

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

**“Caracterización de las parejas microARN/blancos involucradas
en la simbiosis entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora
indica*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANA KAREN ÁVILA SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Damien Jean René Formey de Saint Louvent

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2022

LISTA DEL JURADO REVISOR DE TESIS

Presidente:

Dr. Ramón Alberto Batista García – CIDC-UAEM

Secretario:

Dr. Armando Hernández Mendoza – CIDC-UAEM

Vocal:

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega – CCG-UNAM

Suplente:

Dr. Ramón Suárez Rodríguez – CEIB-UAEM

Suplente:

Dr. Damien Jean René Formey de Saint Louvent – CCG-UNAM

RESUMEN

Piriformospora indica es un hongo simbiótico mutualista que coloniza las raíces de una gran variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas incluyendo *Arabidopsis thaliana*. Este hongo beneficia a sus plantas hospederas promoviendo su crecimiento, resistencia a patógenos y tolerancia al estrés abiótico. Los mecanismos moleculares que involucran la interacción planta-*P. indica* requieren todavía de una investigación detallada. Tal es el caso de los microARN, los cuales son pequeñas moléculas de ARN de 20-22 nt que regulan procesos biológicos importantes en las plantas. Hasta el momento se han estudiado los microARN en la interacción entre *P. indica* y orquídeas, arroz o pasto. Con el propósito de caracterizar parejas de microARN y sus ARN mensajeros blancos en la planta de *A. thaliana* durante la simbiosis con *P. indica*, se realizó el co-cultivo in vitro de ambos organismos, del cual se utilizó el tejido de raíz para el análisis del RNAseq, Small-RNAseq y Degradoma-seq. Se identificó una lista de parejas de microARN/blancos potencialmente involucradas en esta simbiosis como, por ejemplo, miR399/*PHO2*, miR161/*PPR*, iso-miR860/*PLAT1*, miR168/*AGO1*, miR398/*CSD1* y miR157/*SPL* entre otros. La función de los blancos es interesante ya que se involucran en la homeostasis de fósforo, defensa y estrés de las plantas. Así mismo se observó un fenotipo diferente en la cantidad de esporas de las plantas mutantes del miR161 comparado a las silvestres, y en adición se evaluó una mutante de *AGO5* debido a que se involucra en la biogénesis de los microARN donde también se observó un fenotipo diferente a las silvestres. En conclusión, durante la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica* se identificó la acumulación diferencial de microARN y su relación con sus blancos. Además, el análisis de mutantes seleccionadas nos mostró que la alteración de la acción de los microARN o genes importantes puede afectar el equilibrio de la esporulación en raíz durante esta interacción.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el gran apoyo y paciencia de mi tutor Dr. Damien Formey durante mi estancia de licenciatura hasta la maestría, por compartir su conocimiento nuevamente y guiarme para concluir este proyecto, gracias por los buenos momentos en el laboratorio y principalmente por su amistad.

A Ing. Martha Torres, quien me acompañó y enseñó la mayoría de prácticas experimentales, gracias por la paciencia y amistad.

A los doctores Dr. Mario Serrano, Dra. Verónica Lira Ruan y Dr. Raúl Peralta Rodríguez (QEPD) por sus comentarios y observaciones sobre mi proyecto de tesis.

A mis compañeros de laboratorio M. C. Norma Aviles, Dra. Wendy Aragón, IBT. Sarah Melissa Lugo, Biól. Javier Rodríguez, Dianey Cruz, L. en C. Alejandra Lara, gracias por sus enseñanzas, compañía y amistad.

Agradezco especialmente a mi familia, Ana Mandy Salgado Ávila, Zaira Lizbeth Salgado Ávila, Ismael Salgado Flores, María Inés Sandoval Flores, Rodolfo Ávila Tenango, Edwin Alfredo Ávila Sandoval, Edgar Rodolfo Ávila Sandoval, Carla Flores Cortes, Marcial Salgado Alvarez e Itzel Salgado Flores por su apoyo, compañía y afecto incondicional.

Al Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, UAEM, y al Laboratorio de Genómica Funcional de Eucariontes del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, por darme la oportunidad de formar parte del posgrado y tener un excelente lugar para desarrollar mi proyecto.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave IA201522 y al proyecto SEP/ Conacyt Ciencias Básicas 2017-2018 clave A1-S-16129

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Importancia de la simbiosis mutualista planta-microorganismo en la agricultura sustentable.....	2
2.2. Simbiosis planta-hongo.....	3
2.3. Hongo mutualista: <i>Piriformospora indica</i>	5
2.4. Características morfológicas de <i>Piriformospora indica</i>	5
2.5. Beneficios de la simbiosis con <i>Piriformospora indica</i>	6
2.6. Importancia de la planta modelo: <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
2.7. Colonización espacio-temporal de <i>Arabidopsis thaliana</i> en simbiosis con <i>Piriformospora indica</i>	10
2.8. Genes involucrados en la simbiosis entre <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Piriformospora indica</i>	12
2.9. MicroARN en plantas	14
2.10. Biogénesis de los microARN en plantas	14
2. 11. MicroARN involucrados en el crecimiento durante la simbiosis de <i>Oncidium</i> con <i>P. indica</i>	17
2. 13. MicroARN involucrados en la defensa contra el patógeno <i>Erwinia chrysanthemi</i> durante la simbiosis de <i>Oncidium</i> con <i>P. indica</i>	17
2. 14. MicroARN de plantas asociados a la resistencia a estrés salino en la interacción <i>Oryza sativa</i> y <i>P. indica</i>	18
2. 15. MicroARN asociados en la interacción de <i>Brachypodium distachyon</i> y <i>P. indica</i>	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS.....	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1 Material Vegetal.....	24
6.1.1. Cultivo in vitro del hongo <i>Piriformospora indica</i>	24
6.1.2. Cultivo in vitro de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
6.1.3. Co-cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> con <i>Piriformospora indica</i>	24
6.1.4. Tinción de raíces.....	25
6.2 Análisis de muestras de ARN	26
6.2.1. Extracción de ARN total de tejido de raíces	26
6.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos de microARN para RT.....	26

6.2.3. Síntesis de ADN complementario.....	27
6.2.4. PCR cuantitativa	27
6.3. Análisis bioinformático	27
6.3.1. Secuenciación de muestras de ARN.....	27
6.3.2. Transcriptoma	28
6.3.3. Microtranscriptoma	29
6.3.4. Degradoma	30
6.3.5. Candidatos microARN/blancos.....	31
6.4. Análisis funcional	31
6.4.1. Líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
6.4.2. Cultivo de plantas.....	31
6.4.3. Genotipificación de líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
6.4.4. Fenotipificación	33
7. RESULTADOS.....	35
7.1. Material Vegetal	35
7.2. Análisis de muestras de ARN total	37
7.3. Análisis Bioinformático.....	41
7.3.1. Secuenciación de muestras de ARN.....	41
7.3.2. Transcriptoma	42
7.3.2. Microtranscriptoma	44
7.4. Análisis funcional	53
7.4.1. Líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
7.4.2. Genotipificación.....	53
7.4.3. Fenotipificación	54
8. DISCUSIÓN.....	57
9. CONCLUSIONES.....	71
10. PERSPECTIVAS	71
11. ANEXOS	72
11.1. Preparación de medio KM y PNM	72
11.2. Protocolo de Extracción de ARN total (miRVana miRNA isolation kit protocol de Ambion).....	74
11.4. Protocolo PCR. Genotipificación	76
11.5. Análisis bioinformático Transcriptoma	76

11.6. Procedimiento en IDEAMEX	80
11.7. Procedimiento con PsRNAtarget	83
11.8. Extracción de ADN con CTAB	84
11.9. Lista de Oligonucleótidos utilizados	84
11.10. Calidad de las muestras de ARN total	85
11.11 Reporte de ARN pequeños por BGI	87
11.12. Vías KEGG y procesos biológicos en relación a los genes diferencialmente expresados en los tiempos 3, 7 y 14 días +<i>P.indica</i> vs Control (Resultados del transcriptoma)	89
11.13. Resultados de Transcriptoma. Genes involucrados en el metabolismo del azúcar durante la interacción entre <i>A. thaliana</i> y <i>P. indica</i>	94
11.14. Resultado de microtranscriptoma. Distribución de la secuencias de ARN pequeños diferencialmente expresados	96
11.15. ARN pequeños diferencialmente expresados (datos Shortstack)	97
11.16. ARN pequeños diferencialmente expresados (datos IDEAMEX)	100
11.17. Go Biological Process	103
11.18. Familias de microARN diferencialmente expresadas en las simbiosis entre plantas de orquídea, arroz, pasto y <i>A. thaliana</i> durante la simbiosis con <i>P. indica</i>.	104
12. LITERATURA CITADA	105

1. INTRODUCCIÓN

La sobreproducción de alimentos de origen vegetal debido a la demanda creciente de la población ha ocasionado el uso continuo e inadecuado de fertilizantes de síntesis, los cuales causan efectos negativos sobre el ambiente (FAO, 2019; Mahanty et al., 2017). Una alternativa de la agricultura sustentable ante esta problemática es la aplicación de biofertilizantes hechos a base de microorganismos beneficiosos como bacterias y hongos (Tian et al., 2020). Estos microorganismos tienen la capacidad de colonizar las raíces de las plantas, estableciendo una simbiosis mutualista cuya interacción mejora el rendimiento de las plantas hospederas (Dimijian, 2000).

Piriformospora indica es un hongo endófito que coloniza las raíces de las plantas para establecer una simbiosis mutualista. Este organismo se considera de gran interés debido a los múltiples beneficios que proporciona a sus plantas hospederas, como, la promoción del crecimiento, resistencia a patógenos y tolerancia al estrés abiótico (Varma et al., 2013). Los mecanismos moleculares en plantas involucrados durante la simbiosis con *P. indica* aún no están completamente claros, incluyendo la regulación mediada por pequeñas moléculas de ARN denominados microARN, los cuales cumplen importantes procesos biológicos en plantas. Solamente se han estudiado microARN en la interacción con *P. indica* en orquídeas, arroz o pasto (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021; W. Ye et al., 2014, 2019).

