PDF1.2-F	CGGCAATGGT GGAAGCA	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	79pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR
PDF1.2-R	CATGCATTAC TGTTCCGCA AA			
LOX2-F	TCGTGTTGGA TTATCATGAT TTG	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	126pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR
LOX2-R	CAACAGGCCT CAATGTGCT			
SID2-F	TCCGTGACCT TGATCCTTTC	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	124pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR y qRT-PCR
SID2-R	ACAGCGATCT TGCCATTAGG			

JIN1-F	GCGTTGATGG ATTTGGAGTT	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	223pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT- PCR y qRT-PCR
JIN1-R	AAATTACTGA AGCCACTAAA ACGAA			
ACT11-S	TTCAACACTC CTGCCATG	DNA y cDNA de <i>A. thaliana</i>	~100pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de RT- PCR y qRT-PCR
ACT11-AS	TGCAAGGTCC AAACGCAG			
APT-F	CCATGAGGAA ACCCAAGAA GT	DNA de <i>S.</i> <i>lycopersicu</i> <i>m</i>	~900pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de PCR y qPCR
APT-R	CCTCCAGTCG CAATTAGATC AT			
EXPRESSED-F	GCTAAGAACG CTGGACCTAA TG	DNA de <i>S.</i> <i>lycopersicu</i> <i>m</i>	~300pb	Par de iniciadores utilizados para las reacciones de PCR y qPCR
EXPRESSED-R	TGGGTGTGCC TTTCTGAATG			
Tvlysm1 Cherry F	<u>ggatcc</u> ATGAAG AATCTTTTGC TTG	cDNA de <i>T. virens</i>	2382pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>tvlysm1</i> . se utilizaron en la PCR1 para fusionar a mCherry. El iniciador Tvlysm1Cherry F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>BamHI</i> (subrayado).
Tvlysm1 Cherry Quim R	CATGTTATCC TCCTCGCCCT TGCTCACCAT GCTCAGTATG CTATGATTTA TCAGATACAT G			

Tvlysm1SE R	<u>gaattc</u> TCAGCT CAGTATGCTA TGA	cDNA de <i>T. virens</i>	2352pb	Junto con el iniciador Tvlysm1Cerry F, se utilizaron para amplificar el marco de lectura abierto del gen <i>tvlysm1</i> , y generar las cepas sobreexpresantes. El iniciador Tvlysm1SE R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>EcoRI</i> (subrayado).
Tatrx2 Cherry F	<u>ggatcc</u> ATGCAT CACAAGCGTC TTGCT	cDNA de <i>T. atroviride</i>	1521pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>tatrx2</i> . se utilizaron en la PCR1 para fusionar a mCherry. El iniciador Tatrx2Cherry F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI (subrayado).
Tatrx2 Cherry Quim R	CATGTTATCC TCCTCGCCCT TGCTCACCAT CAGCTCATCG TGCTCGTCCT			
Tatrx2 SE R	<u>aagctt</u> CAAGTT GGTGATCAAA TTCG	cDNA de <i>T. atroviride</i>	1749pb	Par de iniciadores que se utilizaron para amplificar el marco de lectura abierto del gen <i>tatrx2</i> , y generar las cepas sobreexpresantes. El iniciador Tatrx2SE R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HndIII (subrayado). El iniciador Tatrx2SE F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>BamHI</i> (subrayado).
Tatrx2 SE F	<u>ggatcc</u> ATTCTT TTCCTGCATC ACCAC			
Tacfem1 Cherry F	<u>ggatcc</u> ATGAAG TTCACTCTTG CTCTTGC	cDNA de <i>T. atroviride</i>	303pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>tacfem1</i> .

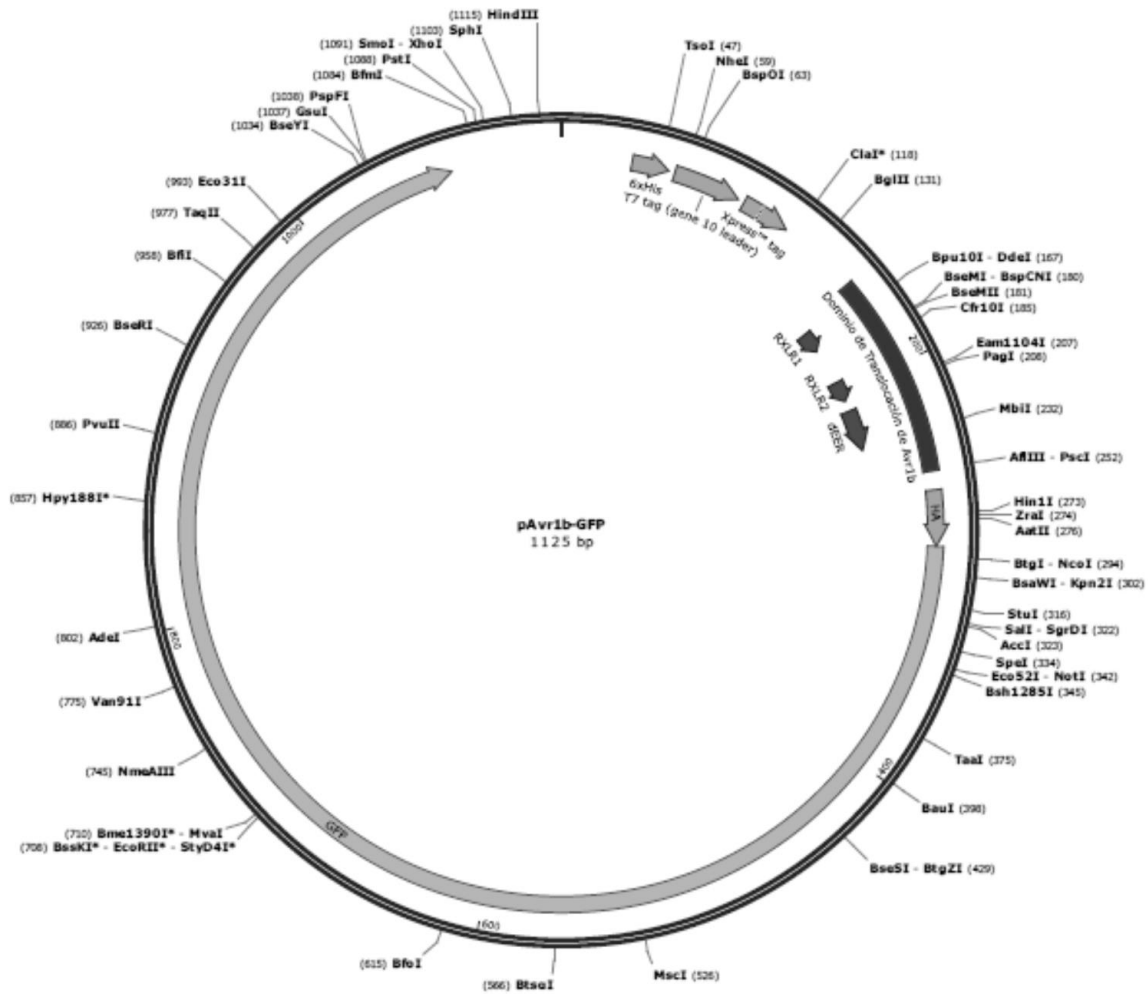
Tacfem1Cherry Quim R	CATGTTATCC TCCTCGCCCT TGCTCACCAT CTGTGCGGCG CAGAGAGCCT			seutilizaron en la PCR1 para fusionar a mCherry. El iniciador Tacfem1Cherry F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>BamHI</i> (subrayado).
Tacfem1SE F	<u>ggatcc</u> GCTGCC TGCCTTCGAG TTCA	cDNA de <i>T.</i> <i>atroviride</i>	536pb	Par de iniciadores que se utilizaron para amplificar el marco de lectura abierto del gen <i>tacfem1</i> , y generar las cepas sobreexpresantes. El iniciador Tacfem1SE R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>HindIII</i> (subrayado). El iniciador Tacfem1SE F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>BamHI</i> (subrayado).
Tacfem1 SE R	<u>aagctt</u> CGGAAT ATAGTCTTTT GGAACC			
Epl2 Cherry F	<u>ggatcc</u> ATGCAG CTCTCAAATA TCTTCACCG	cDNA de <i>T.</i> <i>atroviride</i>	471pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>epl2</i> .
Epl2 Cherry Quim R	CATGTTATCC TCCTCGCCCT TGCTCACCAT ATTTGCTTTA TGTGCATTTG GG			seutilizaron en la PCR1 para fusionar a mCherry. El iniciador Epl2Cherry F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>BamHI</i> (subrayado).

Epl2 SE R	<u>aagctt</u> TTAATTT GCTTTATGTG CATTTGGGAG GCC	cDNA de <i>T. atroviride</i>	450pb	Junto con el iniciador Epl2Cerry F, se utilizaron para amplificar el marco de lectura abierto del gen <i>tvlysm1</i> , y generar las cepas sobreexpresantes. El iniciador Epl2SE R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>HindIII</i> (subrayado).
Tvhydi1 Cherry F	<u>ggatcc</u> ATGCAG TTCCTCGCCG TTGCCGCTCT	cDNA de <i>T. virens</i>	342pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>tvhydi1</i> . se utilizaron en la PCR1 para fusionar a mCherry. El iniciador Tvhydi1Cherry F tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI (subrayado).
Tvhydi1 Cherry Quim R	CATGTTATCC TCCTCGCCCT TGCTCACCAT GAAAGCAGG GGGGAGGGG ATCAGTGCAG AG			
Tvhydi1 SE R	<u>aagctt</u> TTAGAA AGCAGGGGG GAGGGGA	cDNA de <i>T. virens</i>	321pb	Junto con el iniciador Tvhydi1Cerry F, se utilizaron para amplificar el marco de lectura abierto del gen <i>tvhydi1</i> , y generar las cepas sobreexpresantes. El iniciadorTvhydi1SE R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción <i>HindIII</i> (subrayado).
mCherry- F	ATGGTGAGCA AGGGCGAGG A	vector pRSET-B- mCherry	717pb	Par de iniciadores utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>mcherry</i> . se utilizaron en la PCR1 para las fusiones a mCherry. El iniciador HindIII-mCherry R tiene un sitio de reconocimiento
HindIII mCherry R	<u>aagctt</u> CTACTTG TACAGCTCGT CCATGC			

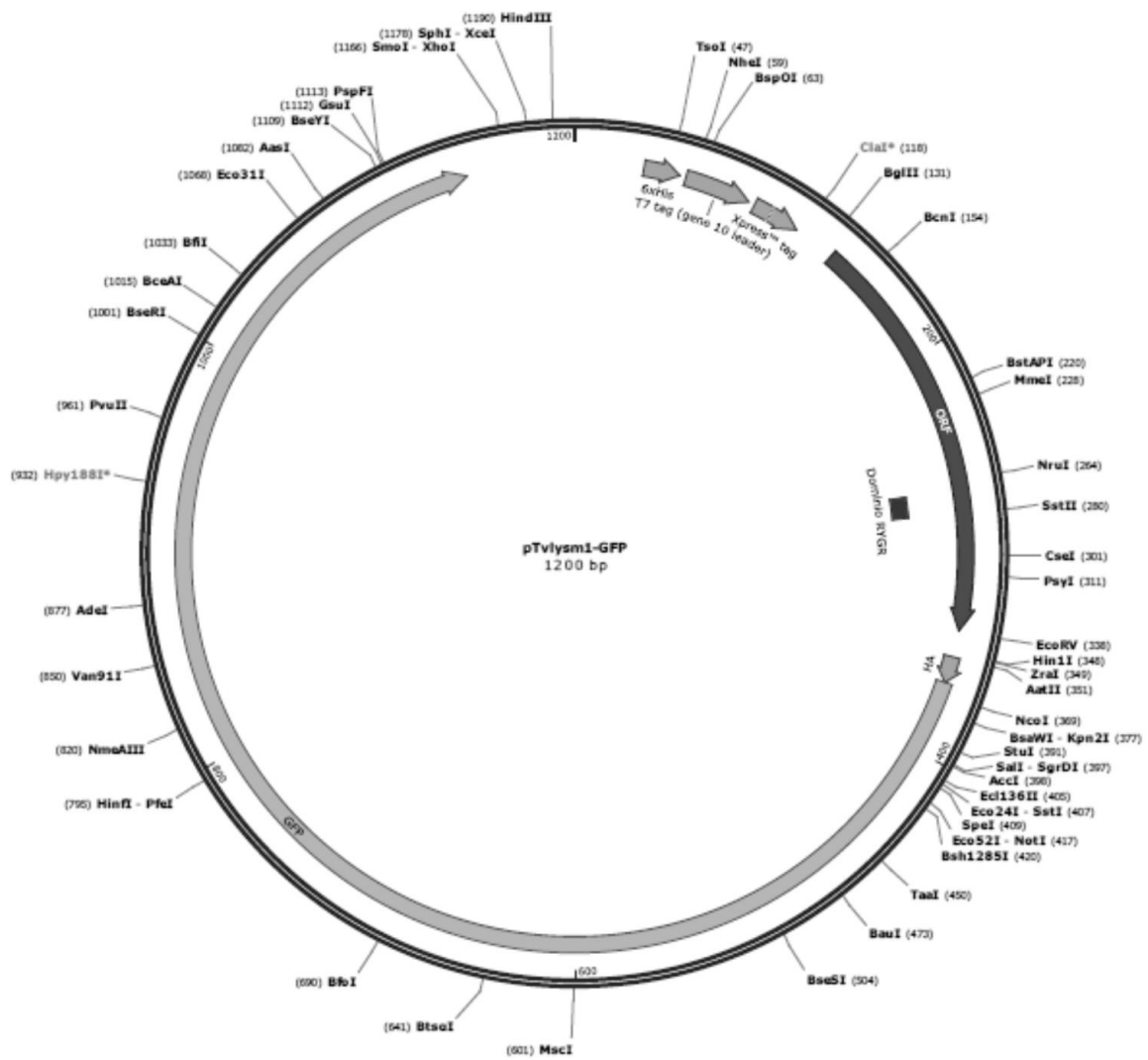
				para la enzima de restricción <i>HindIII</i> (subrayado).
EcoRI mCherry R	<u>gaattc</u> CTACTTG TACAGCTCGT CCATGC	vector pRSET-B- mCherry	717pb	Junto con el iniciador mCherry-F, utilizados para amplificar el marco de lectura abierto de <i>mcherry</i> . se utilizaron en la PCR1 para las fusiones a mCherry. El iniciador EcoRI-mCherry R tiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI (subrayado).

APÉNDICE B. Mapas de vectores y fusiones.