Curiosamente, este hongo puede colonizar las raíces de la planta *Arabidopsis thaliana*, donde hasta el momento no se han descrito microARN en dicha interacción (Zuccaro et al., 2011). Esto nos proporcionó un buen modelo simbiótico, ya que *A. thaliana* es una herramienta principal para estudios genéticos y moleculares, tiene un genoma completamente secuenciado y su ciclo de vida es corto, además ambos organismos pueden cultivarse axénicamente (Initiative, 2000; Johnson et al., 2011; Woodward & Bartel, 2018). Por lo que, la preparación de las muestras in vitro nos permitió obtener tejido de raíz con y sin *P. indica* en los tiempos 3, 7 y 14 días post-co-cultivo para secuenciar el ARN total de las muestras, obtener datos de transcriptoma (RNAseq) microtranscriptoma (small-RNAseq) y Degradoma con el fin de caracterizar mediante herramientas bioinformáticas parejas candidatas de microARN/blancos potencialmente involucradas en la simbiosis y poder realizar análisis funcionales de posibles candidatos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Importancia de la simbiosis mutualista planta-microorganismo en la agricultura sustentable

La agricultura ha tenido continuamente un papel muy importante para la sociedad debido a que la producción de alimentos de origen vegetal es una de las principales fuentes de alimento para la población mundial (FAO, 2019). La producción agrícola está limitada por varios factores ambientales, por ejemplo, la inanición de nutrientes limita en gran medida el desarrollo y crecimiento de las plantas y, por lo tanto, la producción agrícola. Para mejorar el rendimiento de los cultivos y cubrir la demanda de alimento para el consumo humano, se utilizan los fertilizantes químicos de síntesis, ya que contienen nutrientes esenciales requeridos por las plantas como el Nitrógeno y el Fósforo. Sin embargo, su uso inadecuado ha ocasionado efectos secundarios como la producción de gases de efecto invernadero y la eutrofización de mantos acuíferos (L. Ye et al., 2020).

La contaminación por el uso de fertilizantes químicos está tomando mayor preocupación sobre el impacto ambiental, por lo que utilizar alternativas para mantener el rendimiento y productividad de los cultivos es un desafío (Tian et al., 2020). El uso de biofertilizantes es una alternativa de la agricultura sustentable, estos productos contienen un conjunto de microorganismos que promueven la absorción de agua y nutrientes en la planta y, por el contrario, de los fertilizantes químicos, no contaminan el ambiente (Pirttilä et al., 2021). Por ejemplo, la aplicación del hongo *Rhizophagus clarus* mejora el rendimiento de los cultivos de soja (*Glycine max* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en condiciones de campo (Cely et al., 2016). La capacidad de colonizar las raíces y establecer una simbiosis beneficiosa es la clave de estos microorganismos (Tian et al., 2020).

Una simbiosis es un fenómeno biológico en el cual interaccionan dos organismos de diferentes especies. Existen diferentes tipos de simbiosis, por ejemplo, el parasitismo, comensalismo y mutualismo. Naturalmente, las plantas establecen simbiosis beneficiosas con otros organismos como bacterias y hongos (Dimijian, 2000).

2.2. Simbiosis planta-hongo

Existen especies de hongos que colonizan las raíces de manera benéfica de una gran variedad de plantas, dicho proceso es conocido como micorriza. La relación recíproca entre las plantas y los hongos sigue siendo una estrategia eficaz de simbiosis, puesto que ha existido desde hace aproximadamente 460 millones de años (Redecker et al., 2000).

Se conoce que más del 90% de las especies de plantas terrestres establecen una simbiosis con hongos (Feijen et al., 2018). El hongo se beneficia mediante la absorción de una fuente de carbono como azúcares obtenidos de la planta hospedera, así mismo la planta se beneficia con un mejor crecimiento debido a una mayor absorción de nutrientes como fosfato inorgánico, amonio y nitrato provenientes del suelo y obtenidos mediante la interfaz del hongo (**Figura 1**) (Bonfante & Genre, 2010).

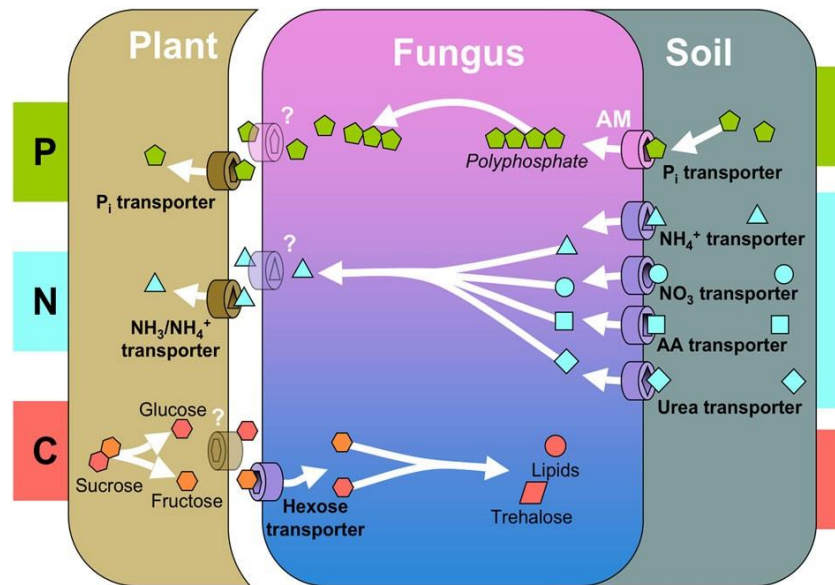


Figura 1. Intercambio de nutrientes en la simbiosis mutualista planta-hongo. El transporte de nutrientes fósforo (P) nitrógeno (N) y carbono (C) necesita la conexión suelo-hongo y hongo-planta. El intercambio de nutrientes es posible gracias a la presencia de proteínas transportadoras en ambos organismos (Bonfante & Genre, 2010).

La clasificación de los tipos de simbiosis planta-hongo de acuerdo a Kariman y colaboradores (2018) incluye características como la plasticidad de colonización, la

formación de estructuras simbióticas especializadas como arbuscúlos y red de Hartig, también estructuras simbióticas no especializadas como hifas y bobinas hifales o cuando son totalmente ausentes (**Figura 2**). Además, esta clasificación agrega los respectivos taxones de hongos y plantas hospederas predominantes de cada tipo.

Por ejemplo, en la simbiosis establecida con endófitos sebacinales (**SE**), los hongos colonizan las células de manera inter e intracelular de la epidermis hasta el córtex (**Figura 2**), involucra el taxón fúngico Basidiomycota y sus plantas hospederas predominantes incluye las briófitas, pteridófitas, angiospermas y gimnospermas (Kariman et al., 2018). Dentro de la clasificación de simbiosis SE, se encuentra el hongo mutualista *Piriformospora indica* (Varma et al., 2013).

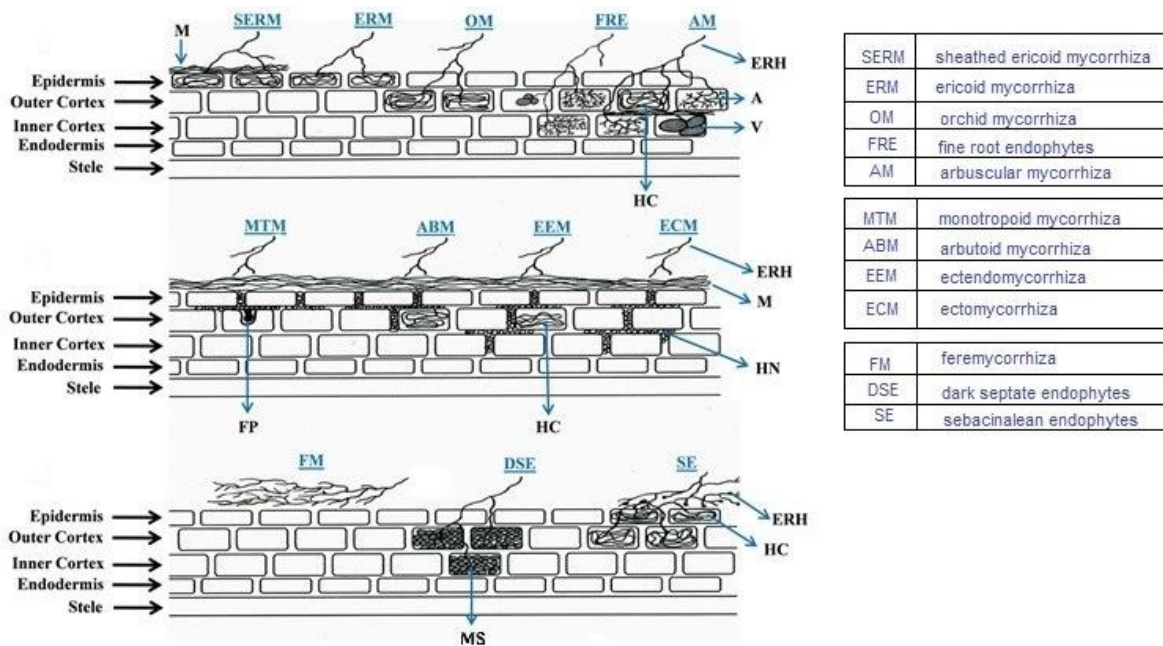


Figura 2. Estrategias de colonización en la interacción planta-hongo. A la izquierda de la figura se muestran los tipos de simbiosis con abreviaturas en azul. Las estructuras de interfaz especializadas y las no especializadas se muestran con abreviaturas en color negro y señaladas con flechas azules. En el caso de **FM** (del inglés, Feremycorrhiza) son ausentes. También se muestra la colonización celular ya sea intercelular e intracelular y hasta que capa de la raíz se establece la simbiosis. Abreviaturas en inglés de las estructuras fúngicas: **M** (mantle), **ERH** (extraradical hyphae), **A** (arbuscules), **V** (vesicles), **HC** (hyphal coils), **FP**

(fungal peg), **HN** (Hartig net) y **MS** (microsclerotia). A la derecha de la figura se muestra el nombre completo de cada tipo de simbiosis (Kariman et al., 2018).

2.3. Hongo mutualista: *Piriformospora indica*

Varma y colaboradores aislaron la rizósfera de los arbustos leñosos *Prosopis juliflora* y *Zizyphus nummularia* en el desierto de Rajasthan en India, descubriendo esporas del hongo *Piriformospora indica* nombrado así debido a la forma de las esporas y el lugar en donde se encontraron (Varma et al., 1999, 2012). Por razones filogenéticas, en 2016 Weiß *et al.*, reportaron la fusión de las especies *Piriformospora indica* y *Piriformospora williamsii* al género *Serendipita*. Actualmente, se puede encontrar en la literatura con ambos nombres, y en este escrito se mencionará como *P. indica*.

P. indica (= *Serendipita indica*) es un hongo mutualista comúnmente denominado “endófito” por su capacidad de colonizar las raíces de las plantas de manera asintomática similar a la micorriza arbuscular (AM) pero sin formar estructuras simbióticas especializadas durante la interacción como, por ejemplo, los arbusculos en la simbiosis AM (**Figura 2**). Este hongo pertenece al filum *Basidiomycota*, comprende la clase *Agaricomycetes*, el orden *Sebaciales* y la familia *Serendipitaceae* (NCBI: txid65672) (Kariman et al., 2018; Weiß et al., 2011, 2016). Actualmente, su genoma está totalmente secuenciado con un tamaño de 25 Mega bases (Zuccaro et al., 2011).

2.4. Características morfológicas de *Piriformospora indica*

El micelio joven de *P. indica* es blanquecino, posteriormente cambia a color marrón y carece de cuerpos fructíferos macroscópicos. Sus hifas poseen una pared celular delgada con un diámetro entre 0.7-3.5 μm , además están septadas irregularmente y pueden presentar interconexiones y tener forma de espiral o de bobina. Los septos presentan parentosomas que cubren los dolíporos de las hifas. Sus esporas se originan a partir de vesículas ubicadas en las puntas de las hifas, ya sea sola o en grupos, son asexuales, tienen forma de pera y están polinucleadas, encontrando entre 8-25 núcleos (**Figura 3**). *P. indica* puede crecer en un

medio de cultivo axénico, permitiendo un mejor estudio sobre este organismo (Varma et al., 2012; Weiß et al., 2016).

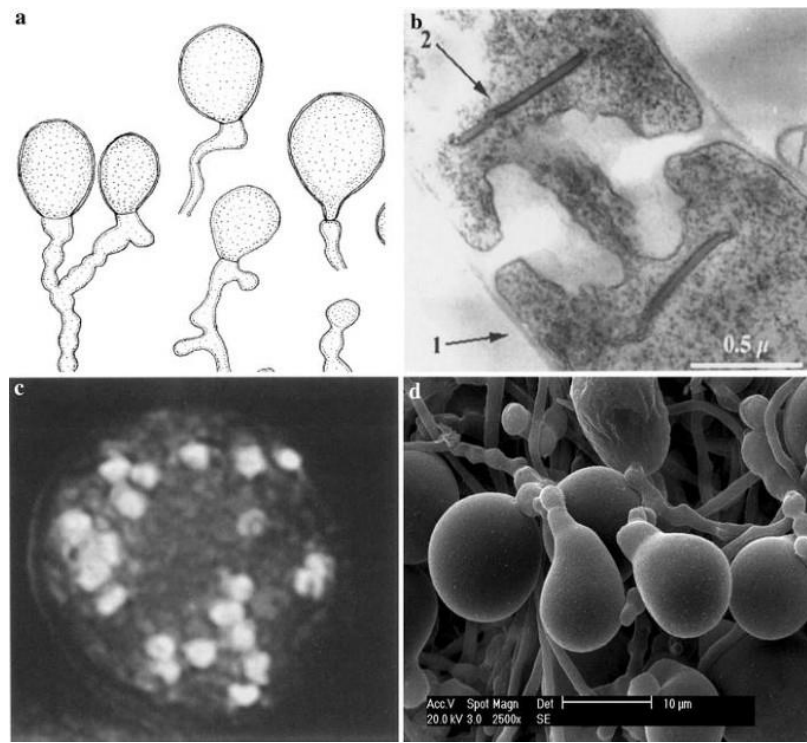


Figura 3. Estructuras fúngicas de *Piriformospora indica*. a) muestra la forma que presentan las esporas de *P. indica*, b) se observa la pared celular de la hifa (flecha 1) y el parentosoma (flecha 2), c) muestra una clamidospora multinucleada. Y en d) se observa una micrografía electrónica de barrido de las esporas (Varma et al., 2012).

2.5. Beneficios de la simbiosis con *Piriformospora indica*

Se han identificado una gran variedad de plantas hospederas del hongo *P. indica*, incluyendo briófitas, pteridófitas, gimnospermas y angiospermas (monocotiledóneas y dicotiledóneas) (Varma et al., 2013). Aproximadamente 150 especies de angiospermas son capaces de realizar una simbiosis con este hongo (Weiß et al., 2016).

Los beneficios en las plantas durante la interacción con *P. indica* comprende de manera general el mejoramiento de su estado nutricional, crecimiento y resistencia a diferentes tipos de estrés como, climas extremos e infección por patógenos (**Tabla 1**) (Waller et al., 2005; Sherameti et al., 2008; Kumar et al., 2009).

Gracias a los múltiples efectos positivos que proporciona a las plantas en condiciones de laboratorio y en campo, *P. indica* se considera un organismo de interés agrícola, principalmente como potencial biofertilizante (Bagde et al., 2010). Cabe mencionar, que su aplicación en campo se realizó en granjas de India (Smriti & Ajit, 2014).

Tabla 1. Beneficios de la interacción plantas con *P. indica*.

Planta hospedera	Beneficio	Literatura
<i>Withania somnifera</i>	Mejora la biomasa de la planta	(Rai et al., 2001)
cebada (<i>Hordeum vulgari</i>)	Actúa como biofertilizante mejorando el crecimiento de la planta	(Waller et al., 2005)
cebada (<i>Hordeum vulgari</i>)	Protege a la planta contra el estrés salino	(Baltruschat et al., 2008)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mayor resistencia bajo condiciones de sequía	(Sherameti et al., 2008)
maíz (<i>Zea mays</i>)	Protege a la planta contra el parásito <i>Fusarium verticilliodes</i>	(Kumar et al., 2009)
Orquídea (<i>Oncidium</i>)	Mejora la germinación de semillas y promueve el crecimiento de la planta	(W. Ye et al., 2014)

Además de realizar una simbiosis con plantas agronómicamente importantes, *P. indica* también puede asociarse con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Varma et al., 2013).

2.6. Importancia de la planta modelo: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea de la familia *Brassicaceae* nativa de Europa y Asia, se utiliza como modelo de investigación gracias a que posee un conjunto de características que facilitan su estudio. *A. thaliana* presenta un ciclo de vida relativamente rápido, el tamaño de la planta es pequeño, con una altura entre los 30 cm y en aproximadamente seis semanas se obtiene una planta adulta con semillas maduras. La planta es autógama, produce una gran cantidad de semillas y puede cultivarse en condiciones estériles. Además, tiene las estructuras típicas de las plantas con semillas como, flores y raíces (**Figura 4**) (Woodward & Bartel, 2018).

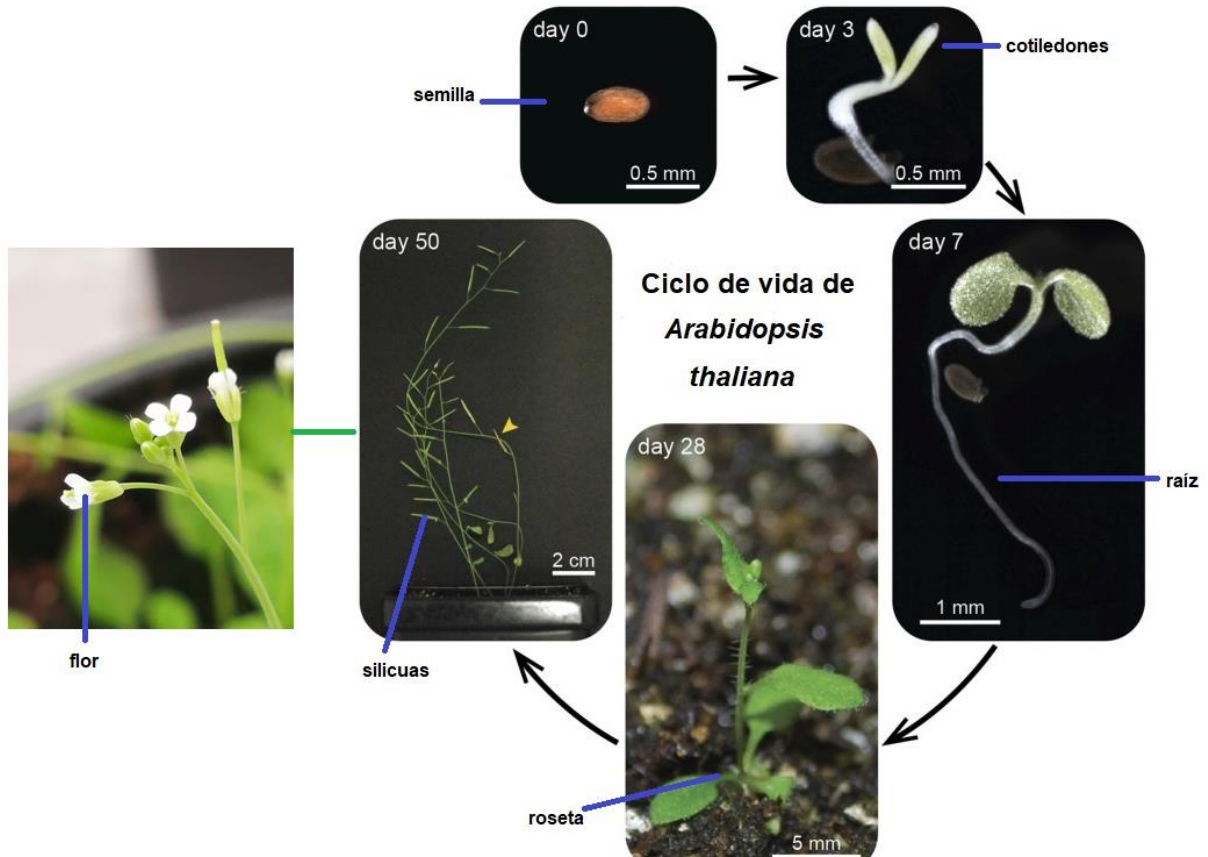


Figura 4. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Después de la germinación de la semilla de *A. thaliana*, se inicia la formación y desarrollo de diferentes estructuras (líneas azules) como las primeras hojas embrionarias (cotiledones), el desarrollo de la raíz primaria, formación de la roseta, tallo, hojas, flores y silicuas maduras que contienen semillas (Figura modificada de Woodward & Bartel, 2018).