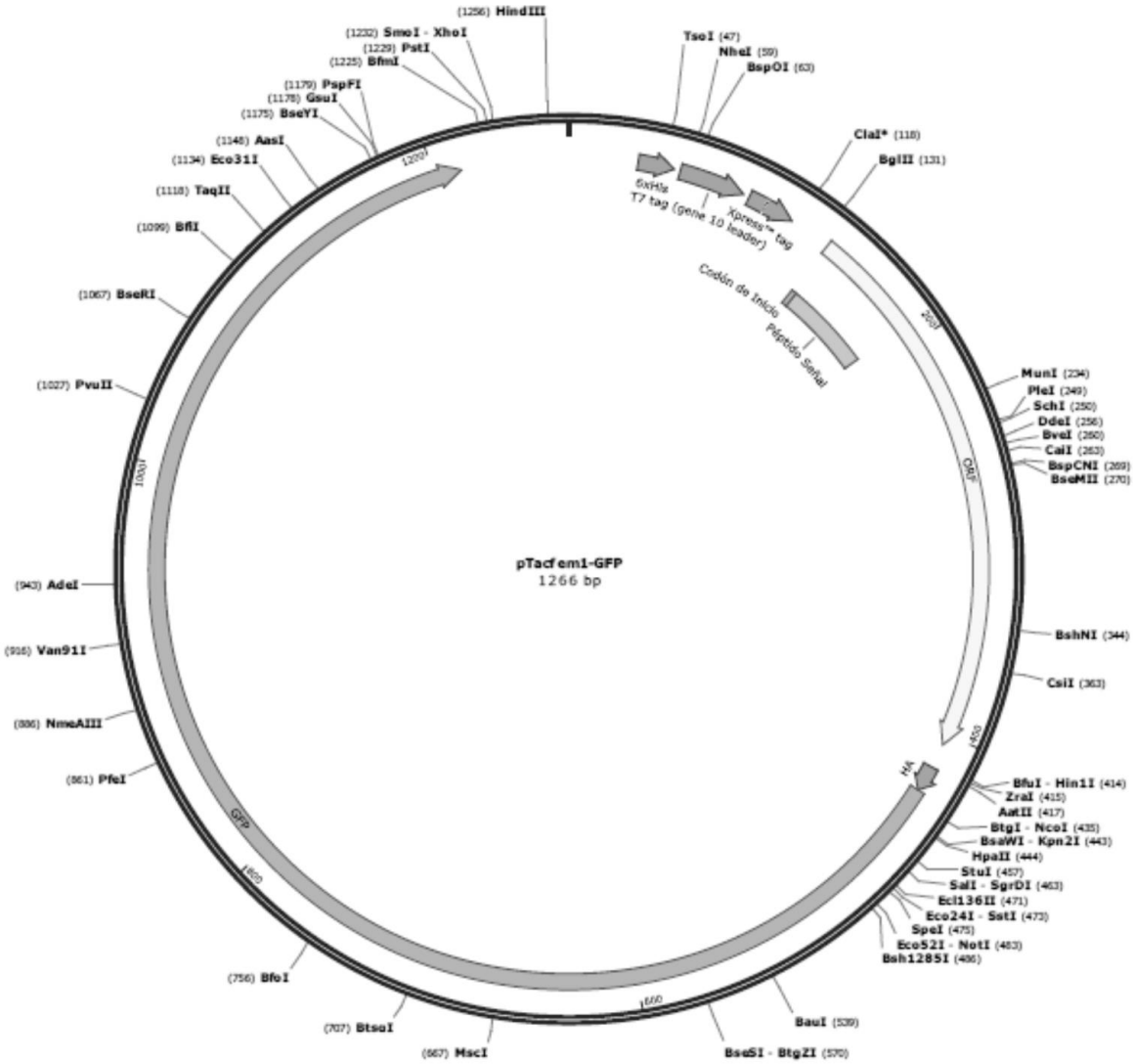
Vector pAvr1b-GFP (~4500pb)



Vector pTvlism1-GFP (~4500pb)



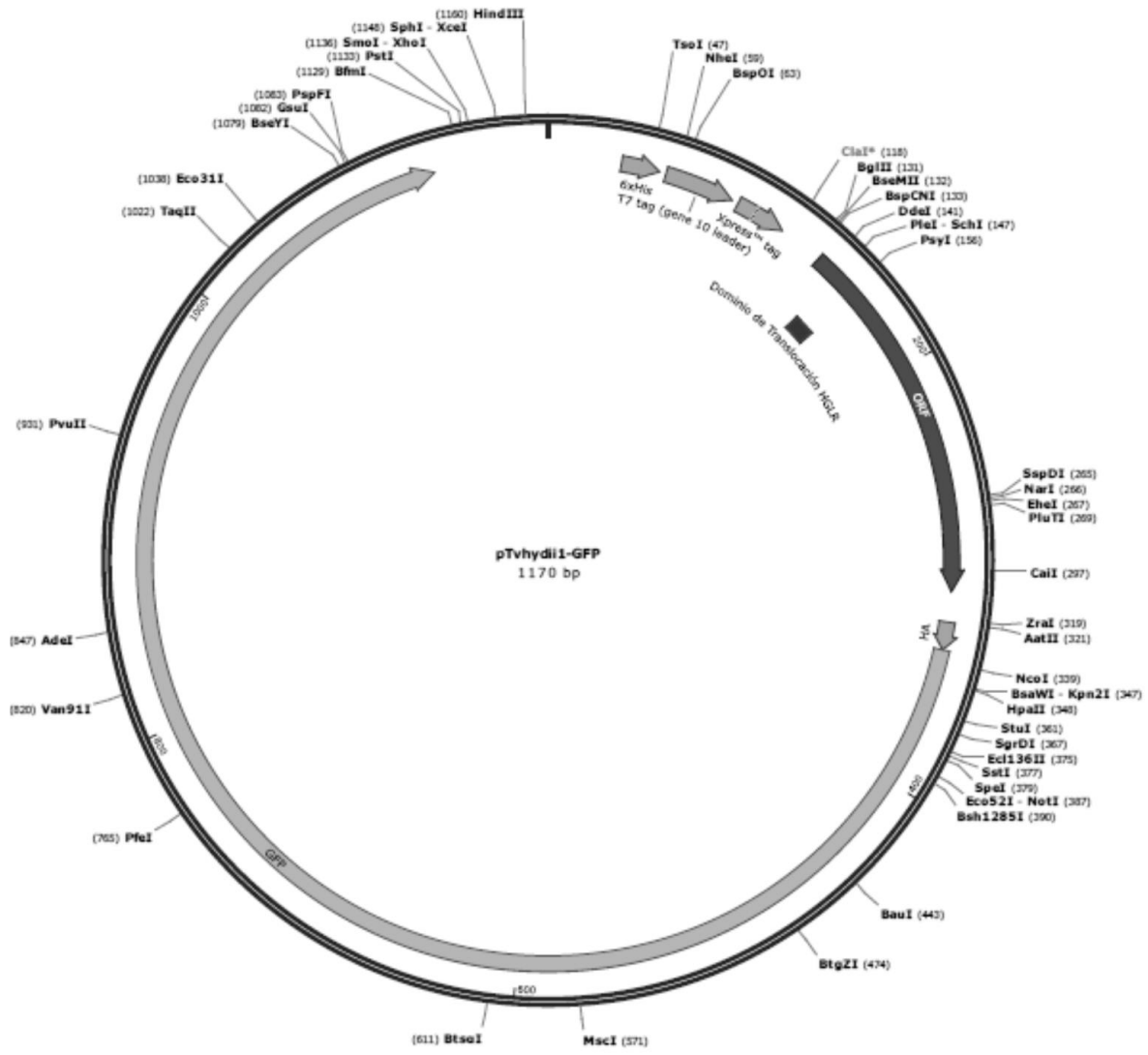
Vector pTacem1-GFP (~4500pb)



Vector pEpI2-GFP (~4500pb)



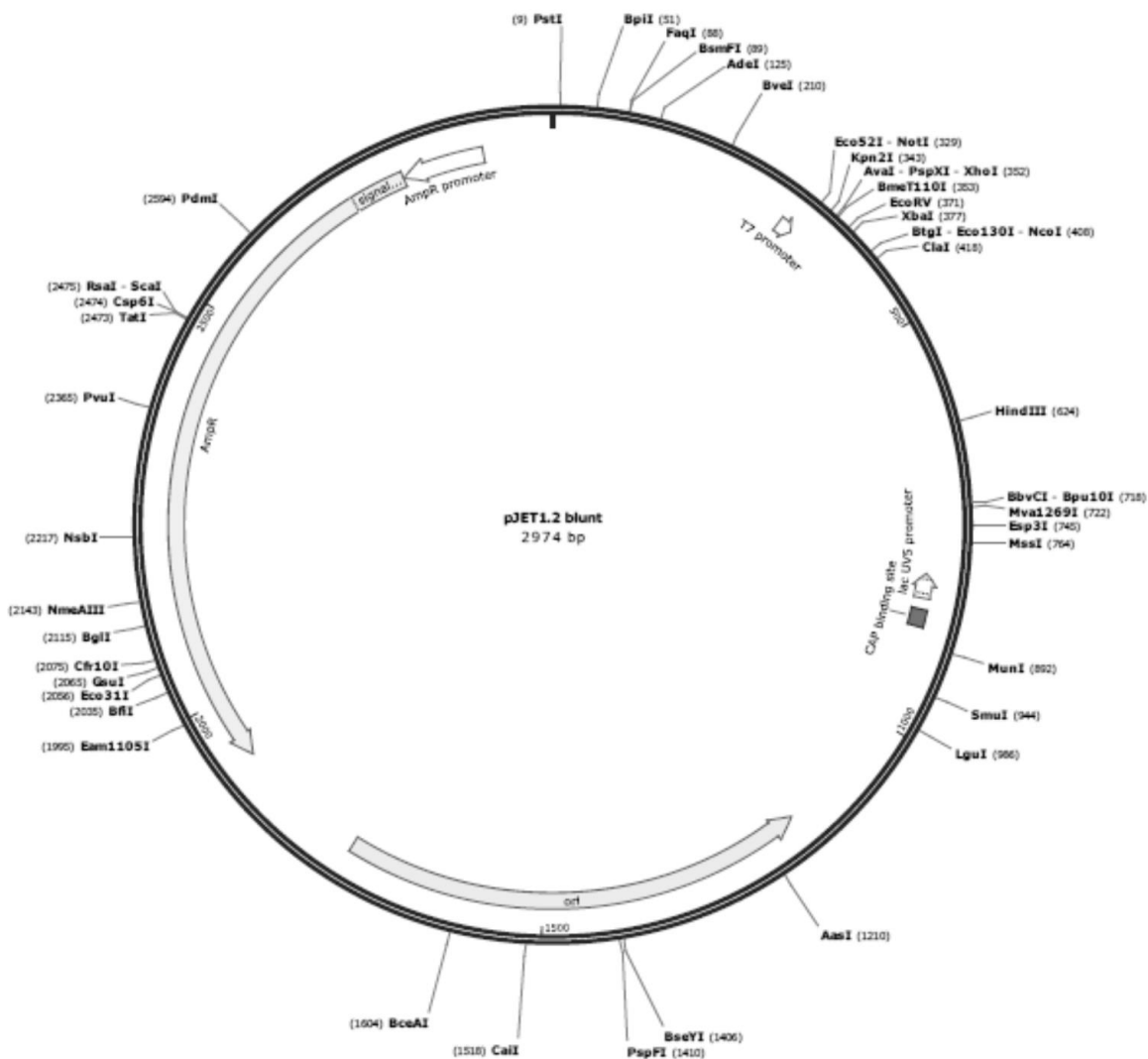
Vector pTvhydii1-GFP (~4500pb)



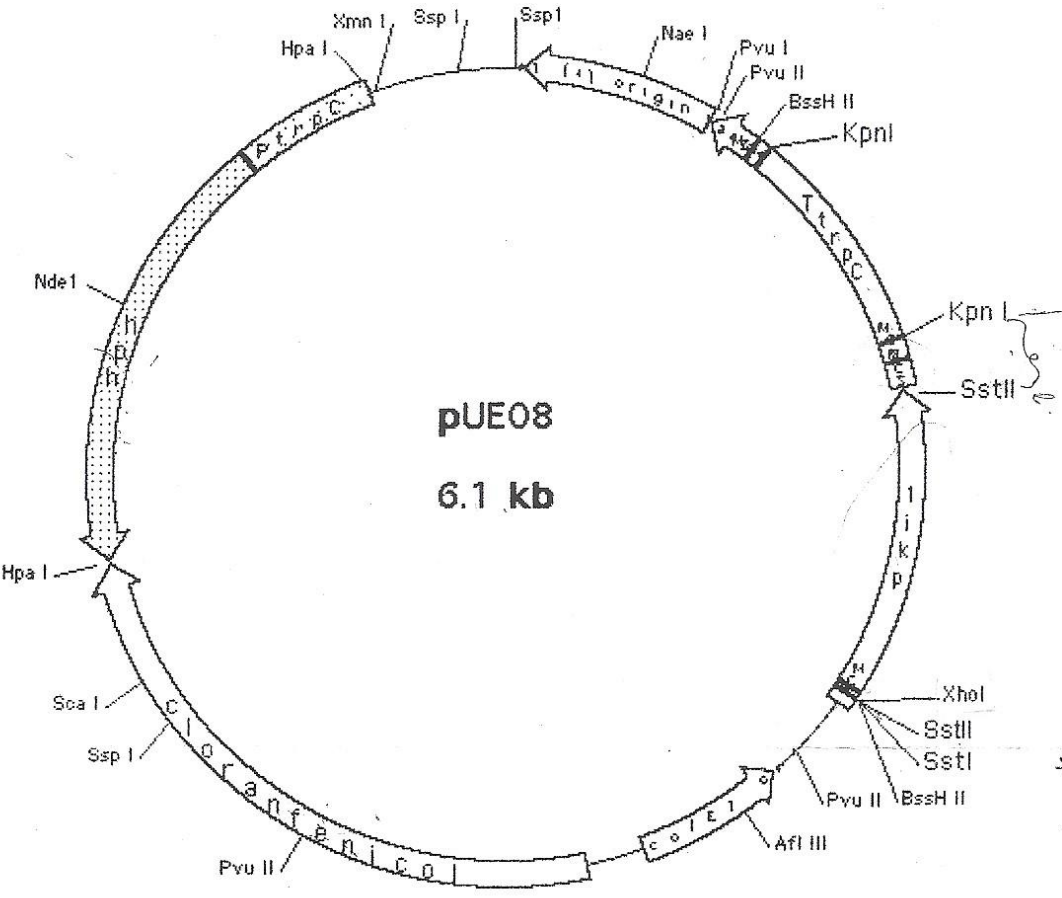
Vector pNeg-GFP (~4500pb)



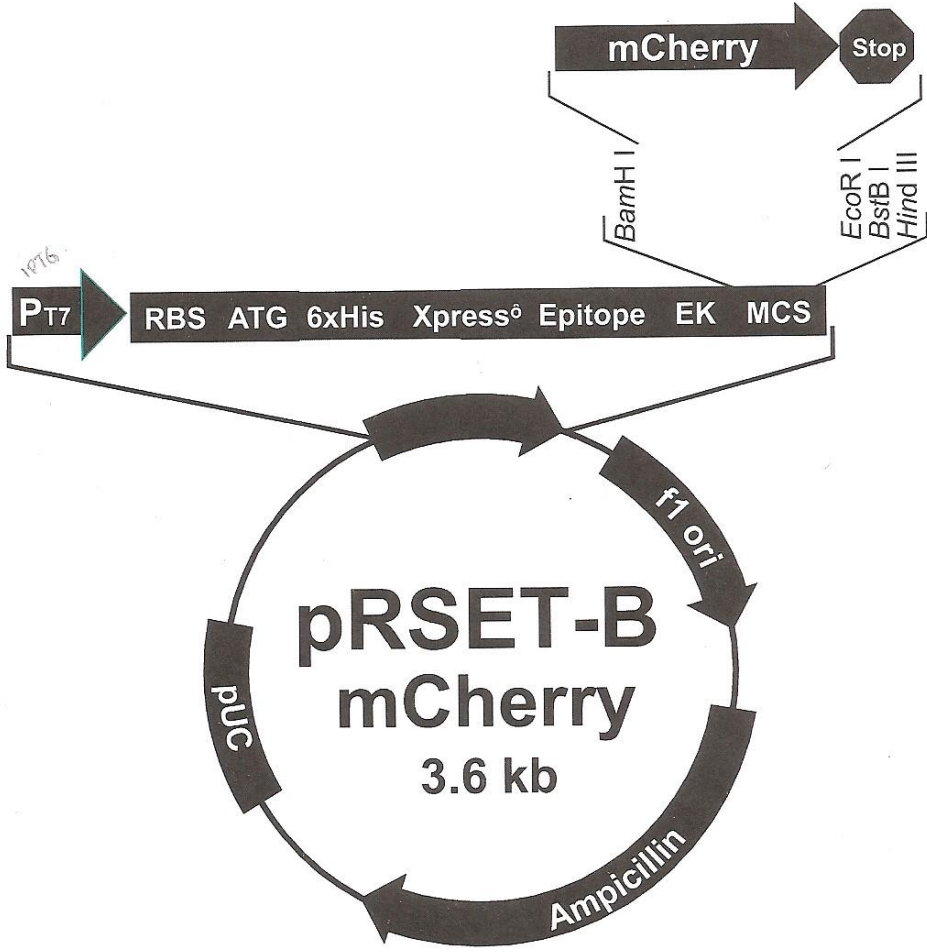
Vector pJET 1.2/Blunt (2974pb)