Por otro lado, las características que convierten a *A. thaliana* en una herramienta ideal para estudios genéticos y moleculares es su genoma totalmente secuenciado con un tamaño de 135 Mb, el cual tiene cinco cromosomas (2n), 38 000 loci, incluyendo >20 000 genes que codifican proteínas y un amplio repertorio de líneas mutantes homocigotas (Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

A. thaliana no puede establecer simbiosis con los modelos clásicos de simbiosis mutualista como las bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB: Nitrogen Fixing Bacteria) o los hongos AM (**Figura 2**), los cuales requieren un conjunto de genes de la planta (vía común simbiótica) necesarios para establecer una simbiosis planta-microorganismo exitosa (**Figura**

5). En consecuencia, para estudios sobre estas dos interacciones, se utilizan otros modelos de plantas como las leguminosas (Venkateshwaran *et al.*, 2013).

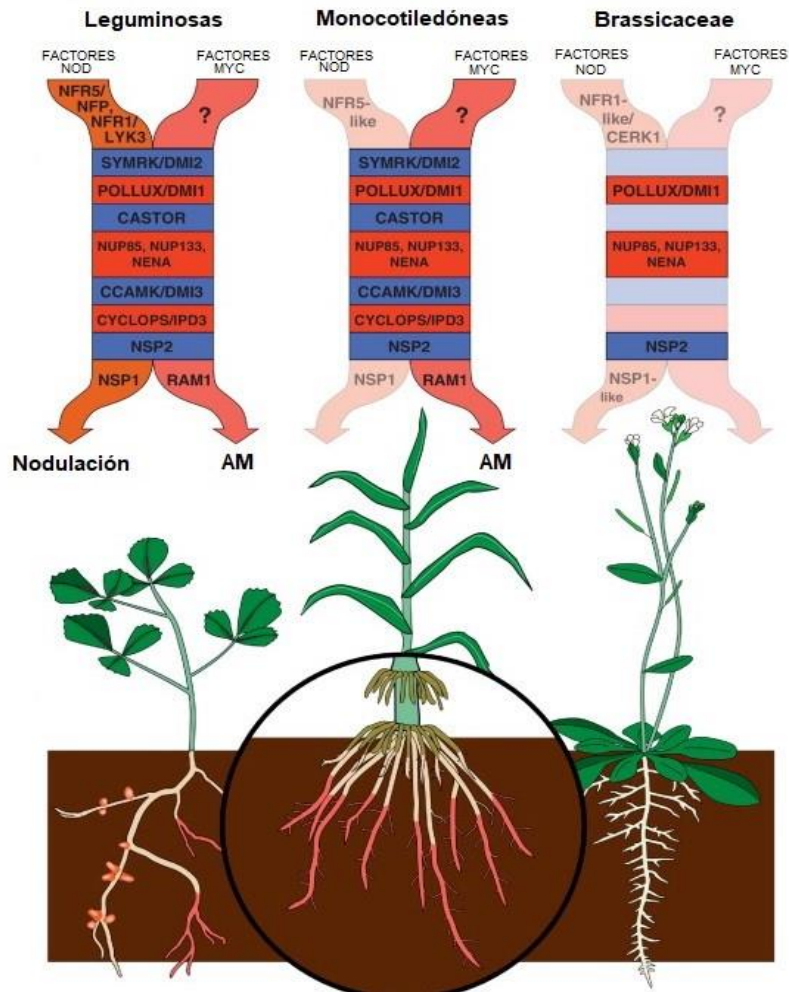


Figura 5. Comparación de las asociaciones en raíz con bacterias fijadoras de nitrógeno, micorriza arbuscular y la falta de las mismas en *Brassicaceae* (plantas que no se asocian con AM o NFB). Los genes de la vía común simbiótica (dentro de las flechas) permiten establecer la nodulación y micorrización. (Venkateshwaran *et al.*, 2013).

La ausencia de genes importantes de la nodulación y micorrización arbuscular en *A. thaliana* sugiere que posiblemente la planta utiliza otra vía simbiótica que puede estar, o no, relacionada con NFB o AM durante la interacción con *P. indica* (Banhara *et al.*, 2015).

2.7. Colonización espacio-temporal de *Arabidopsis thaliana* en simbiosis con *Piriformospora indica*

En el año 2011, Jacobs y colaboradores describieron la colonización espacio-temporal de *A. thaliana* por el hongo *P. indica*. Se distinguieron cuatro etapas principales. **1)** Colonización biotrófica temprana, **2)** Colonización biotrófica tardía, **3)** Colonización asociada a muerte celular y **4)** Esporulación intracelular.

La hemibiotrofia es el estilo de vida de *P. indica*, por lo tanto, durante el transcurso de la colonización en la raíz se presenta el cambio de su estado nutricional biotrófico a necrotrofico (Lahrman et al., 2013).

1). En la primera etapa, después de la germinación de esporas y el crecimiento de hifas extra-celulares, *P. indica* coloniza la epidermis de la raíz de manera inter e intracelular. El contacto activa en la planta la respuesta inmune MTI (MAMP-Triggered Immunity) temprana que induce como defensa el estallido de especies reactivas de oxígeno (ROS (Reactive Oxygen Especies)) (**Figura 6**) (Jacobs et al., 2011).

2). En la segunda etapa, las hifas colonizan mayor número de células epidérmicas, corticales y pelos radicales de la raíz de manera inter e intracelular, sin colonizar la endodermis y cilindro central. En esta etapa, *A. thaliana* activa su respuesta inmune MTI tardía, que induce la defensa mediada por la vía SA (Salicylic Acid) e IGS (Indole Glucosinolates). Las etapas biotróficas se mantienen alrededor de 0-3 días después de la inoculación con *P. indica* (< 3 dai) (day after inoculation) y se caracterizan por el mantenimiento intacto del contenido celular vegetal colonizado (**Figura 6**) (Jacobs et al., 2011).

3). En la tercera etapa, aproximadamente a 7 días después de la inoculación, la mayoría de células vivas colonizadas por *P. indica* sufren muerte celular, observándose la desintegración del contenido celular vegetal (> 3 dai).

4). En la última etapa las hifas forman esporas extra-celulares, y también intracelulares en las células muertas (~ 7-14 días después de la inoculación) (**Figura 6**) (Jacobs et al., 2011).

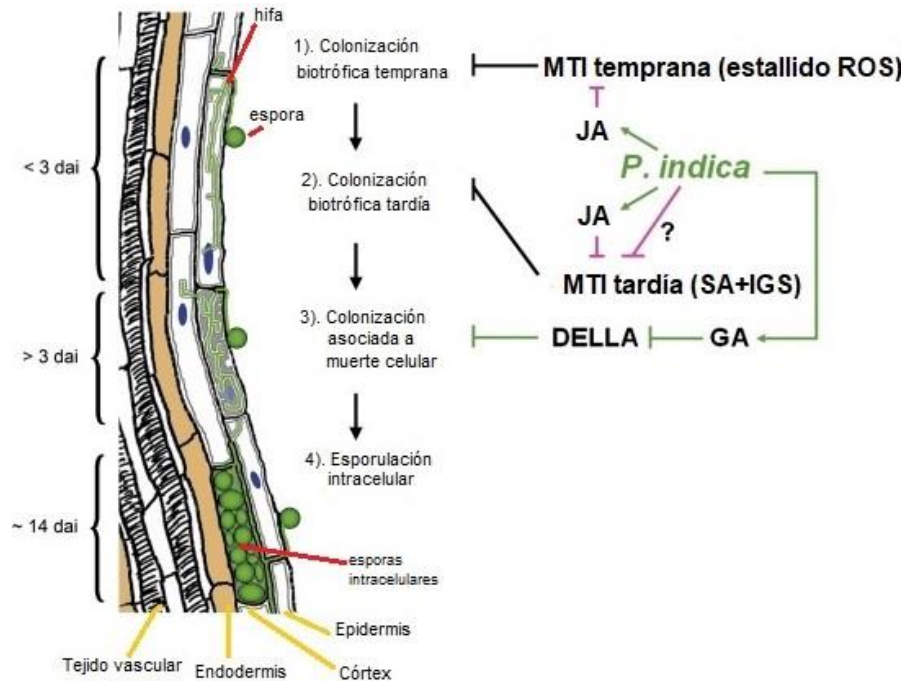


Figura 6. Modelo de la colonización espacio-temporal de la raíz durante la interacción entre *A. thaliana* y *P. indica*. La colonización comprende la entrada del hongo en la epidermis de la raíz hasta llegar al córtex (flechas amarillas). La figura muestra el avance de la colonización conforme al tiempo después de la inoculación con *P. indica* (< 3 dai, >3 dai y ~ 14 dai) y también el avance del establecimiento del hongo en las capas de la raíz. Además, a la derecha se muestra la respuesta de la planta ante la presencia del hongo. La MTI (MAMP-Triggered Immunity) temprana se activa en presencia del hongo liberando especies reactivas de oxígeno (ROS) a su vez *P. indica* suprime esta respuesta de defensa reclutando la señalización de JA (Jasmonic Acid). Posteriormente, se activa la MT tardía, donde participa la defensa de la planta vía la señalización de hormonas como SA (Salicylic Acid) e IGS (Indole Glucosinolates), donde *P. indica* también recluta la vía de JA y otras vías sin definir para contrarrestar la MTI tardía. *P. indica* puede tener un efecto en GA que ocasiona su inducción y así promover la degradación de las proteínas DELLA incrementando el umbral pro-apoptótico en las células de la raíz iniciándose la etapa asociada a muerte celular y después se promueve la formación de esporas del hongo dentro y fuera de la raíz (Jacobs et al., 2011).