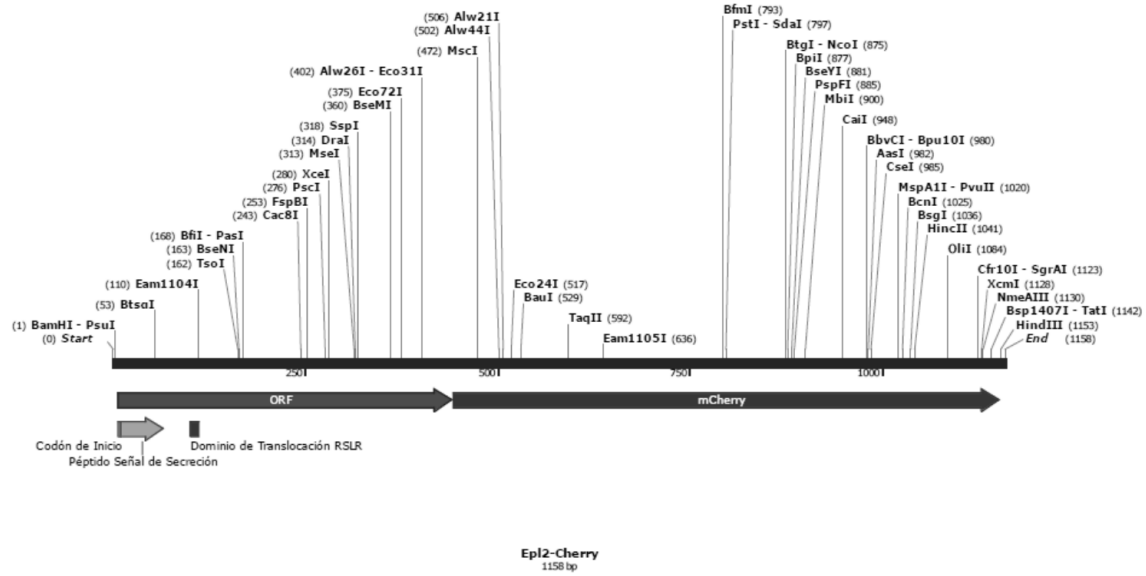
Vector pUE08



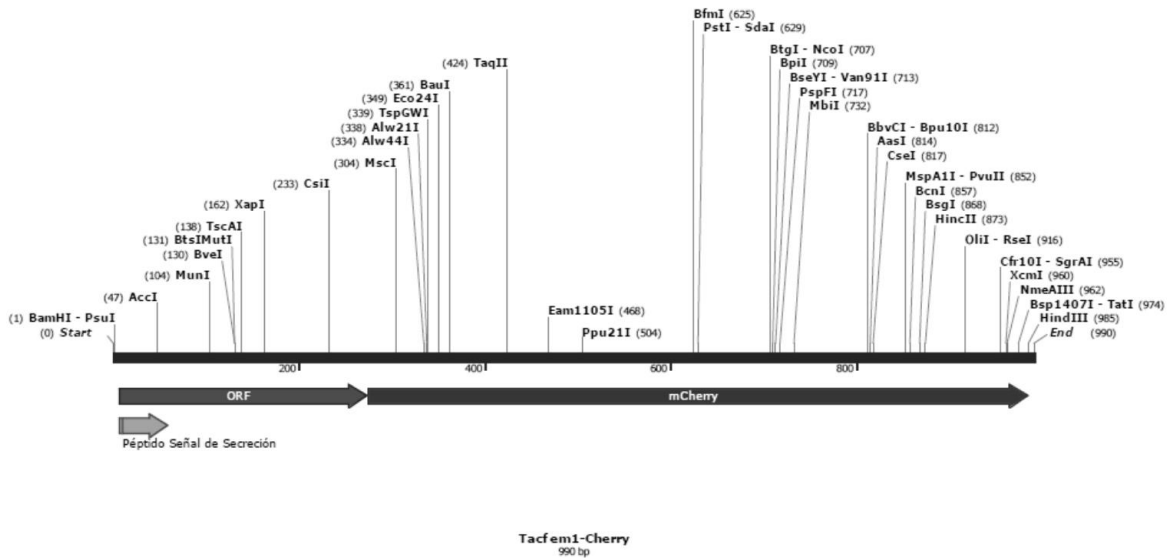
Vector pRSETB-mCherry.



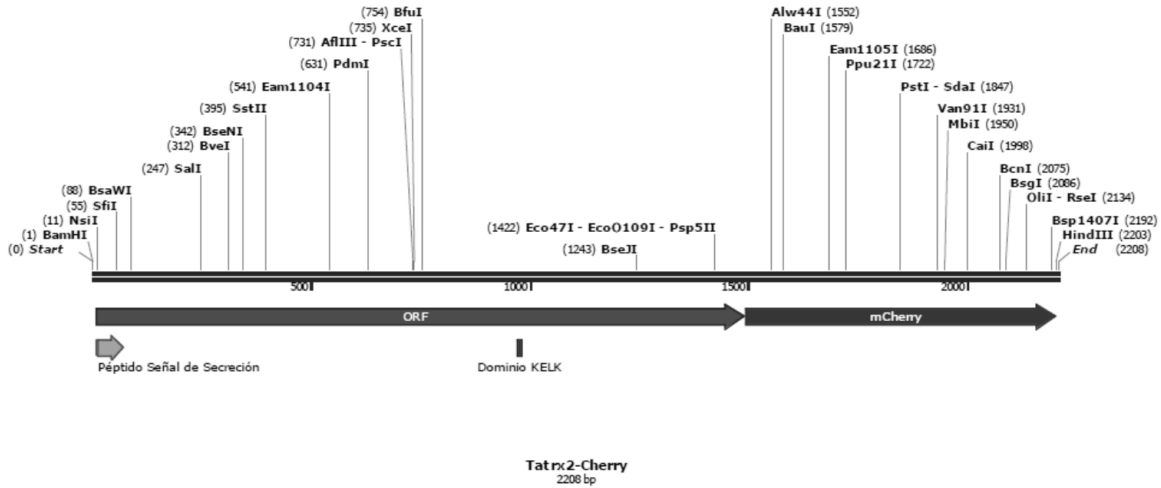
Fusión Epl2-Cherry.



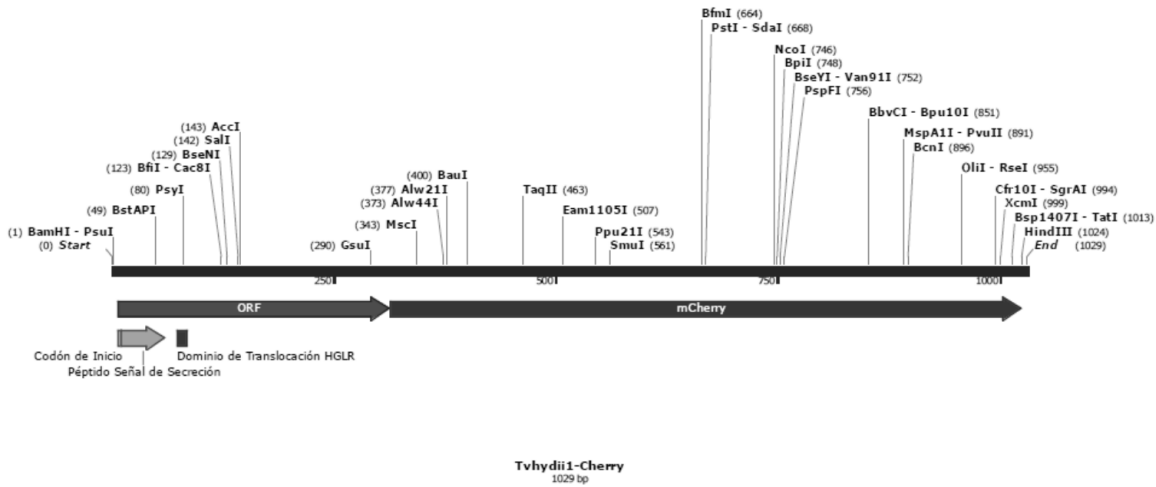
Fusión Tacfem1-Cherry.



Fusión Tatr2-Cherry.



Fusión Tvhydi1-Cherry.



APÉNDICE C. Medios de cultivo

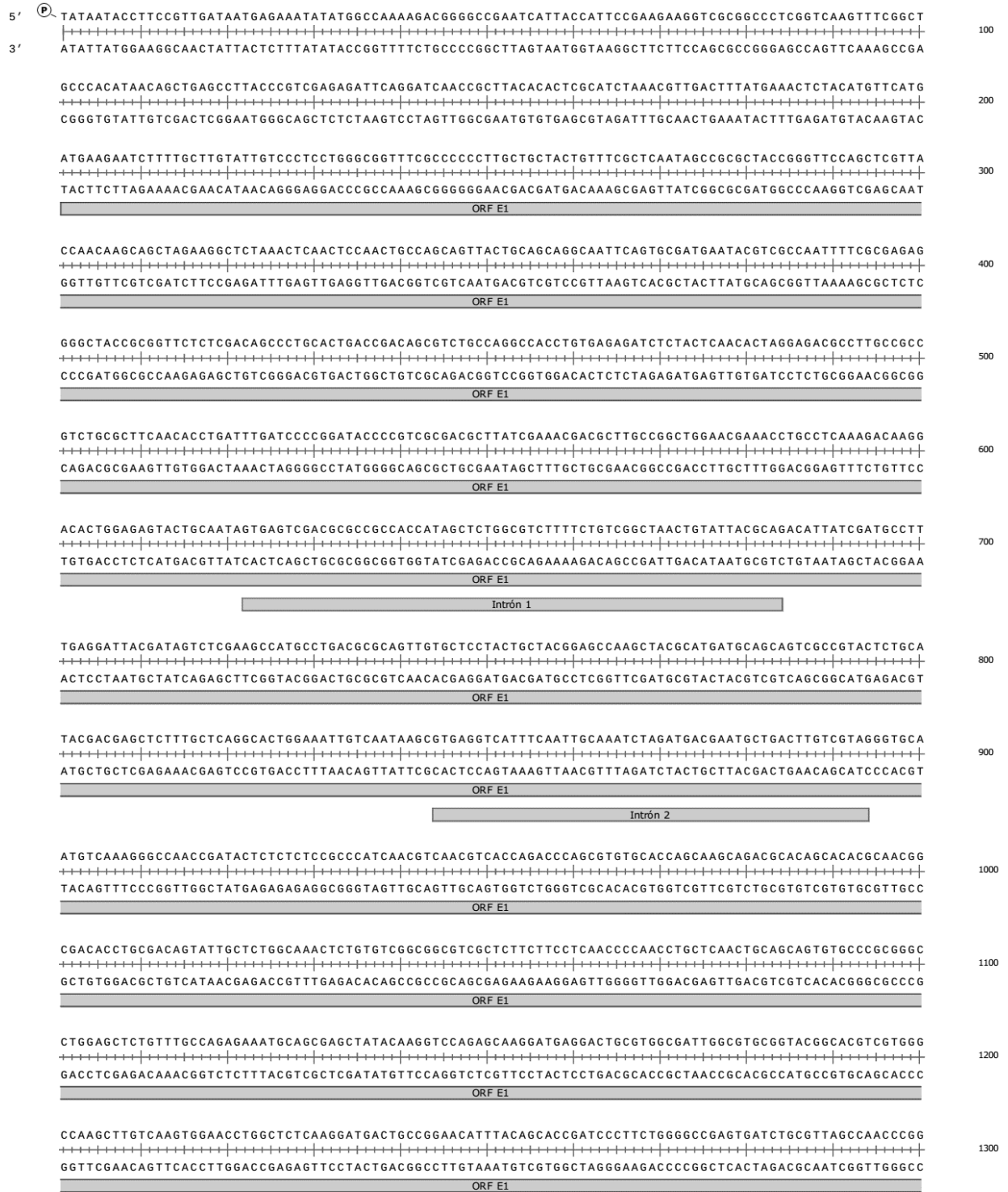
MEDIO	COMPOSICIÓN (100mL)
Murashige - Skoog (MS) 1X	0.445g medio Murashige & Skoog (Phyto Technology Laboratories)
	3g de sacarosa (Bioxon)
	0.7g de agar bacteriológico (Bioxon)
Murashige - Skoog (MS) 0.2X	0.089g medio Murashige & Skoog (Phyto Technology Laboratories)
	0.6g de sacarosa (Bioxon)
	0.7g de agar bacteriológico (Bioxon)
Medio Luria Bertani (LB)	1% de Cloruro de sodio (Karal)
	1% de peptona biotriptasa (Bioxon)
	0.5% de extracto de levadura (Bioxon)
Agar Luria Bertani (LBA)	1% de Cloruro de sodio(Karal)
	1% de peptona biotriptasa (Bioxon)
	0.5% de extracto de levadura (Bioxon)
	1.5% de agar bacteriológico (Bioxon)
Caldo papa dextrosa (PDB)	2.4g de medio caldo papa dextrosa (Difco).
Medio agar papa dextrosa (PDA)	3.9g de medio agar papa dextrosa (Difco)
PDA selectivo	3.9g de medio agar papa dextrosa (Difco)
	9.1% de sorbitol (Golden Bell)
PDA suave	2.4g de medio caldo papa dextrosa (Difco).