Durante la interacción, *P. indica* recluta las señales de JA (Jasmonic Acid) y otras vías de la planta aún sin definir para contrarrestar la inmunidad de la planta. Además, también puede potenciar en *A. thaliana* la señalización de GA (Gibberellin), las cuales degradan las proteínas DELLA encargadas de reducir la muerte celular inducida por el estrés oxidativo (**Figura 6**) (Jacobs et al., 2011). Cabe mencionar que la muerte celular en la raíz no compromete el crecimiento de la planta. De hecho, en la simbiosis, *P. indica* permanece a gran escala como biótrofo a nivel de órgano (Weiß et al., 2016).

2.8. Genes involucrados en la simbiosis entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora indica*

La respuesta inmune y el intercambio de nutrientes durante la interacción forman parte de los principales procesos para el mantenimiento de la simbiosis. Esto incluye la regulación de genes de *P. indica* y de *A. thaliana*.

Como se mencionó anteriormente, la colonización por *P.indica* induce la inmunidad en *A. thaliana*. Para comprender mejor esta respuesta, Jacobs y colaboradores cuantificaron por qPCR la expresión relativa de los genes *CBP60g*, *MYB51* y *VSP2* que corresponden a marcadores de SA, MTI y JA, respectivamente en *A. thaliana* Columbia 0 (Col-0) y en la mutante *jin1-1* (*jasmonate insensitive 1-1*) colonizadas con *P. indica* y sin colonizar. La mutante con *P. indica* presentó una colonización reducida y por qPCR se observó particularmente en la fase biotrófica la acumulación del marcador de SA (*MYB51*) comparado con Col-0 +*P. indica*, sugiriendo que para una colonización exitosa, *P. indica* requiere de JA.

También se reportó que el gen *BOI* (Botrytis Suceptible1 Interactor), el cual codifica para una proteína involucrada en la regulación negativa de la muerte celular vía la señalización de GA, se indujo en la etapa asociada a muerte celular (Jacobs et al., 2011). Otro estudio reveló la participación del efector PIIN_08944 de *P. indica* durante la colonización de la raíz al interferir con la respuesta inmune basal vía SA de la planta (Akum et al., 2015).

Durante el intercambio de nutrientes, *P. indica* facilita la adquisición del fosfato y nitrato. Los genes *PiPT* y *AtPHT1* codifican para transportadores de fosfato que participan activamente en esta simbiosis (interfaz hongo-planta) (**Figura 7**) (Opitz et al., 2021).

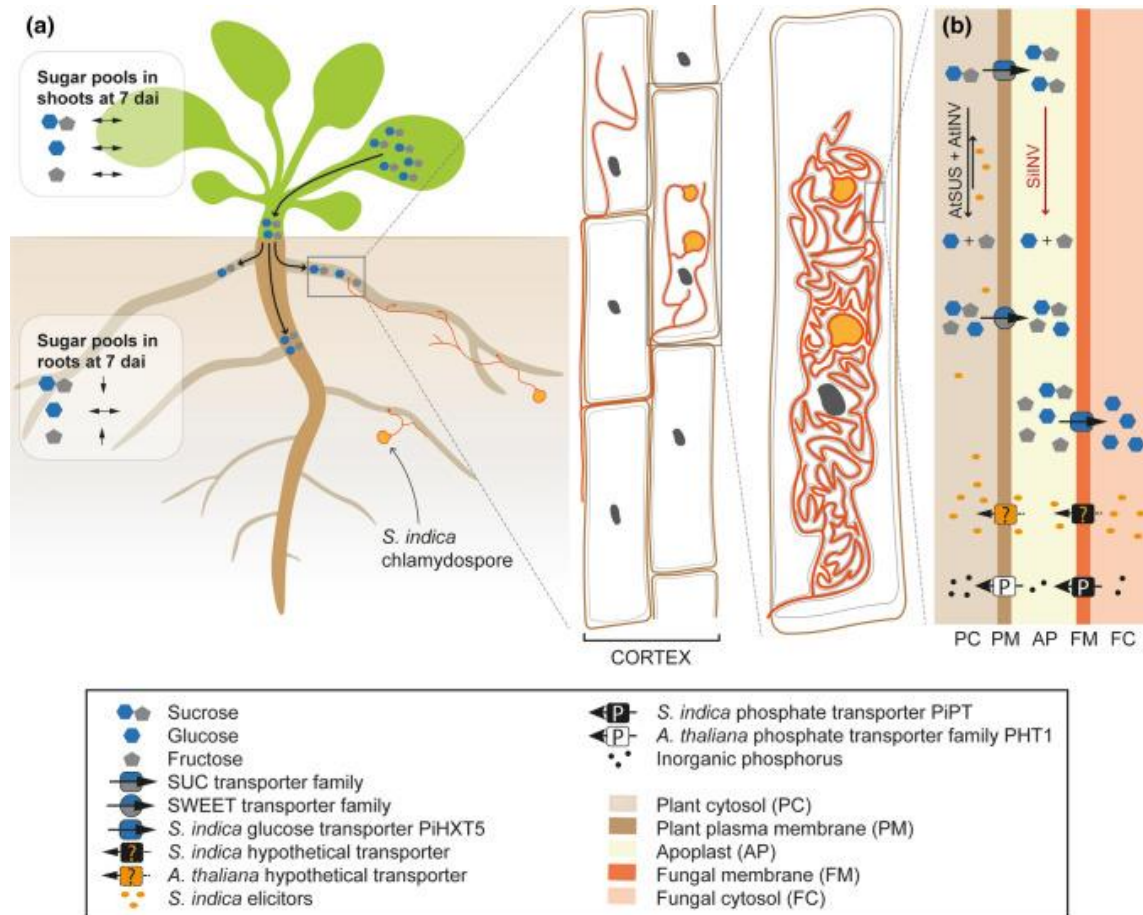


Figura 7. Metabolismo putativo del azúcar durante la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica* (= *Serendipita indica* (Si)). La interacción entre ambos organismos involucra la participación de transportadores en la interfaz hongo-planta (PiPT, PiHXT5) y viceversa (PHT1, AtSUC, AtSWEET). Así como proteínas invertasas y sacarosas sintasas encargadas de escindir la sacarosa (AtSUS, AtINV, SiINV). El proceso de conversión de sacarosa podría estar potenciado por elicitores del hongo (Opitz et al., 2021).

Por otro lado, los genes *AtINV*, *AtSUS*, *AtSUC* y *AtSWEET* codifican invertasas, sacarosas sintasas, transportadores de sacarosa y glucosa, respectivamente, involucrados en la nutrición de la interfaz planta-hongo. (**Figura 7**) (Opitz et al., 2021). Los genes *AtNIA2* y

AtSEX1 codifican a enzimas nitrato reductasa y enzimas degradadoras de almidón respectivamente. La expresión de ambos genes promueven la absorción del nitrato y degradación del almidón durante la interacción con *P. indica* (Sherameti et al., 2005).

En general, los estudios sobre la simbiosis entre *P. indica* y *A. thaliana* han revelado puntos clave sobre este proceso. Sin embargo, todavía no se han definido completamente, incluyendo la regulación de estos genes de interés vía los microARN.

2.9. MicroARN en plantas

Los procesos biológicos en las plantas son regulados por una amplia gama de moléculas, de las cuales los ARN pequeños juegan un papel muy importante (Borges & Martienssen, 2015).

La acción de los ARN pequeños es el silenciamiento transcripcional y postranscripcional. Se clasifican de acuerdo a su biogénesis en: **miRNA** (microRNA), **siRNA** (small interfering RNA), **nat-siRNA** (natural antisense siRNAs), **hetsiRNA** (heterochromatic siRNA), **hp-siRNA** (hairpin derived siRNA), **tsRNAs** (transfer RNA-derived small RNAs), **easiRNA** (epigenetically activated siRNAs) y **phasiRNAs** (phased secondary siRNAs) entre otros (Borges & Martienssen, 2015; J. Wang et al., 2019).

Particularmente, los microARN (=microRNA, miARN, miR) son pequeñas moléculas de ARN no codificantes con un tamaño de 20-22 nucleótidos aproximadamente, las cuales regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. La mayoría de los procesos biológicos en plantas están relacionados con la regulación vía los microARN, por ejemplo, el desarrollo, la reproducción, crecimiento e interesantemente la interacción planta-microorganismo como en la micorrización arbuscular y la nodulación con bacterias fijadoras de nitrógeno (Borges & Martienssen, 2015).

2.10. Biogénesis de los microARN en plantas

La biogénesis de los microARN en plantas es endógena y está regulada en diferentes niveles que incluyen: la transcripción, el procesamiento, modificación del ARN, ensamblaje del complejo del silenciamiento inducido por ARN (RISC, RNA-Induced Silencing

Complex), la interacción del microARN con su blanco y la degradación (Borges & Martienssen, 2015; J. Wang et al., 2019).

La producción de los microARN comienza en el núcleo cuando el ARN Polimerasa II dependiente de ADN inicia la **transcripción** de un gen *MIR*, dando origen al precursor primario del microARN (pri-miRNA), el cual se pliega en forma tallo-bucle. Posteriormente, la endonucleasa DCL1 (Dicer Like 1) **procesa** con varios cortes la escisión del pri-miRNA, generando una cadena de ARN dúplex del microARN (miARN/ miARN*) de 20-22 pares de base de las cuales se exhiben dos nucleótidos salientes en el extremo 3' en ambas cadenas con dos grupos hidroxilo cada una (2'-OH y 3'-OH) por otro lado, los extremos 5' poseen un fosfato libre. El dúplex de microARN es **metilado** por la proteína HEN1 (Hua Enhancer 1) en 2'-OH. La secuencia dúplex se ensambla a la proteína AGO1 (Argonaute 1) formándose el RISC. Después EXPO1 exporta el complejo al citoplasma. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el dúplex de microARN se exporte al citoplasma y posteriormente se ensamble el RISC. En el citoplasma solamente una cadena del dúplex miARN/ miARN*, es decir, la cadena guía o microARN, se ensambla selectivamente a la proteína AGO1, y la cadena pasajera o microARN* es expulsada y degradada. RISC se une a un transcrito blanco mediante complementariedad de secuencia entre microARN/blanco, actuando predominantemente con la **escisión** específica del transcrito entre las posiciones 10 y 11 nt del microARN. También, el RISC puede inhibir la síntesis de proteínas cuando no se induce una escisión del blanco. Por lo tanto, la acción del microARN es regular negativamente la expresión de su blanco. Algunos microARN pueden inducir la producción de siRNA secundarios como phasiRNA o easiRNA (**Figura 8**) (J. Wang et al., 2019). *Arabidopsis* cuenta con cuatro proteínas DCL 1-4 y diez proteínas AGO 1-10, siendo DCL1 y AGO1 las principales catalizadoras de la biogénesis y acción de los microARN, respectivamente (X. Fang et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Actualmente, los antecedentes sobre los microARN involucrados en la interacción entre las plantas con el hongo *P. indica* son escasos y comprende el estudio en plantas de *Oncidium* (orquídea), *Oryza sativa* (arroz) y *Brachypodium distachyon* (pasto) (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021; W. Ye et al., 2014, 2019).

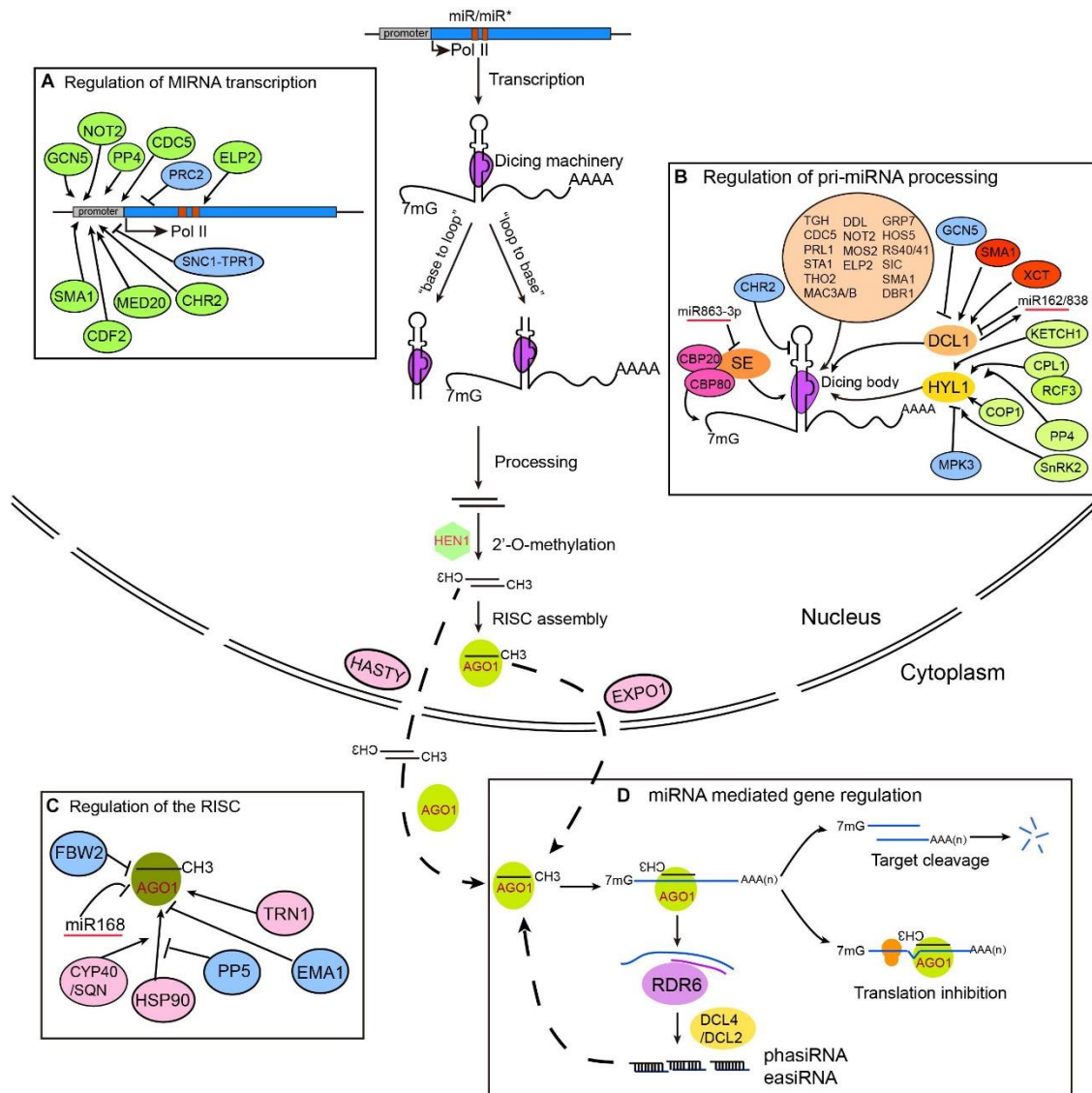


Figura 8. Modelo de la biogénesis de los microARN en plantas. Los genes *MIR* se transcriben generando el precursor pri-miRNA plegado en tallo-bucle. El precursor es procesado por DCL1 que procesa el pri-miRNA mediante varios cortes, ya sea iniciando en la base del tallo o en la base del bucle hasta obtenerse una secuencia dúplex del microARN (miARN/miARN*) de 20-22 pb el cual es metilado por HEN1. El dúplex del microARN se ensambla en AGO1 formándose el RISC y después es exportado por EXPO1 al citoplasma (Flechas punteadas). Aunque no se descarta que el dúplex se exporte al citoplasma y después se ensamble el RISC (Flechas punteadas). El RISC se une a un transcrito por complementariedad de secuencia donde se induce un corte específico del blanco (ARN mensajero) (Cuadro D). Por otro lado, el RISC también puede actuar inhibiendo la síntesis

de proteínas al no inducir un corte (Cuadro D). La regulación de la transcripción de un gen *MIR*, el procesamiento del precursor pri-miRNA, y del RISC están regulados por diferentes proteínas (Cuadros A, B y C). Además, algunos microARN que actúan mediante la escisión de un blanco pueden inducir la producción de siRNAs secundarios como siRNAs o easiRNAs (Cuadro D) (J. Wang et al., 2019).

2. 11. MicroARN involucrados en el crecimiento durante la simbiosis de *Oncidium* con *P. indica*

El análisis de secuenciación de ARN pequeños de orquídea (*Oncidium*) en simbiosis con *P. indica*, reveló la inducción de microARN durante la interacción. Encontraron 20 familias de microARN conservados y más acumulados en la biblioteca de orquídea inoculada con *P. indica*, por ejemplo, del miR156 y miR528. Mientras que otras familias se acumulaban menos (miR160, miR169, miR319, miR397) comparado con el control no inoculado (*-P. indica*). Los genes blancos predichos de estos microARN están involucrados en la señalización de auxinas, desarrollo y defensa de la planta correspondiente con la promoción del crecimiento en orquídea durante esta simbiosis (W. Ye et al., 2014).

2. 13. MicroARN involucrados en la defensa contra el patógeno *Erwinia chrysanthemi* durante la simbiosis de *Oncidium* con *P. indica*

La interacción entre *Oncidium* (orquídea) y *P. indica* reduce la infección en hojas por el patógeno de la pudrición blanda *Erwinia chrysanthemi* (*Ec*). En este estudio se enfocaron en buscar mediante herramientas bioinformáticas genes R (genes de resistencia) que fueran blancos de microARN con el fin de analizarlos en la interacción tripartita. El análisis de expresión por qPCR mostró 7 genes R significativamente más expresados (*Onc1207*, *Onc1537*, *Onc1724*, *Onc2555*, *Onc4126*, *Onc12822* y *Onc7005*) en muestras de hojas de orquídea infectadas localmente por *Ec* y en colonización con *P. indica* comparado a las muestras de hojas sin *P. indica* (W. Ye et al., 2019).

Posteriormente, el análisis de qPCR de los microARN mostró que el miR1507, miR1510a*, miR2118 y miR5246 estaban más acumulados en hojas infectadas con *Ec*, por

el contrario, cuando las raíces eran colonizadas con *P. indica* e infectadas con el patógeno, se redujo parcialmente la acumulación de estos microARN. Esto sugiere que *P. indica* induce una respuesta sistémica de resistencia que se transmite desde las raíces colonizadas hacia las hojas infectadas e involucra la regulación de los microARN y sus blancos (genes R) promoviendo en orquídea la resistencia contra *E. chrysanthemi* (W. Ye et al., 2019).