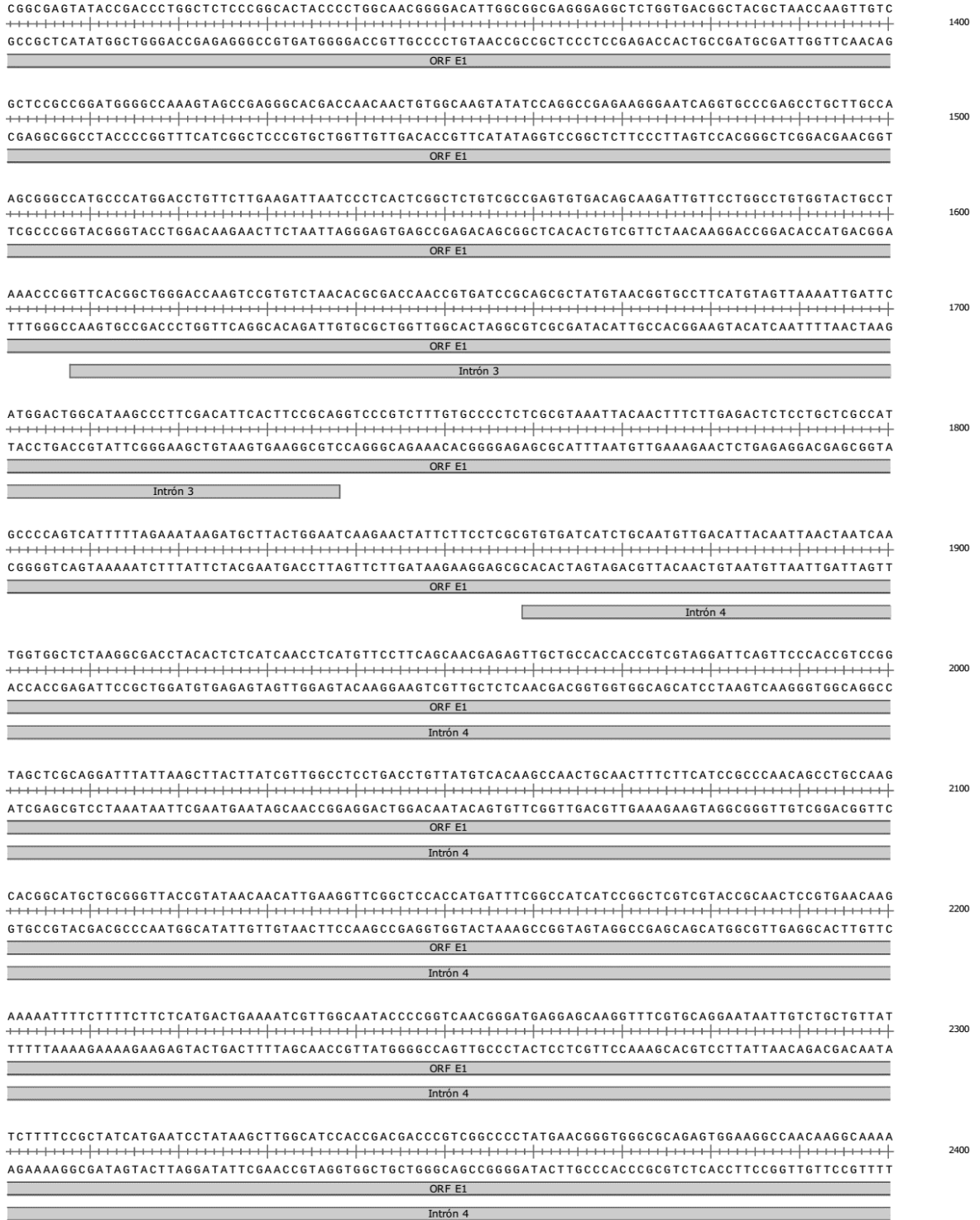
	18.2% de sorbitol (Golden Bell)	
	0.7% de agar bacteriológico (Bioxon)	
Medio mínimo Vogel 50X	Solución de macroelementos (750mL)	150g de citrato de sodio pentahidratado
		250g de fosfato diácido de potasio
		100g de nitrato de amonio
		10g de sulfato de magnesio heptahidratado
		5g de cloruro de calcio dihidratado
	Solución de biotina (100mL)	5mg de biotina
		100mL etanol al 50%
	Solución de elementos traza (50mL)	2.5g de ácido cítrico monohidratado
		2.5g de sulfato de zinc heptahidratado
		0.5g de sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado
0.125g de sulfato de cobre pentahidratado		
0.025g de sulfato de manganeso monohidratado		
0.025g de ácido bórico		
0.025g de molibdato de sodio dihidratado		
Se esterilizan todas las soluciones, a la solución de macroelementos se le agregan 5mL de la solución de biotina y 5mL de la solución de elementos traza y se afora a 1L. Todo en esterilidad.		
Medio mínimo Vogel 1X	2mL de medio Vogel 50X	
	1.5% de sacarosa (Bioxon)	
	1.5% de agar bacteriológico (Bioxon)	
Vogel selectivo	100mL medio mínimo Vogel 1X	
	9.1% de sorbitol (Golden Bell)	
Vogel suave	2mL de medio Vogel 50X	
	1.5% de sacarosa (Bioxon)	
	18.2% de sorbitol (Golden Bell)	
	0.7% de agar bacteriológico (Bioxon)	
Medio Mínimo de Trichoderma (MMT)	0.2g de sulfato de magnesio heptahidratado	
	0.9g de difosfato de potasio	
	0.2g de cloruro de potasio	

para 1L	1g de nitrato de amonio
	2mg de sulfato de hierro heptahidratado
	2mg de sulfato de zinc heptahidratado
	2mg de cloruro de manganeso heptahidratado
	2g de asparagina
	20g de glucosa
	20g de agar bacteriológico

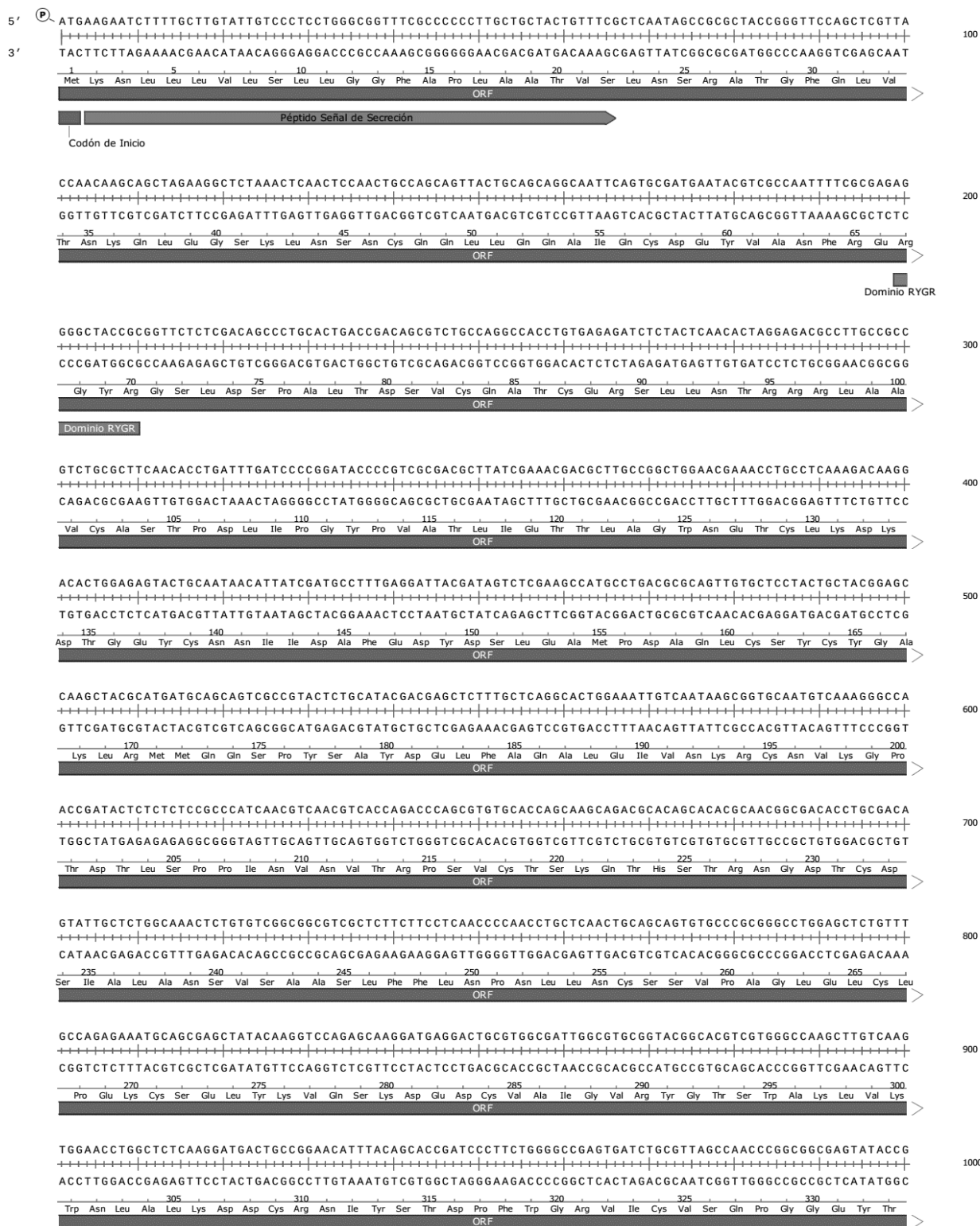
APÉNDICE D. Secuencias de los genes seleccionados

Tvlysm1, DNA (3266pb)

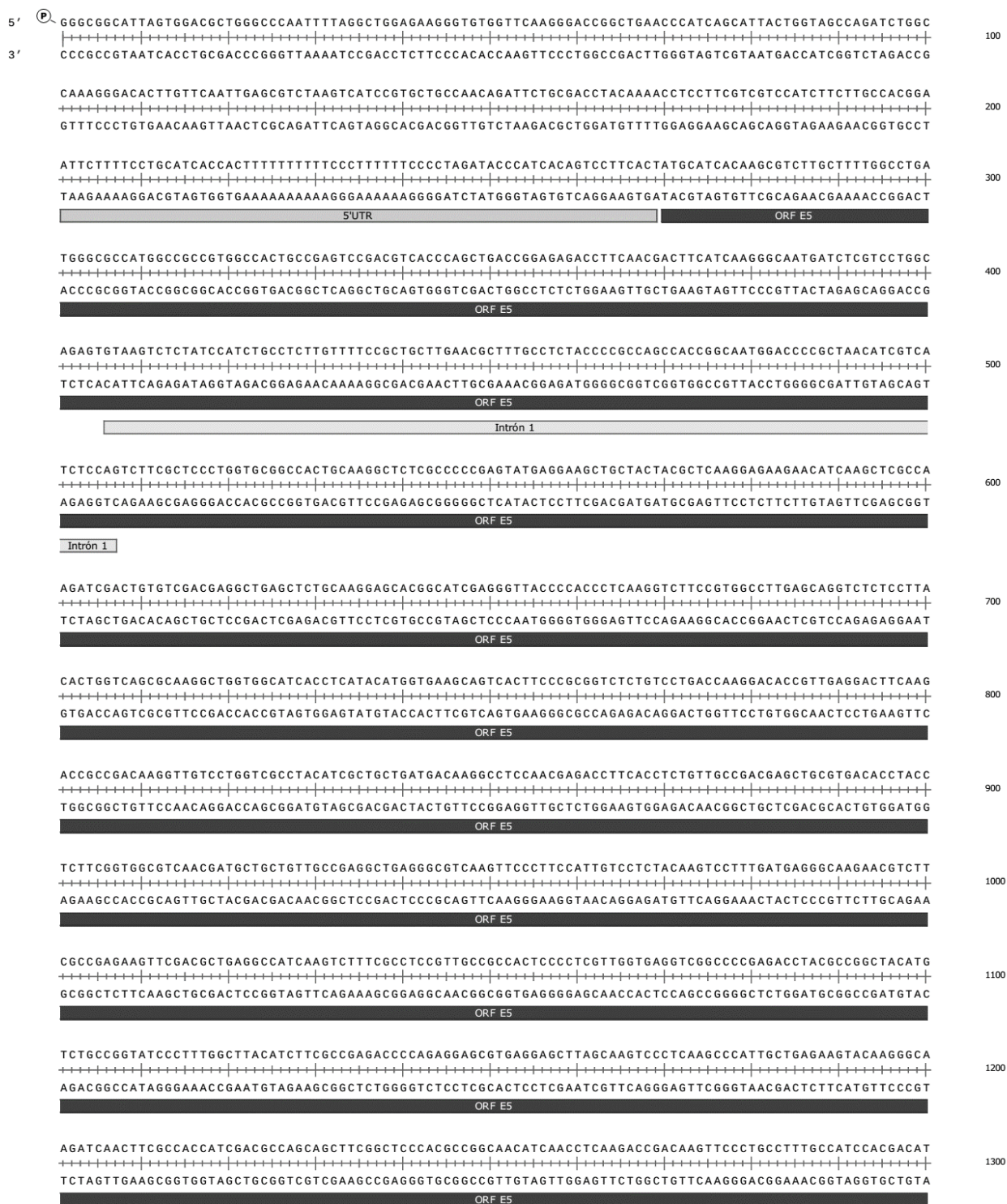




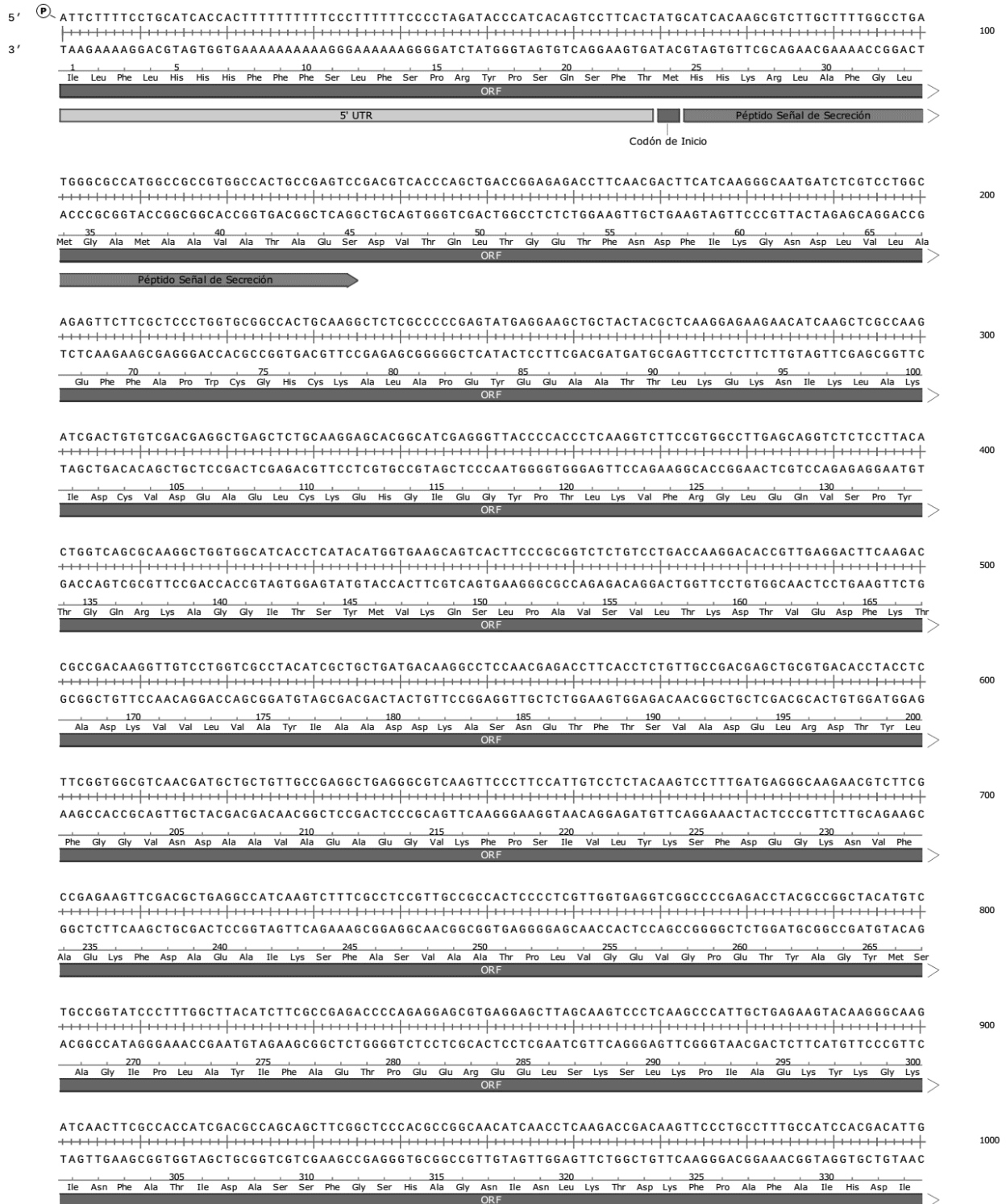
Tvlysm1, cDNA (783aa)



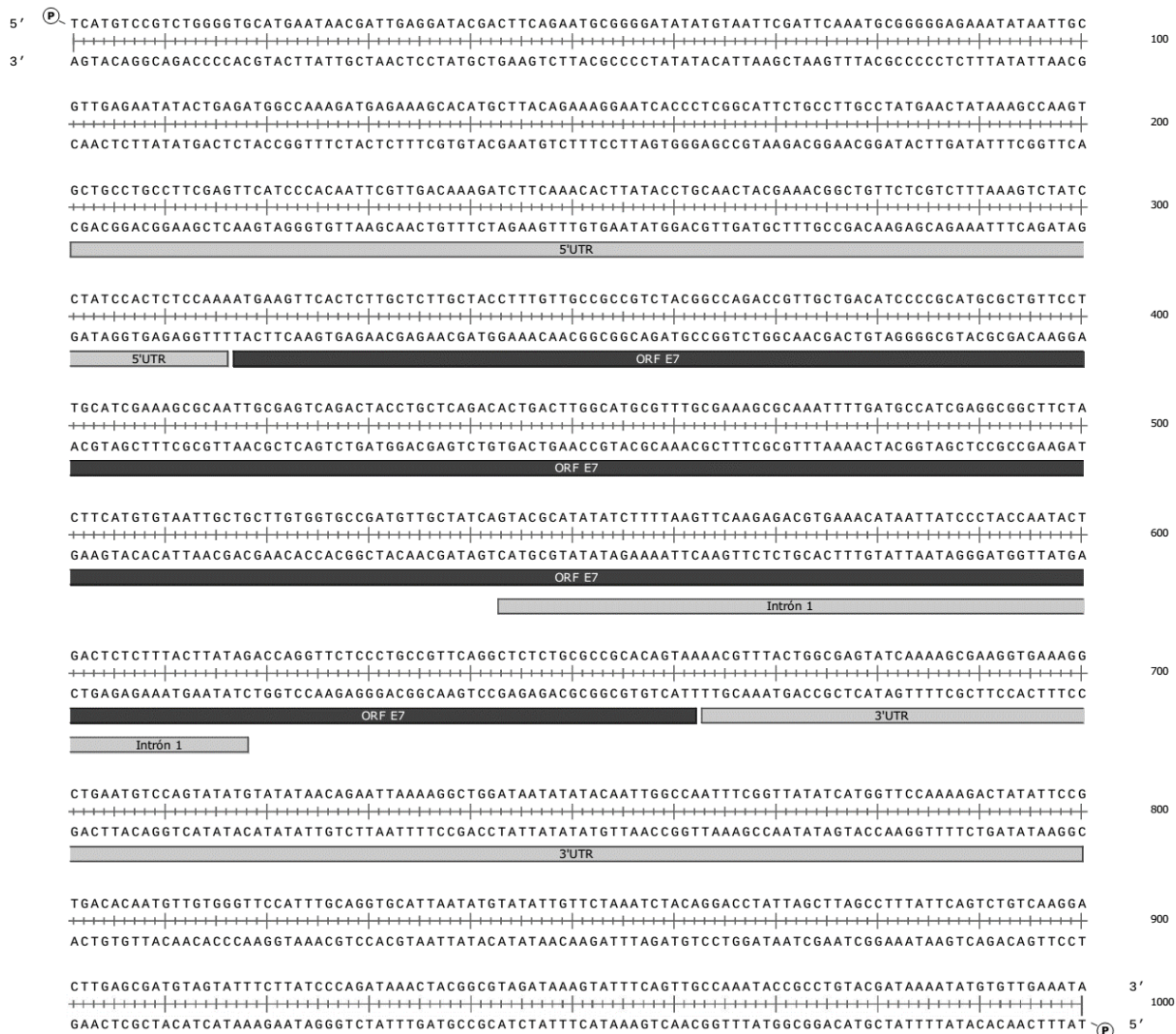
Tatrx2, DNA (1839pb)



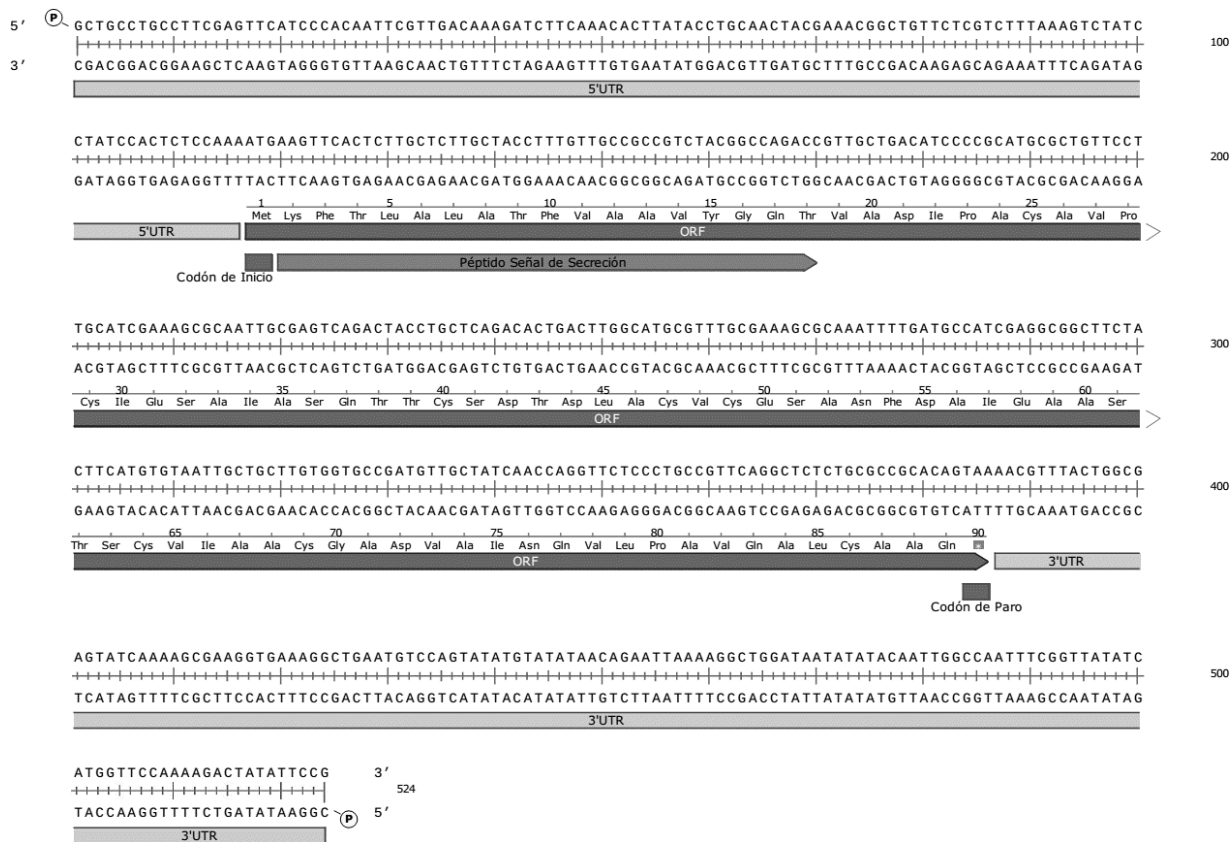
Tatrx2, cDNA (518aa)



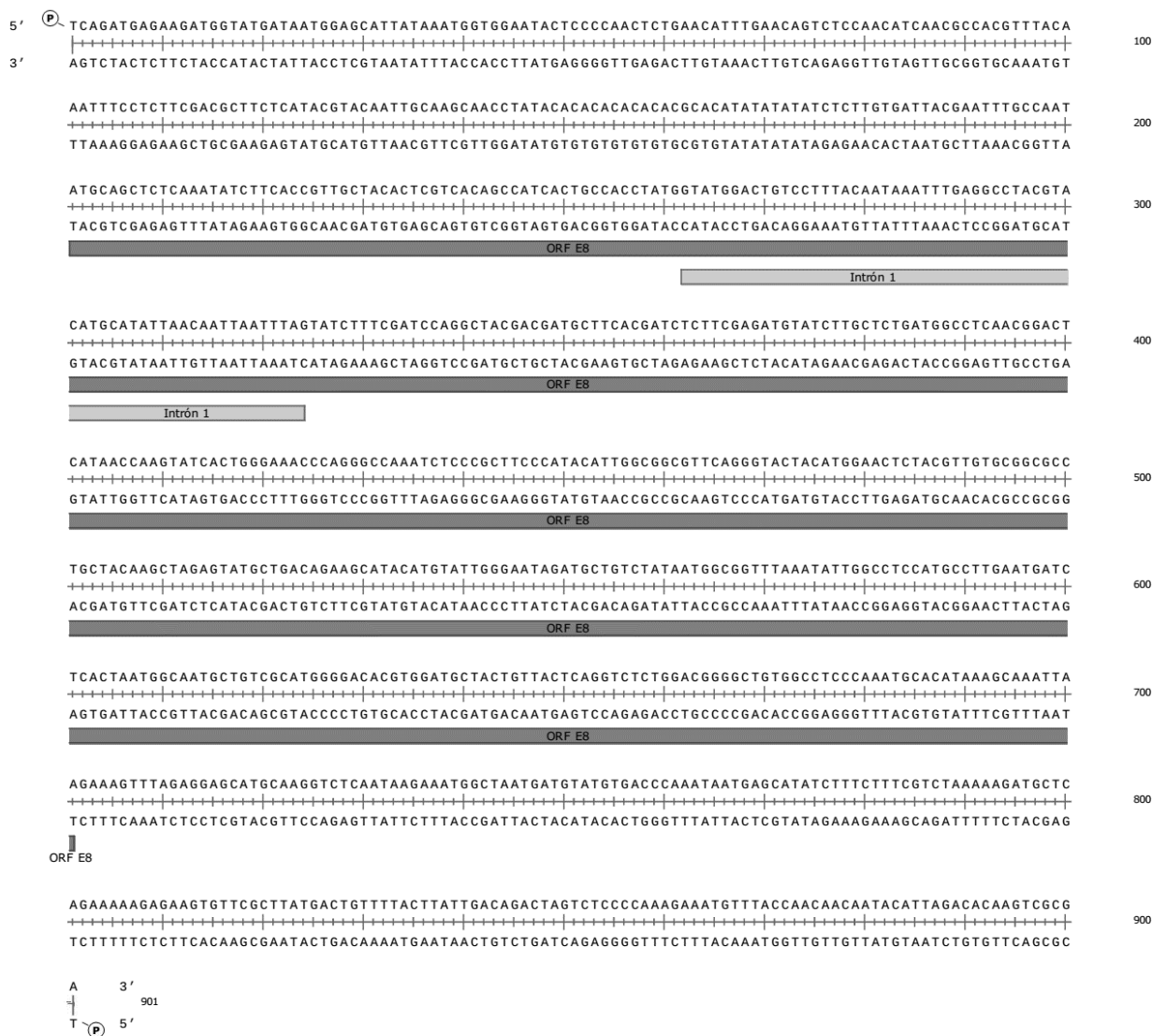
Tacfem1, DNA (600pb)



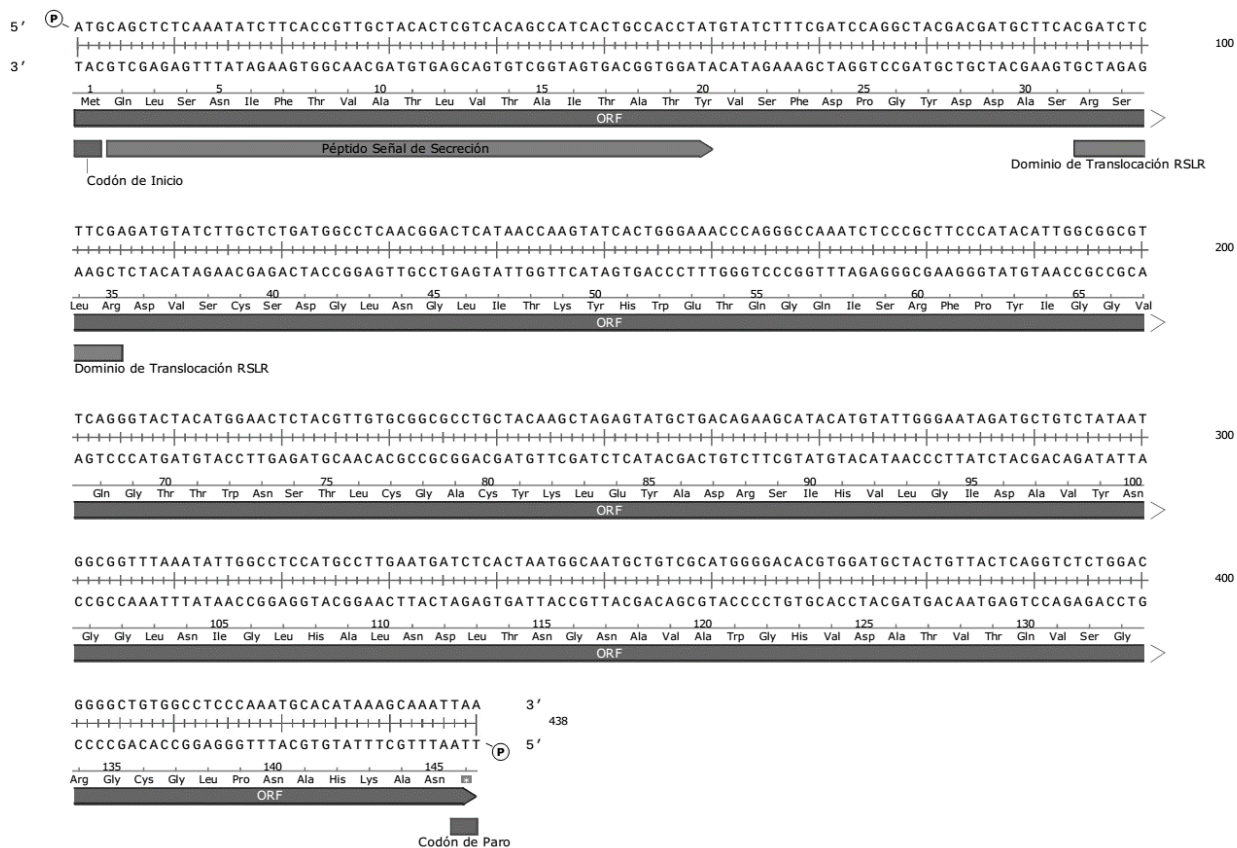
Tacem1, cDNA (90aa)



Epl2, DNA (501pb)



Epl2, cDNA (146aa)



Tvsep1, DNA (2901pb)



AACGGAAAGAGGTTCTCGCTGTTGCTTCTGTTGACAACGCGAACATCCCAACCGTCTTCTCTCTCTAGCTACAAGGTTGACAACGGCGATGCTCAGC
 ++++++
 TTGCCTTCTTCCAAGAGCGACAACGAAGACAACCTGTTGCGCTTGTAGGGTTGGCAGAAAGAGAGAGATCGATGTTCCAACCTGTTGCCGCTACGAGTGG
 ++++++
 ORF E9

AGTTGCGGTATGCTCTTCCGCCAAAGCCTGGAAGGGAGTGAACAAGCCATCTACGCCGTGACACTCGACACCACCATCCCAACGATGCCTGCGATCC
 ++++++
 TCAAGCCGATACAGAGAAGGCGGTTTCGGACCTTCCTCCTGTTTCGGGTAGATGCGGCACTGTGAGCTGTGGTGGTAAGGGTTGCTACGGACGCTAGG
 ++++++
 ORF E9

TCTCCTGATAGCACTCCTGACCTCTCCAACATATCGTCTTGTCCGTCGCGGTACCTGCACCTTTGTCCAGAAGGCTCAGAACGTCGCTGCAAAGGGC
 ++++++
 AGAGGGACTATCGTGAGGACTGGAGAGGTTGATATAGCAGGAACAGGCAGCGCCATGGACGTGGAACAGGTCCTCCGAGTCTTGCAGCGACGTTTCCCG
 ++++++
 ORF E9

GCCAAGTATCTCCTCTATTACAACACCGCTGCTGGTGCCTGGCTGTTGATGTTAGCACTGTGACGCAAATCACCGCCGCGGAATGTTCAAGACTCGA
 ++++++
 CGGTTCAAGAGGAGATAATGTTGTGGCGACGACCAGGGACCGACAACATAATCGTACTGCTTTAGTGGCGGCGGCTTACCAAGTCTGAGCT
 ++++++
 ORF E9

CTGGTGCAGGCTTGGATTGCTGCCCTCAAGGATGGAAGACGGTTACCTTGTCATGTTAACTCGGATGAAGCGACAAGCAGATCCAATTTGCCGACAA
 ++++++
 GACCACGCCGAACCTAACGACGGGAGTCTTACCTTTCGCAATGGAACAGGTACCAATGAGCCTACTCGCTGTTTCGTCTAGGTTAAACGGCTGTT
 ++++++
 ORF E9