2. 14. MicroARN de plantas asociados a la resistencia a estrés salino en la interacción *Oryza sativa* y *P. indica*

En 2018, Kord y colaboradores secuenciaron los ARN pequeños de *Oryza sativa* (arroz) en simbiosis con *P. indica* bajo condiciones de estrés salino con el fin de dilucidar el impacto de los microARN durante la interacción, puesto que el fenotipo en las plantas inoculadas mostraban mayor tolerancia a este tipo de estrés. Generaron tres bibliotecas de muestras de raíces colonizadas con *P. indica* bajo diferentes gradientes de salinidad (0 mM, 50 mM y 100 mM de NaCl) y tres bibliotecas de raíces no colonizadas con las mismas condiciones. Encontraron que la mayoría de los microARN eran conocidos y se compartían entre plantas inoculadas y no inoculadas con *P. indica* en las seis condiciones, a excepción de 38 secuencias en S_0^- (sin *P. indica*) y 17 secuencias y S_0^+ (con *P. indica*) a 0 mM NaCl, 71 secuencias en S_0^- y 13 en S_0^+ a 50 mM NaCl y 11 secuencias en S_0^- y 28 en S_0^+ a 100 mM NaCl (Kord et al., 2019).

Más adelante, identificaron cinco microARN conocidos diferencialmente acumulados en las tres condiciones (miR164, miR166, miR156 y miR408). Los genes blancos predichos para estos cinco microARN estaban involucrados en la señalización de auxinas, desarrollo de la raíz, regulación redox y metabolismo de la pared celular. Además, encontraron que algunos blancos de los microARN nuevos participaban en la desintoxicación de Na^+ . Las funciones de estos genes predichos y su potencial regulación vía los microARN identificados indican que la resistencia al estrés salino involucra a estas pequeñas moléculas inducidas durante la simbiosis con *P. indica* (Kord et al., 2019).

2. 15. MicroARN asociados en la interacción de *Brachypodium distachyon* y *P. indica*

La secuenciación de ARN pequeños y ARN mensajeros de la planta modelo *Brachypodium distachyon* (pasto) con y sin *P. indica*, más la secuenciación de ARN pequeños y re-secuenciación del genoma de *P. indica*, reveló la importancia de los ARN pequeños y sus blancos entre reinos (planta-hongo). La comparación de lecturas del transcriptoma entre *B. distachyon* con *P. indica* y *P. indica* axénico mostró 2,962 genes fúngicos diferencialmente expresados (**DEG**) durante la interacción. La comparación de lecturas entre *B. distachyon* con *P. indica* y *B. distachyon* Control reveló 317 **DEG** de *B. distachyon* durante la interacción (Šečić et al., 2021).

Con lo anterior, se demostró el cambio transcriptómico en ambos organismos durante la simbiosis. Posteriormente, se identificó que *P. indica* presenta genes necesarios que codifican proteínas críticas para la producción de ARN pequeños, por ejemplo DCL y AGO. En los datos de ARN pequeños de *B. distachyon* con *P. indica* se detectaron 16 microARN conocidos, los cuales pertenecen a familias conservadas que regulan el crecimiento y desarrollo, como, por ejemplo, el miR165/miR166, miR156, miR529, miR168, miR399 y miR408 (Šečić et al., 2021).

Después identificaron mediante una tubería bioinformática preestablecida potenciales candidatos de ARN pequeños entre reinos (ck-sRNAs; cross kingdom-small RNAs), es decir, ARN pequeños de *B. distachyon* que posiblemente regulan genes blancos de *P. indica* o viceversa, ARN pequeños de *P. indica* regulen genes blancos de *B. distachyon*. Encontraron un conjunto de ARN pequeños candidatos a ser ck-sRNA en ambos organismos exclusivamente en muestras con *P. indica*. Un total de 358 transcritos de *P. indica* regulados negativamente corresponden a blancos predichos de 228 ARN pequeños únicos de *B. distachyon*. Por ejemplo, *bdi-MIR408* (*Bd sRNA 10*) mostró blancos predichos de cross kingdom en tres transcritos de *P. indica*, CCA72944, CCA72668 y CCA74115. La regulación entre reinos vía los ARN pequeños, incluyendo los microARN de plantas, podría dar evidencia de como *B. distachyon* responde a la colonización de *P. indica* durante los tiempos tempranos (4 dpi) (Šečić et al., 2021).

Con base en lo anterior, continuar la investigación molecular de los microARN durante la simbiosis con *P. indica* en la planta modelo *A. thaliana* nos permitirá conocer los

microARN que se encuentren involucrados en la interacción con *P. indica* y poder realizar un análisis más amplio de aquellos candidatos importantes (microARN/blancos) mediante el uso de herramientas moleculares y biotecnológicas como el análisis en mutantes y sobreexpresantes de *A. thaliana*, para dilucidar el diálogo molecular de los mecanismos regulados por estos ARN pequeños en la simbiosis.

3. JUSTIFICACIÓN

Las interacciones planta-microorganismo están tomando cada vez más importancia, considerándose una alternativa para contrarrestar los efectos negativos del estrés biótico y abiótico que presentan las plantas, principalmente las de interés agronómico. Los estudios sobre el hongo benéfico *Piriformospora indica* han demostrado su versatilidad de colonizar plantas y promover múltiples beneficios. Por tal motivo resulta interesante descifrar los mecanismos involucrados en la simbiosis con *P. indica* particularmente la regulación vía los microARN. Actualmente, estas moléculas se han investigado en plantas de orquídea, arroz y pasto en simbiosis con el hongo. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, todavía falta descubrir cuáles son los microARN involucrados en la simbiosis con *P. indica*. Establecer el catálogo de los ARN pequeños y sus blancos respectivos asociados con esta interacción en este modelo de estudio tiene la doble ventaja de: 1) descubrir las particularidades de estas regulaciones en plantas que carecen de la ruta simbiótica común, impidiendo el desarrollo de las simbiosis mutualistas radicales modelo, y 2) abrir el camino a la caracterización funcional de los candidatos prioritarios debido a que *A. thaliana* cuenta con la batería de herramientas moleculares más eficientes y amplias.

4. HIPÓTESIS

Las parejas microARN/blancos candidatas regulan los procesos simbióticos entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora indica*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las parejas de microARN/blancos potencialmente involucradas en la simbiosis entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora indica*.

Objetivos particulares

- 1) Identificar microARN candidatos involucrados en la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*.
- 2) Identificar genes blancos de microARN candidatos involucrados en la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*.
- 3) Analizar la función de un microARN candidato en *A. thaliana* en simbiosis con *P. indica*.

6. METOLOGÍA

Con el fin de determinar las parejas de microARN/blancos fue necesario secuenciar el ARN total para identificar aquellos genes blancos regulados por microARN y, así mismo, identificar estas pequeñas moléculas y confirmar su regulación sobre su respectivo blanco. Para ello se generó el material vegetal suficiente para extraer el ARN del tejido de raíz en la interacción entre *P. indica* y *A. thaliana* en tres tiempos importantes de la colonización por el hongo que comprende su etapa biotrófica, necrotrófica y esporulación. Además, para evaluar la importancia de los microARN en esta simbiosis, se analizaron algunas mutantes de *A. thaliana* durante su interacción con *P. indica*.

6.1 Material Vegetal

6.1.1. Cultivo in vitro del hongo *Piriformospora indica*

Se utilizó la cepa de *Piriformospora indica* DSM11827. El hongo se cultivó en medio sólido KM (Kaefer Medium) por 21 días en oscuridad continua a una temperatura de 22- 24 °C (**Anexo 11.1**) (Hill & Käfer, 2001; Johnson et al., 2011). Del micelio se extrajeron varios discos de *P. indica*. Se dejó crecer el hongo en aprox. 30 cajas Petri con KM por cada lote de plantas. En total se necesitó 270 cajas Petri con el hongo para 9 lotes (Condición + *P. indica*).

6.1.2. Cultivo in vitro de *Arabidopsis thaliana*

Se esterilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) mediante un lavado de etanol al 70% por 15 minutos en agitación y varios lavados con etanol al 100%. Las semillas se sembraron en cajas Petri con medio sólido MS ¼ (Murashige and Skoog, 1% sacarosa y 0.8% de agar, pH 5.7) y se mantuvieron a 4 °C por 48 horas. Después, las cajas se transfirieron a una cámara de crecimiento en condiciones controladas (temperatura 20- 22 °C y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad) por 10 días.

6.1.3. Co-cultivo de *Arabidopsis thaliana* con *Piriformospora indica*

En cajas Petri con medio sólido PNM (Plant Nutrient Medium) (**Anexo 11.1**) se colocó un papel filtro Whatman 541 húmedo y previamente esterilizado. Sobre el filtro se

colocaron 4 discos de *P. indica*. Las cajas se transfirieron a una cámara de crecimiento en condiciones controladas (temperatura 20- 22 °C y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad) durante 7 días (**Figura 9**) (Johnson et al., 2011).

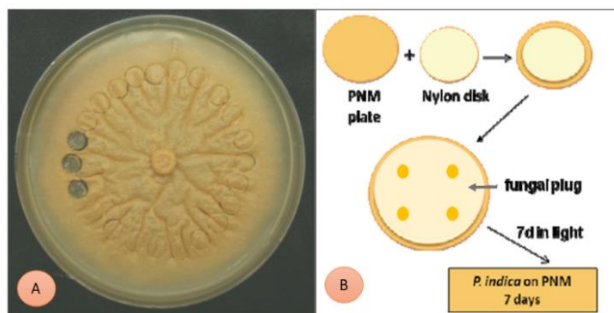


Figura 9. Cultivo de *Piriformospora indica*. A) Discos de *Piriformospora indica* con 4 semanas de crecimiento. B) Método de cultivo de *P. indica* sobre papel filtro y medio PNM (Figura modificada de Johnson et al., 2011).