CAAGGTCAGTGGCGGTGCTCTCAGCAGCTACACTTCTGGGGCCCTACCTGGGAGGTAGACGTCGAAGCCTCAAATCAGCTCTCCTGGCGGCAACATTCTG
 ++++++
 GTTCCAGTGACCGCCACGAGAGTCTGTCATGTGAAGGACCCGGGATGGACCTCCATCTGCAAGTTCGGAGTTTGTAGTCGAGAGGACCGCCTTGAAGAC
 ++++++
 ORF E9

TCCACCTACCCCGTCTGCTAAGGGAGGATATGCCACCCTTCCGGCACATCAATGGCTTGCCCATGACTGCTGCTGCTGTTGCTCTGTTGGTGGTCAAGCTC
 ++++++
 AGGTGGATGGGGCAGCGATTCCCTCCTATACGGTGGGAAAGGCCGTGTAGTTACCGAACGGTAACTGACGACGACGACAACGAGACCAACAGTTTCGAG
 ++++++
 ORF E9

GCAAGACATTCGACCTGCTCTGCTTGAAGATCTGCTGGCCACGACTGCCAACCCAGCTTTTCAACGATGGCGCCCAATTCTACAACCTTCTCGCTCC
 ++++++
 CGTTCTGTAAGCTGGGACAGGACGAACCTTAGACGACCGGTGCTGACGGTTGGGGTTCGAAAAGTTGCTACCGCGGGTTAAGATGTTGAAGGAGCGAGG
 ++++++
 ORF E9

CGTCGCTCAGCAGGGTGGTGGTCTCATCCAGCCCTATGATGCCGCTTGTCTACCACTCTTCTGCTCCATCCAGCTTGTGCTTCAACGACACTGACCA
 ++++++
 GCAGCGAGTCTCCACCACCAGAGTAGGTCCGGATACTACGGCGAAACGATGGTGAAGACAGAGGTAGGTCGAACAGCAAGTTGCTGTGACTGGT
 ++++++
 ORF E9

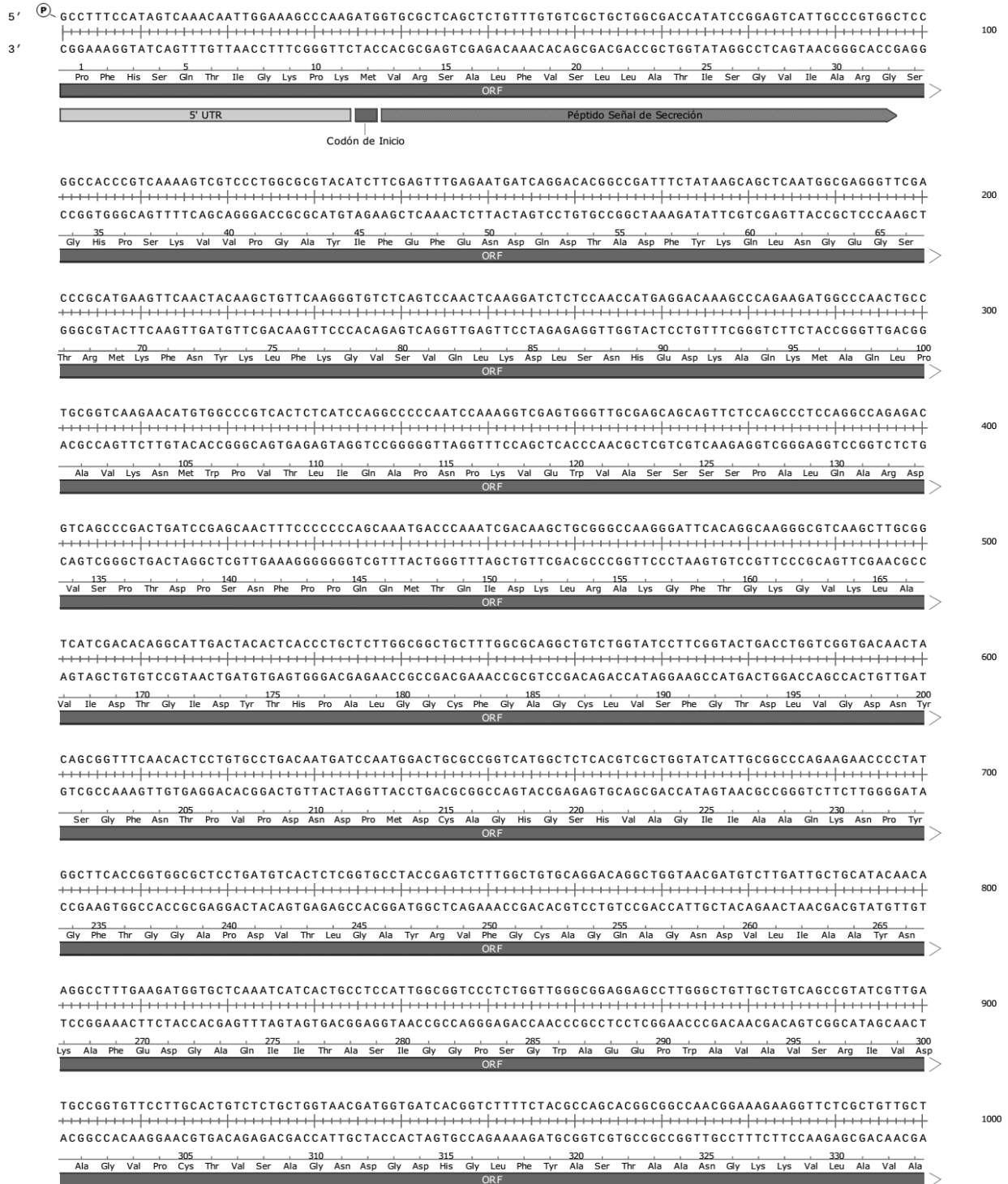
TTCGTCGCAAGAGGCAAACTCACTCTCAAGAACACGACGAAAGCAGAGGGTCACTACAAGCTCAACCAGTCCCCACCAACACATTTACACTCTGACAG
 ++++++
 AAGCAGGCGTTCTCCGTTTGTAGAGAGTCTTGTGGTCTGCTCTCCAGTGGATGTTGAGTTGGTGCAGGGGTTGTTGTAAGATGTGAGACTGTC
 ++++++
 ORF E9

GCGACAGCCCTACCCAGCTCCCTTCCCAACGACGCCATTGCGGCTCACGCCACCGTCAAGCTTGGTCTGGAGCAAGTACTCTCCCTGCTGGAAGGTC
 ++++++
 CGCTGTGCGGGATGGGTGAGGGAAAGGGTTGCTGCGGTAACGCCGAGTGGGTCGAGTCTGAAACGACCTCGTTCACTGAGAGGGACGACCTTCCAG
 ++++++
 ORF E9

CATCACCATTGATGCTCTTCTACCCCTCTCAGGCGTTGACGCAAAGCGCCTTGGCTGTGGTCTGGCTACATCACAGTCAACGGTACAGACGGCAGC
 ++++++
 GTAGTGGTAACTACAGGAAGGATGGGGAGGAGCTCCGCAACTGCGTTTCGCGGAACCGACACAGACCGATGTAAGTGTAGTTGCCATGCTGCGCTCG
 ++++++
 ORF E9

GCCCTCTGTCCATACCAAGGTTCTACCGGTTCCCTTACAAGCAGAAGTCTCTACCCGGCAGACTCATGGATCAGCAAGTCCACCAGTGAAGATC
 ++++++
 CGGGAGACAGGGTATGGTCCAGAGTGGCAAGGGAAGTGTTCGTTTCCAGGAGATGGGCGTCTGAGTACCTAGTCTGTTCAAGTGGCTACTCTTAG
 ++++++
 ORF E9

Tvsep1, cDNA (889aa)



TCTGTTGACAACGCGAACATCCCAACCGTCTTCTCTCTCTAGCTACAAGGTTGACAACGGCGATGCTCAGCAGTTCCGGCTATGTCTCTCCGCCAAAG
 ++++++
 AGACAAGCTGTTGCGCTTGTAGGGTTGGCAGAAGAGAGAGATCGATGTTCCAAGTCTGCGCTACGAGTCTGTCAGGCCGATACAGAGAAGCGGGTTTC
 335 340 345 350 355 360 365
 Ser Val Asp Asn Ala Asn Ile Pro Thr Val Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Lys Val Asp Asn Gly Asp Ala Gln Gln Phe Gly Tyr Val Ser Ser Ala Lys
 ORF

CCTGGAAGGGAGTGAACAAGCCCATCTACGCCGTGACACTCGACACCACCATCCCAACGATGCCTGCATCCTCTCCCTGATAGCACTCCTGACCTCTC
 ++++++
 GGACCTTCCCTCACTTGTTCGGGTAGATGCGGCACCTGTGAGCTGTGGTGGTAAGGTTGCTACGGACGCTAGGAGAGGGACTATCGTGAGGACTGGAGAG
 370 375 380 385 390 395 400
 Ala Trp Lys Gly Val Asn Lys Pro Ile Tyr Ala Val Thr Leu Asp Thr Thr Ile Pro Asn Asp Ala Cys Asp Pro Leu Pro Asp Ser Thr Pro Asp Leu Ser
 ORF

CAACTATATCGTCTTGTCCGTCGCGGTACCTGCACCTTTGTCCAGAAGGCTCAGAAGCTCGCTGCAAAGGGCGCCAAGTATCTCTCTATTACAACACC
 ++++++
 GTTGATATAGCAGGAACAGGCACGCGCCATGGACGTGGAACAGGCTCTCCGAGTCTTGACGCGACGTTTCCCGGGTTCATAGAGGAGATAATGTTGTGG
 405 410 415 420 425 430
 Asn Tyr Ile Val Leu Val Arg Arg Gly Thr Cys Thr Phe Val Gln Lys Ala Asn Val Ala Ala Lys Gly Ala Lys Tyr Leu Leu Tyr Tyr Asn Thr
 ORF

GCTGCTGGTGCCTGGCTGTTGATGTTAGCACTGTGACGCAAATCACCGCCGCGGAATGTTCAAGACTCGACTGGTGCGGCTTGGATTGCTGCCCTCA
 ++++++
 CGACGACCACGGGACCGACAACACTACAATCGTACACTGCGTTTAGTGGCGGGCGCTTACCAAGTTCTGAGCTGACCAGCCGACCTAACGACGGGAGT
 435 440 445 450 455 460 465
 Ala Ala Gly Ala Leu Ala Val Asp Val Ser Thr Val Thr Gln Ile Thr Ala Ala Gly Met Val Gln Asp Ser Thr Gly Ala Ala Trp Ile Ala Ala Leu
 ORF

AGGATGAAAAGCGGTTACCTTGTCCATGGTTAACTCGGATGAAGCGCAAAGCAGATCCAATTTGCCGACAACAAGGTCCTGCGGGTCTCTCAGCAC
 ++++++
 TCCTACCTTTCGCAATGGAACAGGTACCAATTGAGCCTACTTCGCTGTTTCGCTAGGTTAAACGGCTGTTGTTCCAGTGACCGCCACGAGAGTCGTG
 470 475 480 485 490 495 500
 Lys Asp Gly Lys Thr Val Thr Leu Ser Met Val Asn Ser Asp Glu Ala Thr Lys Gln Ile Gln Phe Ala Asp Asn Lys Val Thr Gly Gly Ala Leu Ser Thr
 ORF

GTACACTTCTGGGGCCCTACCTGGGAGGTAGACGTCGAAGCCTCAAATCAGCTCCTGGCGGCAACATTTGTCCACCTACCCCGTCGCTAAGGGAGGA
 ++++++
 CATGTGAAGGACCCGGGATGGACCCCTCCATCTGCAGTTTCGGAGTTTAGTCGAGAGGACCGCCGTTGTAAGACAGGTTGGATGGGGCAGCGATTCCCTCCT
 505 510 515 520 525 530
 Tyr Thr Ser Trp Gly Pro Thr Trp Glu Val Asp Val Lys Pro Gln Ile Ser Ser Pro Gly Gly Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Pro Val Ala Lys Gly Gly
 ORF

TATGCCACCCTTCCGGCACATCAATGGCTTGCCATTGACTGCTGCTGCTGTTGCTCTGGTTGGTCAAGCTCGCAAGACATTCGACCCCTGCTCTGCTT
 ++++++
 ATACGGTGGAAAGGCCGTGTAGTTACCGAACGGTAAGTACGACGACGACACACGAGACCAACAGTTTCGAGCGTTCTGTAAGCTGGGACAGGACGAAC
 535 540 545 550 555 560 565
 Tyr Ala Thr Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Cys Pro Leu Thr Ala Ala Val Ala Leu Val Gly Gln Ala Arg Lys Thr Phe Asp Pro Val Leu Leu
 ORF

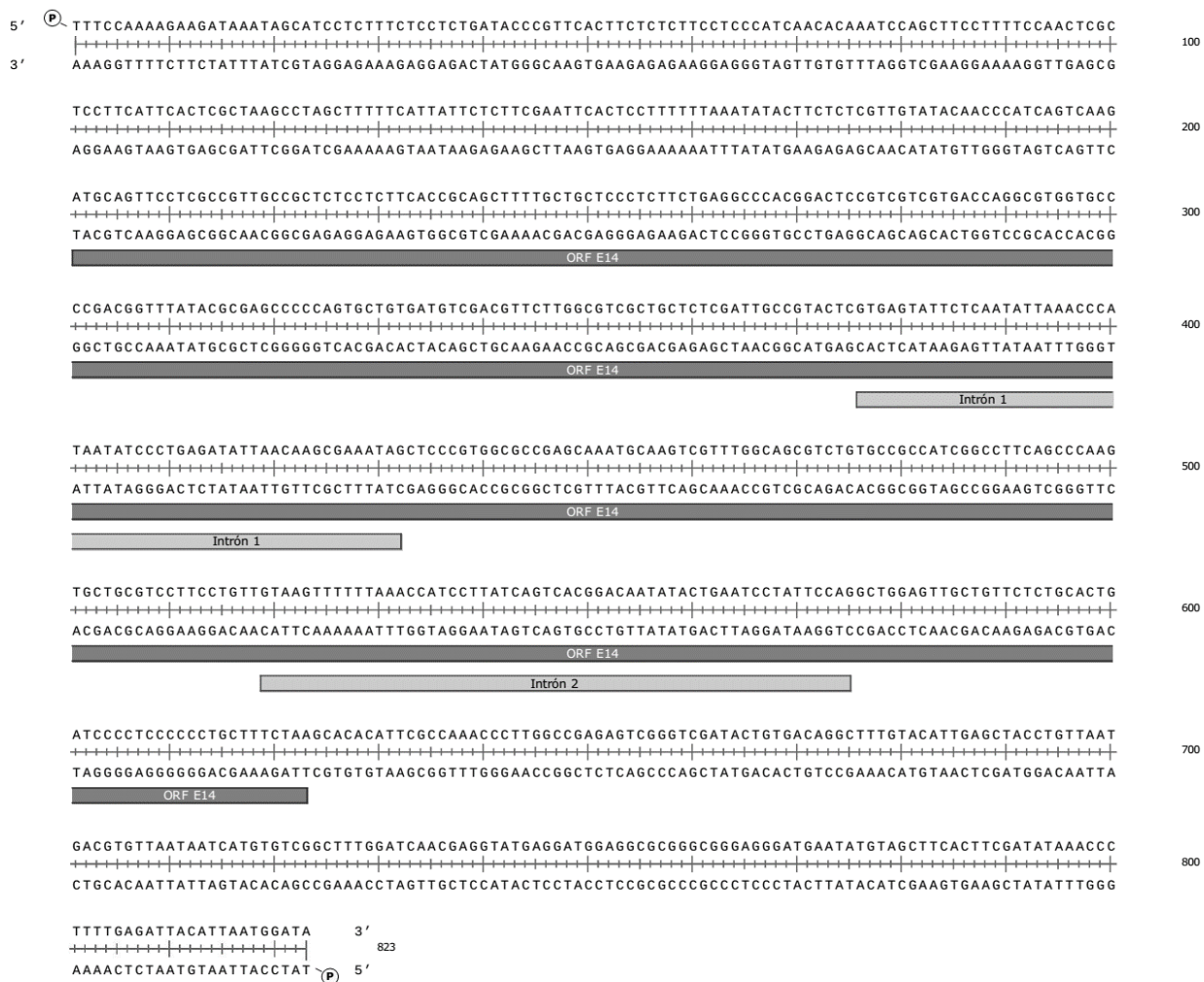
AGAATCTGCTGGCCACGACTGCCAACCCCAAGCTTTTCAACGATGGCGCCAATTCTACAACCTCCTCGCTCCCGTCGCTCAGCAGGGTGGTGGTCTCAT
 ++++++
 TCTTAGACGACCGGTGCTGACGGTTGGGGTCGAAAAGTTGCTACCGCGGGTTAAGATGTTGAAGGAGCGAGGGCAGCGAGTCTCCACCACCAAGGTA
 570 575 580 585 590 595 600
 Glu Asn Leu Leu Ala Thr Thr Ala Asn Pro Gln Leu Phe Asn Asp Gly Ala Gln Phe Tyr Asn Phe Leu Ala Pro Val Ala Gln Gln Gly Gly Gly Leu Ile
 ORF

CCAGGCCTATGATGCCGCTTGTCTACCCTTCTGCTCCATCCAGCTTGTGCTTCAACGACACTGACCACTTCGTCGCGCAAGAGGCAAACTCACTCTC
 ++++++
 GGTCCGGATACTACGGCGAAACGATGGTGAGAAGACAGAGGTAGGTGCAACAGCAAGTTGCTGTGACTGGTGAAGCAGGCGTTCTCCGTTTAGTGAGAG
 605 610 615 620 625 630
 Gln Ala Tyr Asp Ala Ala Phe Ala Thr Thr Leu Leu Ser Pro Ser Leu Ser Phe Asn Asp Thr Asp His Phe Val Arg Lys Arg Gln Ile Thr Leu
 ORF

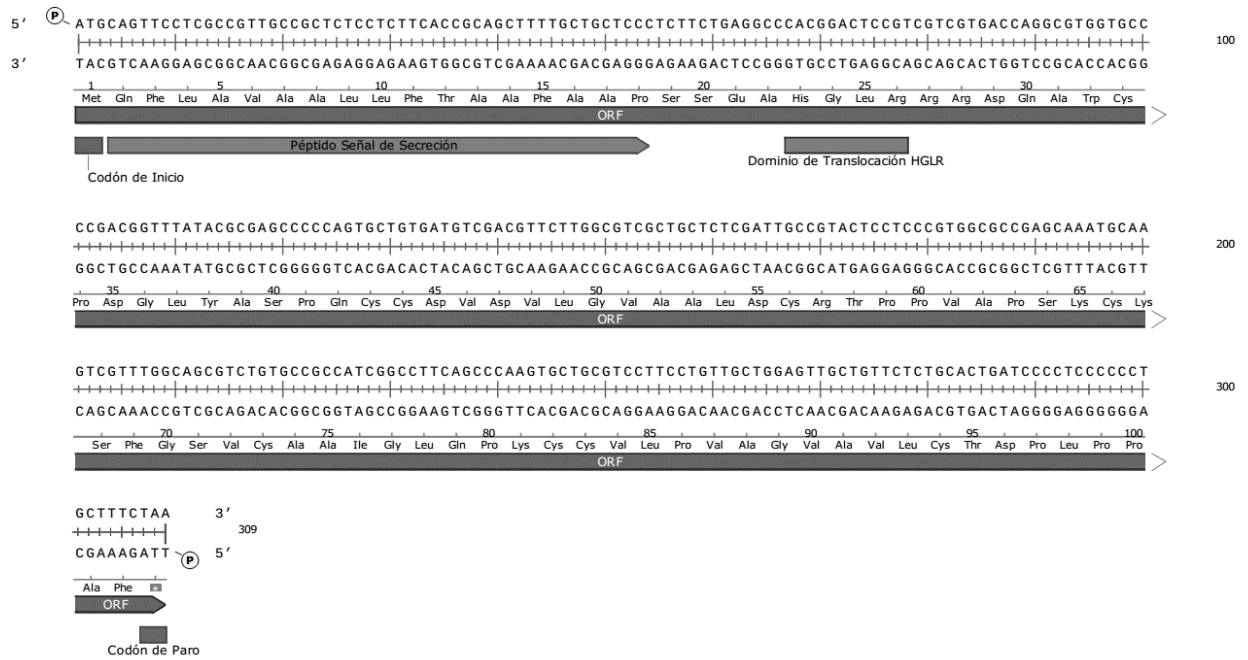
AAGAACCACGCAAGCAGAGGGTCACTACAAGCTCAACCAGTCCCCACCAACACATTTACACTCTGACAGGCGACAGCCCTACCCAGCTCCCTTCC
 ++++++
 TTCCTGGTGGTTCGCTCCCAAGTGGATGTTCCAGTTGGTGCAGGGGTTGGTGAAGATGTGAGACTGTCCGCTGTCGGGGATGGGTGCAAGGGAAGG
 635 640 645 650 655 660 665
 Lys Asn Thr Ser Lys Gln Arg Val Thr Tyr Lys Leu Asn His Val Pro Thr Asn Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Gly Asp Ser Pro Tyr Pro Ala Pro Phe
 ORF

CCAACGACCCATTGCGGCTCACGCCACCGTCAGACTTGGTCTGGAGCAAGTGAAGTCTCCCTGCTGGAAGGTCCATCACCATTGATGCTCTTCTACCCC
 ++++++
 GGTGCTGCGGTAACGCGAGTGGTGGCAGTCTGAACAGACCTCTGCTCACTGAGAGGGACGACCTTCCAGGTAGTGGTAACACAGGAAGGATGGGG
 670 675 680 685 690 695 700
 Pro Asn Asp Ala Ile Ala Ala His Ala Thr Val Arg Leu Gly Leu Glu Gln Val Thr Leu Pro Ala Gly Arg Ser Ile Thr Ile Asp Val Leu Pro Thr Pro
 ORF

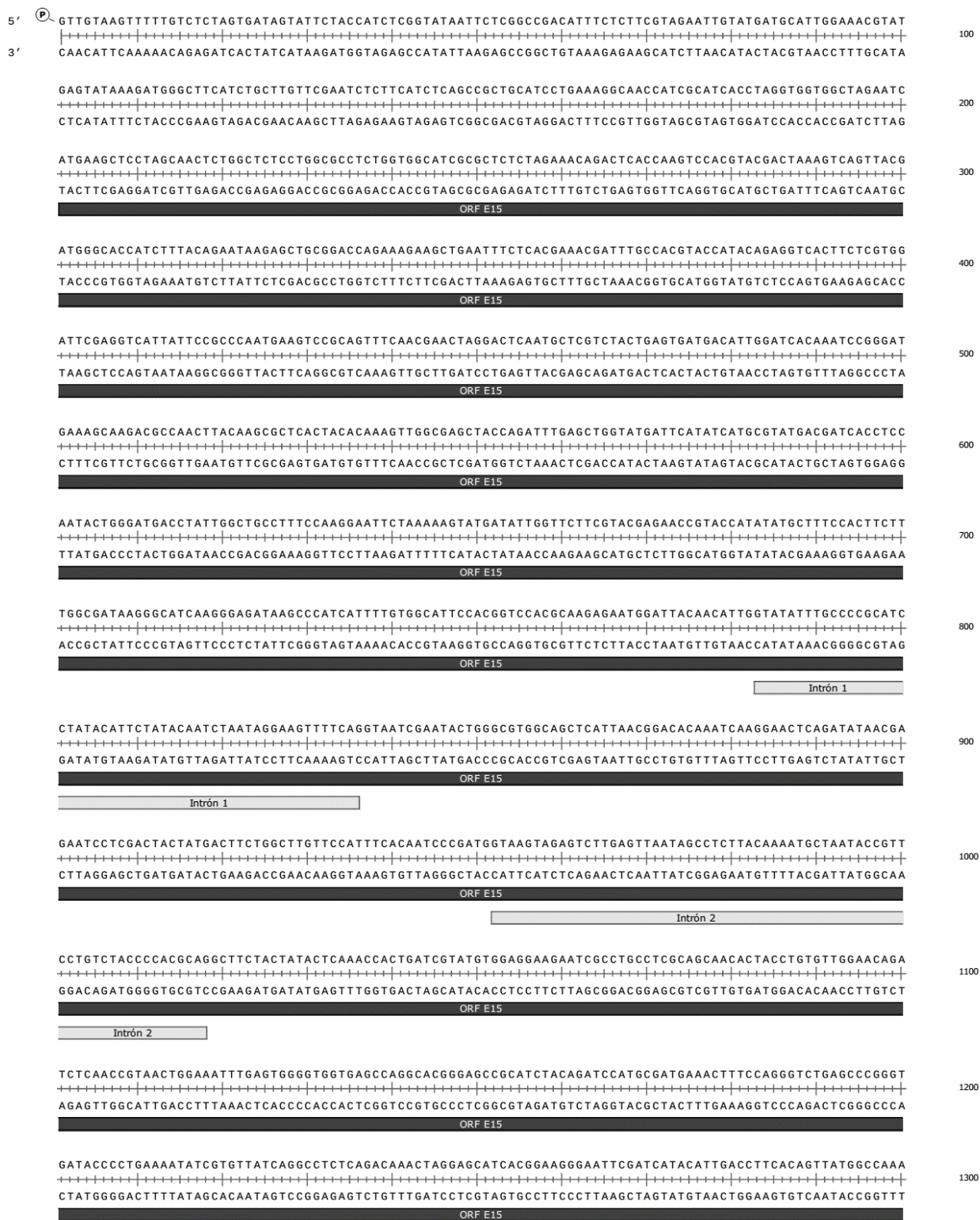
Tvhydi1, DNA (423pb)



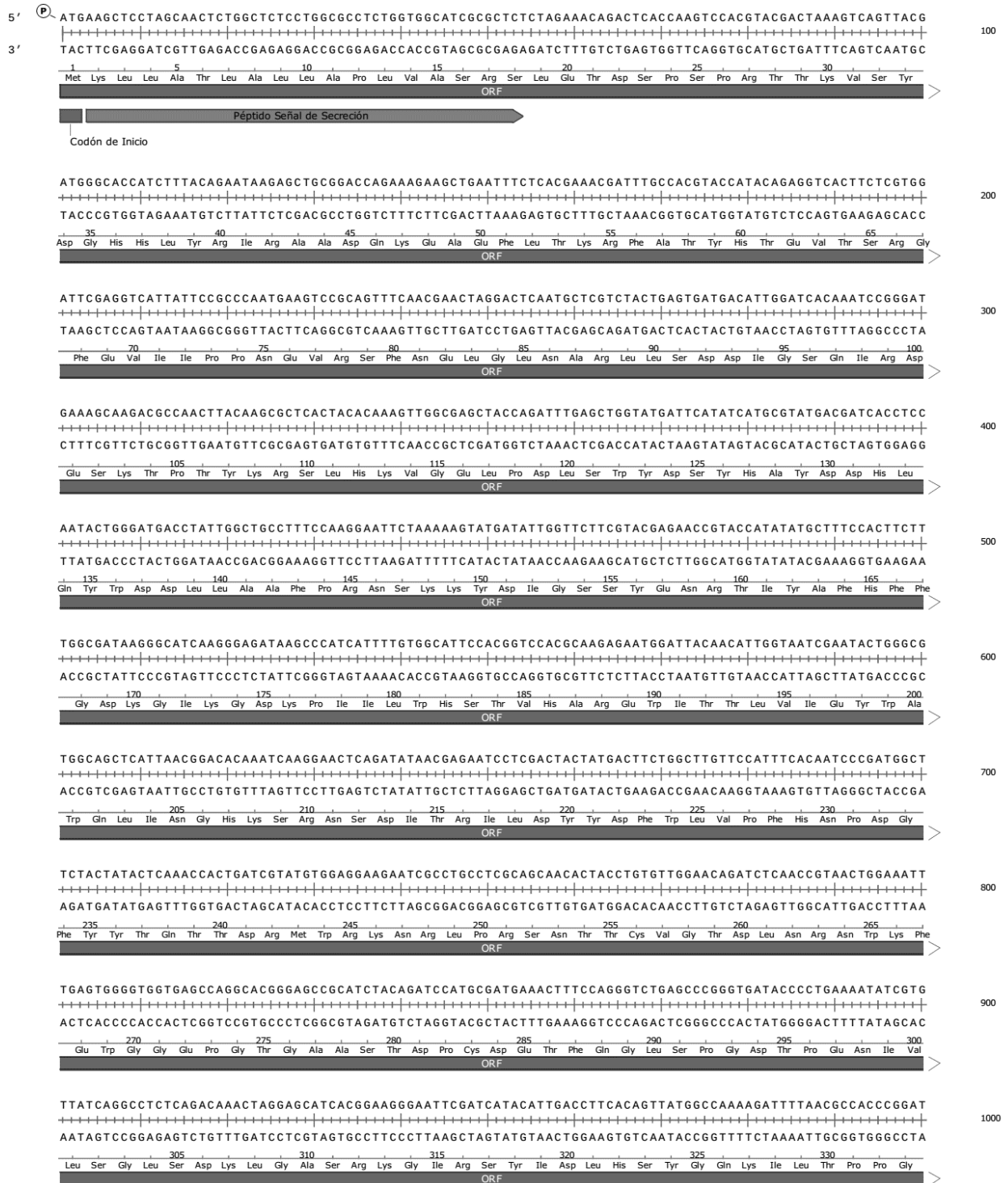
Tvhydi1, cDNA (103aa)



Tamp1, DNA (1487pb)



Tamp1, cDNA (442pb)



GGACATGCAACACCTCTCAGTACCCAGCTACGCTTCTCGGATGCTTGATGTTGCAGAGG6TTTTGCTAATGCTGTACAAGCATTGACAGCCGCAATGA
 ++++++
 CCTGTACGTTGTGGAGAGTCATGGGTCGATGCGAAGGAGCCTACGAACTACAACGCTCTCCCAAACGATTACGACATGTTTCGTAAGCTGTGCGCGTTACT
 ++++++
 335 340 345 350 355 360 365
 Trp Thr Cys Asn Thr Ser Gln Tyr Pro Ala Thr Leu Pro Arg Met Leu Asp Val Ala Glu Gly Phe Ala Asn Ala Val Gln Ala Phe Asp Ser Arg Asn Glu
 ORF

1100

AACATACCAGTATGGAGCAGGCTGTGATATTGAGTATTATTCGGCTGGTAATGGCCGTGACCCATTACGGCGCTTATGGCGCGGATCACTCTTGGACT
 ++++++
 TTGTATGGTCATACCTCGTCCGACACTATAAECTATAATAAGCCGACCAATTACCGGCACTGGTGGTAATGCCGGAATACCGCGCTAGTGAGAACCTGA
 ++++++
 370 375 380 385 390 395 400
 Thr Tyr Gln Tyr Gly Ala Gly Cys Asp Ile Glu Tyr Tyr Ser Ala Gly Asn Gly Arg Asp His His Tyr Gly Ala Tyr Gly Ala Asp His Ser Trp Thr
 ORF

1200

CTAGAATTAGATCCAGTGACATCTAGCCAAGGTGGCTTTGTCTGCCTCCAGCAAATATTTGGCCTGTTGTCCAGGAACAGTGGGCGGGAGTGCTCTGGC
 ++++++
 GATCTTAATCTAGGTCACGTGATCGGTTCCACCGAAACAGGACGGAGGTCGTTTATAAACCGGACAACAGGTCCTTGTACCCGCCCTCACGAGACCG
 ++++++
 405 410 415 420 425 430
 Leu Glu Leu Asp Pro Val Thr Ser Ser Gln Gly Gly Phe Val Leu Pro Pro Ala Asn Ile Trp Pro Val Val Gln Glu Gln Trp Ala Gly Val Leu Trp
 ORF

1300

TGCTCAATAACGTTTGGTTCAATTAGTCGACATTATGAAGAAGAGAATATAGAACATTAATACGC 3'
 ++++++ 1366
 ACGAGTTATTGCAAACCAAGTTAATCAGCTGTAATACTTCTTCTTATATCTTGTAATTTATGCG 5'
 435 440
 Leu Leu Asn Asn Val Trp Phe Asn
 ORF → 3' UTR
 ■
 Codón de Paro

REFERENCIAS

- Alonso-Ramírez, A., Poveda, J., Martín, I., Hermosa, R., Monte, E. & Nicolás, C. (2014).** Salicylic acid prevents *Trichoderma harzianum* from entering the vascular system of roots. *Mol Plant Pathol* 1–31.
- Bacelli, I., Lombardi, L., Luti, S., Bernardi, R., Picciarelli, P., Scala, A. & Pazzagli, L. (2014).** Cerato-platanin induces resistance in *Arabidopsis* leaves through stomatal perception, overexpression of salicylic acid- and ethylene-signalling genes and camalexin biosynthesis. *PLoS One* 9, 1–11.
- Baek, J.-M. M. & Kenerley, C. M. (1998).** The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet Biol* 23, 34–44. Elsevier.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M. & Latgé, J.-P. (2012).** Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLoS Pathog* 8, e1002700.
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. & Codón, A. C. (2004).** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7, 249–260.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N. L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.-D., Young, C., Kamoun, S. & Haldar, K. (2006).** The Malarial Host-Targeting Signal Is Conserved in the Irish Potato Famine Pathogen. *PLoS Pathog* 2, e50.
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R. & other authors. (2010).** *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc Natl Acad Sci* 107, 9909–9914.
- Boyd, L. A., Ridout, C., O’Sullivan, D. M., Leach, J. E. & Leung, H. (2013).** Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet* 29, 233–240. Elsevier Ltd.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. (2008).** Role of Swollenin, an Expansin-Like Protein from *Trichoderma*, in Plant Root Colonization. *Plant Physiol* 147, 779–789.

- Buist, G., Steen, A., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2008).** LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* **68**, 838–847.
- Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A. & Esquivel-Naranjo, E. U. (2010).** Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* **47**, 468–476.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, J. (2009).** *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **149**, 1579–1592.
- Crutcher, F. K., Moran-Diez, M. E., Ding, S.-L., Liu, J., Horwitz, B. a., Mukherjee, P. K. & Kenerley, C. M. (2015).** A paralog of the proteinaceous elicitor SM1 is involved in colonization of maize roots by *Trichoderma virens*. *Fungal Biol* **119**, 476–486. Elsevier Ltd.
- DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B. & Sweigard, J. A. (1999).** Magnaporthe grisea pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* **11**, 2013–30.
- Djonovic, S., Vargas, W. a, Kolomiets, M. V, Horndeski, M., Wiest, A. & Kenerley, C. M. (2007).** A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol* **145**, 875–889.
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R. & Kenerley, C. M. (2006).** Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 838–53.
- Donofrio, N. M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D. E., Jeong, J. S., Coughlan, S., Mitchell, T. K. & Dean, R. A. (2006).** Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **43**, 605–617.
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X. &**

- Tyler, B. M. (2008).** RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *Plant Cell* **20**, 1930–1947.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. a, Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V & Kubicek, C. P. (2011).** Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* **9**, 749–759. Nature Publishing Group.
- Ellis, J. G., Rafiqi, M., Gan, P., Chakrabarti, A. & Dodds, P. N. (2009).** Recent progress in discovery and functional analysis of effector proteins of fungal and oomycete plant pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 399–405.
- Esquivel-Naranjo, E. U. & Herrera-Estrella, a. (2007).** Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* **153**, 3909–3922.
- Expósito-Rodríguez, M., Borges, A. A., Borges-Pérez, A. & Pérez, J. A. (2008).** Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol* **8**, 131.
- Frías, M., González, C. & Brito, N. (2011).** BcSp11, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol* **192**, 483–495.
- Gaderer, R., Lamdan, N., Frischmann, A., Sulyok, M., Krska, R., Horwitz, B. A. & Seidl-Seiboth, V. (2015).** Sm2, a paralog of the *Trichoderma* cerato-platanin elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of *Trichoderma* with maize. *BMC Microbiol* **15**, 2.
- Ghanashyam, C. & Jain, M. (2009).** Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses **4**, 846–848.
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J. & Thordal-Christensen, H. (2010).** Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC*

Genomics **11**, 317.

- Groen, S. C. & Whiteman, N. K. (2014).** The Evolution of Ethylene Signaling in Plant Chemical Ecology. *J Chem Ecol* **40**, 700–716.
- Grouffaud, S., Whisson, S. C., Birch, P. R. J. & West, P. V. A. N. (2010).** Towards an understanding on how RxLR-effector proteins are translocated from oomycetes into host cells. *Fungal Biol Rev* **24**, 27–36. Elsevier Ltd.
- Gu, B., Kale, S. D., Wang, Q., Wang, D., Pan, Q., Cao, H., Meng, Y., Kang, Z., Tyler, B. M. & Shan, W. (2011).** Rust secreted protein Ps87 is conserved in diverse fungal pathogens and contains a RXLR-like motif sufficient for translocation into plant cells. *PLoS One* **6**, e27217.
- Gust, A. A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H. M. & Nürnberger, T. (2012).** Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci* **17**, 495–502.
- Guyon, K., Balagué, C., Roby, D. & Raffaele, S. (2014).** Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics* **15**, 336.
- Harman, G. E. (2011).** Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytol* **189**, 647–649.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2012).** Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* **158**, 17–25.
- Hogenhout, S. a, Van der Hoorn, R. a L., Terauchi, R. & Kamoun, S. (2009).** Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 115–122.
- Horner, N. R., Grenville-Briggs, L. J. & van West, P. (2012).** The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biol* **116**, 24–41. Elsevier Ltd.
- Huang, S., An, Y.-Q., McDowell, J. M., McKinney, E. C. & Meagher, R. B. (1997).** The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence,

- pollen, and developing ovules. *Plant Mol Biol* **33**, 125–139. Kluwer Academic Publishers.
- Hung, R., Lee, S. & Bennett, J. W. (2013).** Arabidopsis thaliana as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. *Fungal Ecol* **6**, 19–26. Elsevier Ltd.
- Irieda, H., Maeda, H., Akiyama, K., Hagiwara, A., Saitoh, H., Uemura, A., Terauchi, R. & Takano, Y. (2014).** Colletotrichum orbiculare Secretes Virulence Effectors to a Biotrophic Interface at the Primary Hyphal Neck via Exocytosis Coupled with SEC22-Mediated Traffic. *Plant Cell* **26**, 2265–2281.
- de Jonge, R. & Thomma, B. P. H. J. (2009).** Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol* **17**, 151–157.
- Jongeneel, C. V., Bouvier, J. & Bairoch, A. (1989).** A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett* **242**, 211–214.
- Kamoun, S. (2006).** A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 41–60.
- Kamoun, S. (2007).** Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 358–365.
- Kazan, K., Manners, J. M., Wasternack, C., Martínez, C., al., et, Abeles, F. B., al., et, Yamada, T., Robert-Seilaniantz, A. & other authors. (2009).** Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **14**, 373–82. Elsevier.
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A. C., Balmuth, A. L., Robert-Seilaniantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D. J. & other authors. (2011).** Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol* **9**.
- Khang, C. H., Park, S., Lee, Y., Valent, B. & Kang, S. (2008).** Genome Organization and Evolution of the AVR-Pita Avirulence Gene Family in the Magnaporthe grisea Species Complex. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**, 658–670.
- Kibbe, W. A. (2007).** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*

35, W43–W46.

- Kim, S., Ahn, I. P., Rho, H. S. & Lee, Y. H. (2005).** MHP1, a Magnaporthe grisea hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Mol Microbiol* **57**, 1224–1237.
- Kloppholz, S., Kuhn, H. & Requena, N. (2011).** A Secreted Fungal Effector of Glomus intraradices Promotes Symbiotic Biotrophy. *Curr Biol* **21**, 1204–1209. Elsevier Ltd.
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B. A. & other authors. (2011).** Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of Trichoderma. *Genome Biol* **12**, R40. BioMed Central Ltd.
- Kulkarni, R. D., Kelkar, H. S., Dean, R. A., Dean, R. A., Choi, W., Dean, R. A., Altschul, S. F., al., et, Eisenhaber, B. & other authors. (2003).** An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem Sci* **28**, 118–21. Elsevier.
- Kulkarni, R. D., Thon, M. R., Pan, H. & Dean, R. a. (2005).** Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus Magnaporthe grisea. *Genome Biol* **6**, R24.
- Lee, C., Chronis, D., Kenning, C., Peret, B., Hewezi, T., Davis, E. L., Baum, T. J., Hussey, R., Bennett, M. & Mitchum, M. G. (2011).** The novel cyst nematode effector protein 19C07 interacts with the Arabidopsis auxin influx transporter LAX3 to control feeding site development. *Plant Physiol* **155**, 866–880.
- Lévesque, C. A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J. P., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robideau, G. P., Thines, M. & other authors. (2010).** Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen Pythium ultimum reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol* **11**, R73. BioMed Central.
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., Kang, C. h. ho, Qiu, J. & Stacey, G. (2013).** Nonlegumes Respond to Rhizobial Nod Factors by Suppressing the Innate Immune Response. *Science (80-)* **341**, 1384–1387.

- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8.
- Macho, A. P., Guevara, C. M., Tornero, P., Ruiz-albert, J. & Beuzo, C. R. (2010).** The *Pseudomonas syringae* effector protein HopZ1a suppresses effector-triggered immunity 1018–1033.
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., Thomma, B. P. H. J. & Rudd, J. J. (2011).** Analysis of Two in Planta Expressed LysM Effector Homologs from the Fungus *Mycosphaerella graminicola* Reveals Novel Functional Properties and Varying Contributions to Virulence on Wheat. *Plant Physiol* **156**, 756–769.
- Mgbeahuruike, A. C., Karlsson, M. & Asiegbu, F. O. (2012).** Differential expression of two hydrophobin genes (Pgh1 and Pgh2) from the biological control agent *Phlebiopsis gigantea*. *Fungal Biol* **116**, 620–629. Elsevier Ltd.
- Mukherjee, P. K., Horwitz, B. a, Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. & Kenerley, C. M. (2013).** Trichoderma research in the genome era. *Annu Rev Phytopathol* **51**, 105–29.
- Müller, O., Schreier, P. H. & Uhrig, J. F. (2008).** Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **279**, 27–39.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T. O., Chaparro-Garcia, A., Segretin, M. E., Stam, R., Schornack, S. & other authors. (2010).** Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell Microbiol* **12**, 705–715.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G. & Martin, F. (2011).** A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Curr Biol* **21**, 1197–1203.
- Plett, J. M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssières, A., Deveau, A., Melton, S. J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J. L., Brun, A. & other authors. (2014a).** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8299–304.

- Plett, J. M., Khachane, A., Ouassou, M., Sundberg, B., Kohler, A. & Martin, F. (2014b).** Ethylene and jasmonic acid act as negative modulators during mutualistic symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Populus* roots. *New Phytol* **202**, 270–286.
- PONZIO, C., GOLS, R., WELDEGERGIS, B. T. & DICKE, M. (2014).** Caterpillar-induced plant volatiles remain a reliable signal for foraging wasps during dual attack with a plant pathogen or non-host insect herbivore. *Plant Cell Environ* **37**, 1924–1935.
- Pozo, M. J. & Azcón-Aguilar, C. (2007).** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 393–398.
- Pozo, M. J., Baek, J. M., García, J. M. & Kenerley, C. M. (2004).** Functional analysis of tvsp1, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. *Fungal Genet Biol* **41**, 336–348.
- Raeder, U. & Broda, P. (1985).** Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* **1**, 17–20.
- Rafiqi, M., Jelonek, L., Akum, N. F., Zhang, F. & Kogel, K. (2013).** Effector candidates in the secretome of *Piriformospora indica*, a ubiquitous plant-associated fungus. *Front Plant Sci* **4**, 1–5.
- Rey, T. & Schornack, S. (2013).** Interactions of beneficial and detrimental root-colonizing filamentous microbes with plant hosts. *Genome Biol* **14**, 121.
- Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G. & Brown, J. K. M. (2006).** Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance **18**, 2402–2414.
- Rivas, S., Rougon-cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L. & Jones, J. D. G. (2004).** CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence **23**, 2156–2165.
- Rodríguez-Valtierra, K. (2016).** *Estudio de una cepa sobreexpresante del gen TaCfem1 de Trichoderma atroviride en interacciones biológicas y localización del producto de los genes*

TaCfem1 y *TvCyt2*. Universidad de Guanajuato.

- Salas-marina, M. A., Silva-flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-longoria, E., Herrera-Estrella, A. & Casas-Flores, S. (2011).** Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol* **131**, 15–26.
- Saloheimo, M., Wang, H., Valkonen, M., Vasara, T., Huuskonen, A., Riikonen, M., Pakula, T., Ward, M. & Penttila, M. (2004).** Characterization of Secretory Genes *ypt1 / yptA* and *nsf1 / nsfA* from Two Filamentous Fungi : Induction of Secretory Pathway Genes of *Trichoderma reesei* under Secretion Stress Conditions. *Appl Environ Microbiol* **70**, 459–467.
- Sambrook, J. & Russell, D. (2001).** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.).
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D.-J., Thomma, B. P. & Mesters, J. R. (2013).** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *Elife* **2**, 1–16.
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-García, A. & other authors. (2009).** Ten things to know about oomycete effectors. *Mol Plant Pathol* **10**, 795–803.
- Schorneck, S., Damme, M. Van, Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Smoker, M. & Thines, M. (2010).** Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc Natl Acad Sci* **107**, 17421–17426.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Kubicek, C. P., Allmaier, G. & Kubicek, C. P. (2006).** Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. *FEBS J* **273**, 4346–59.
- Shoresh, M., Yedidia, I. & Chet, I. (2005).** Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* **95**, 76–84.

- Shoresh, M., Harman, G. E. & Mastouri, F. (2010).** Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 21–43.
- Smith, S. M. (2014).** Q&A: What are strigolactones and why are they important to plants and soil microbes? *BMC Biol* **12**, 19.
- Staats, C. C., Kmetzsch, L., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2013).** Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 1–7.
- Stassen, J. H. & Van den Ackerveken, G. (2011).** How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr Opin Plant Biol* **14**, 407–414. Elsevier Ltd.
- Steinkellner, S., Lenzemo, V., Langer, I., Schweiger, P., Khaosaad, T., Toussaint, J. P. & Vierheilig, H. (2007).** Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* **12**, 1290–1306.
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M. & Lorito, M. (2011).** The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Mol Plant Pathol* **12**, 341–354.
- Tucker, S. L. & Talbot, N. J. (2001).** SURFACE ATTACHMENT AND PRE-PENETRATION STAGE DEVELOPMENT BY PLANT PATHOGENIC FUNGI. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 385–417. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA .
- Velazquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macias-Rodriguez, L., Hernandez-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., Lopez-Bucio, J. & Herrera-Estrella, A. (2011).** Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1459–71.
- Viterbo, A. & Chet, I. (2006).** TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Mol Plant Pathol* **7**, 249–258.
- Wawra, S., Belmonte, R., Löbach, L., Saraiva, M., Willems, A. & van West, P. (2012).** Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Curr Opin Microbiol* **15**, 685–

691.

Yaeno, T. & Shirasu, K. (2013). The RXLR motif of oomycete effectors is not a sufficient element for binding to phosphatidylinositol monophosphates. *Plant Signal Behav* **8**, e23865.

Yedidia, I. & Benhamou, N. (1999). Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L .) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum* **65**, 1061–1070.

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I. (2003). Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv . *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins **69**, 7343–7353.

Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y. & other authors. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **21**, 1573–1591.

Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y. & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 973–981.

Zhang, S. & Xu, J.-R. (2014). Effectors and Effector Delivery in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog* **10**, e1003826.

JGI Fungi Portal - Home. (n.d.). .