Posteriormente, las plántulas de 10 días de crecimiento se trasplantaron en las cajas con medio PNM y discos de *P. indica*. El co-cultivo se transfirió a una cámara de crecimiento en condiciones controladas (temperatura 20- 22 °C y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad) por 3 días (réplica 1, 2 y 3), 7 días (réplica 1,2 y 3) y 14 días (réplica 1, 2 y 3). En cada tiempo se colectó el tejido de raíz con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Para los controles se realizó la misma metodología pero excluyendo el hongo (Johnson et al., 2011). Cada lote de plantas incluía la colecta de 350 plántulas para el tiempo 3 días, 300 plántulas para el tiempo 7 días, y 250 plántulas para el tiempo 14 días en ambas condiciones ($\pm P. indica$), con un total de aproximadamente 1 800 plántulas por lote. En total se realizaron 3 lotes que corresponden a las 3 réplicas biológicas (3, 7 y 14 días $\pm P. indica$)

6.1.4. Tinción de raíces

En cada colecta se verificó la colonización de *P. indica* mediante microscopía. Para ello se cortaron las raíces de las plántulas y se incubaron a 96 °C por 1 minuto con KOH al 10%. Después se agregaron dos reactivos para teñir las raíces, $10\mu\text{g ml}^{-1}$ de WGA-AF480 (Wheat Germ Aglutinin-Alexa Fluor 488) y $10\mu\text{g ml}^{-1}$ de yoduro de propidio, dejando la reacción por 20 minutos en oscuridad. Para los controles se realizó la misma metodología. Las muestras se analizaron con un microscopio Leica usando un juego de filtros GFP (WGA-AF488: excitación 450-490 nm, emisión 500-550 nm y para el yoduro de propidio: excitación 540-580 nm, emisión 608-683 nm) (Banhara et al., 2015).

6.2 Análisis de muestras de ARN

6.2.1. Extracción de ARN total de tejido de raíces

Dado que se verificó la colonización por *P. indica* en raíces, se procedió a extraer el ARN total de las muestras de raíces \pm *P. indica*. Se tomaron 100 mg de tejido por muestra y se extrajo el ARN de acuerdo al protocolo miRVana Isolation de Ambion (**Anexo 11.2**).

La pureza e integridad del ARN se obtuvo midiendo la muestra en un nano espectrofotómetro NP80 de Implen y realizando electroforesis, se utilizó un gel de Agarosa al 1% con 1 ml de cloro al 95% y buffer TAE 1X. Cada muestra se cargó en el gel con 200 ng de ARN. Para visualizar las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 25S y 18S se agregó BrEt (Bromuro de Etidio).

6.2.2. Diseño de oligonucleótidos específicos de microARN para RT

Se diseñaron oligonucleótidos específicos de los microARN miR397 y miR408 de *A. thaliana* porque de acuerdo a la literatura, estos microARN se inducen en la simbiosis con *P. indica* (**2.11 y 2.15**) (Ye et al., 2014; Šečić *et al.*, 2021). Para ello se utilizó la técnica Stem-Loop, que consiste en unir 6 nucleótidos (nt) complementarios del extremo 3' de nuestro microARN de interés a una secuencia artificial de 44 nt que puede formar un loop, permitiendo actuar como templado en la retrotranscripción (RT) durante la síntesis de ADN complementario (**Figura 10**) (Kramer, 2011).

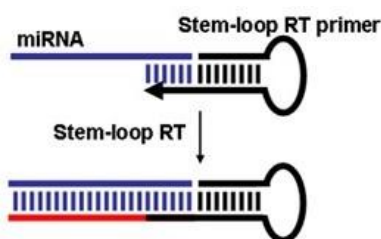


Figura 10. Estructura del Stem Loop. En azul se muestra la secuencia del miARN maduro de 20-22 nt unido a la secuencia artificial mediante 6 nt complementarios. Después de la retrotranscripción se obtiene la amplificación del miARN (en rojo) (Figura modificada de Varkonyi-Gasic et al., 2007).

6.2.3. Síntesis de ADN complementario

A partir del ARN total se realizó la síntesis de ADN complementario (ADNc) por RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) de las muestras de acuerdo al protocolo descrito por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007). Se utilizó 1 µg de ARN total por muestra (**Anexo 11.3**).

6.2.4. PCR cuantitativa

Para el análisis de expresión relativa de la síntesis del ADN complementario se realizó la técnica qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) de acuerdo al protocolo del aparato Applied Biosystems 7300 y del kit SYBR Green PCR Master Mix de Thermo Fisher Scientific. Por cada muestra se hicieron dos réplicas técnicas en placas de 96 pocillos.

Se evaluó la expresión relativa de dos genes relacionados con la defensa de las plantas. *PR1* (Pathogenesis Related 1) involucrado en la vía de señalización del ácido salicílico y *PDF1.2* (Plant Defensin 1.2) involucrado en la vía de señalización del ácido jasmónico (Camehl *et al.*, Li *et al.*, 2019) y los microARN miR397 y miR408.

Los microARN se normalizaron con el gen de referencia U6 (U6 small nuclear RNA) y los genes se normalizaron con Actina y *CF150*. Se utilizó el método comparativo de Ct y la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes en GraphPad Prism 8.

6.3. Análisis bioinformático

6.3.1. Secuenciación de muestras de ARN

Una vez terminado el análisis del ARN con las técnicas anteriores, se mandaron las muestras a secuenciar a **BGI** (Beijing Genomics Institute, Hong Kong) para obtener el transcriptoma (RNAseq) y el microtranscriptoma (small-RNAseq). En cambio, el degradoma (Degradome-seq) se envió a secuenciar en **LC Sciences** (Houston, Texas) (**Tabla 2**). Previo a la secuenciación, BGI y LC Sciences realizaron un control de calidad mediante una evaluación del RIN (RNA Integrity Number) y la cantidad de ARN total.

Tabla 2. Generación de bibliotecas

	Transcriptoma (Biblioteca de ARN mensajeros)	Microtranscriptoma (Biblioteca de ARN pequeños)	Degradoma (Biblioteca de ARN mensajeros degradados)
Tiempo 3	3 réplicas \pm P. indica	3 réplicas \pm P. indica	Pool de los tres tiempos \pm P. indica
Tiempo 7	3 réplicas \pm P. indica	3 réplicas \pm P. indica	
Tiempo 14	3 réplicas \pm P. indica	3 réplicas \pm P. indica	
Total de muestras que se enviaron	18	18	2

6.3.2. Transcriptoma

Los resultados de secuenciación se analizaron con diferentes herramientas bioinformáticas.

Para el análisis del transcriptoma se utilizó el cluster kayab del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM con la terminal MobaXterm. En el cluster se ejecutaron bowtie2 para generar archivos de salida SAM (Sequencing Alignment Map) y RSEM (RNA-seq by Expectation-Maximization) para cuantificar la abundancia de los genes de acuerdo al mapeo de lecturas sobre el genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 (Bo Li & Colin N Dewey, 2011) (**Anexo11.5**).

Posteriormente, se tomaron los valores enteros “expected count” de los archivos de salida de RSEM para usarse en la plataforma IDEAMEX (Integrative Differential Expression Analysis for Multiple Experiments) del IBt, UNAM que utiliza, entre otros, el programa DESeq2. Esto nos proporcionó los genes expresados diferencialmente (DEG) del transcriptoma (**Anexo11.6; Figura 11**) (Jiménez-Jacinto *et al.*, 2019).

6.3.3. Microtranscriptoma

Para el análisis del microtranscriptoma se ejecutó el software ShortStack el cual cuantifica los patrones de alineación de ARN pequeños en el genoma de referencia, también evalúa la estructura de los precursores y la abundancia de tamaño de cada ARN pequeño, de tal manera que anota un locus *MIRNA* sin una anotación previa. Además, también identifica loci que producen otros ARN pequeños (Michael J. Axtell, 2013).

Los datos obtenidos en ShortStack se utilizaron para la plataforma IDEAMEX y obtener los ARN pequeños expresados diferencialmente (DE) (Figura 11).

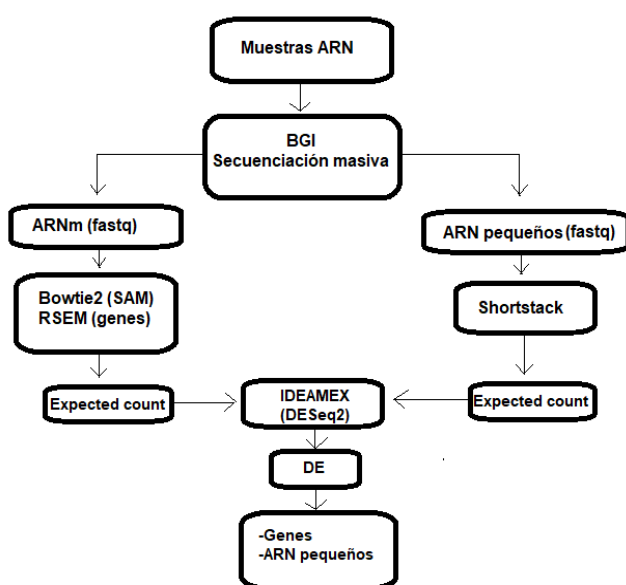


Figura 11. Análisis de datos. Herramientas utilizadas para el alineamiento de lecturas de los genes y ARN pequeños en el genoma de referencia de *A. thaliana* y la obtención de recuentos de genes y loci productores de ARN pequeños. Resultados de genes y ARN pequeños diferencialmente expresados ($p \leq 0.05$).

Posteriormente, se integró en un archivo los resultados de ShortStack y de IDEAMEX (Log2FC, p value) y se procedió a hacer la anotación de todas las secuencias de ARN pequeños. Se utilizaron las bases de datos miRbase (Kozomara *et al.*, 2019) y sRNAanno (Figura 12) (Chen *et al.*, 2021).

Se seleccionaron los ARN pequeños diferencialmente expresados en los tres tiempos con un tamaño de 18-25 nucleótidos. Estos microARN se ejecutaron en PsRNATarget el cual

predice genes blancos de microARN por complementariedad de bases: se tomó como umbral un valor de expectativa ≤ 3 (**Anexo 11.7; Figura 12**) (Dai & Zhao, 2011).

El resultado de PsRNATargetr proporcionó una lista de genes predichos. Por lo que, se relacionaron los genes correspondientes del transcriptoma incluyendo los DEG con la lista de genes predichos (**Figura 11**). Después se realizó la anotación de los genes con la base de datos TAIR 10 (**Figura 12**).

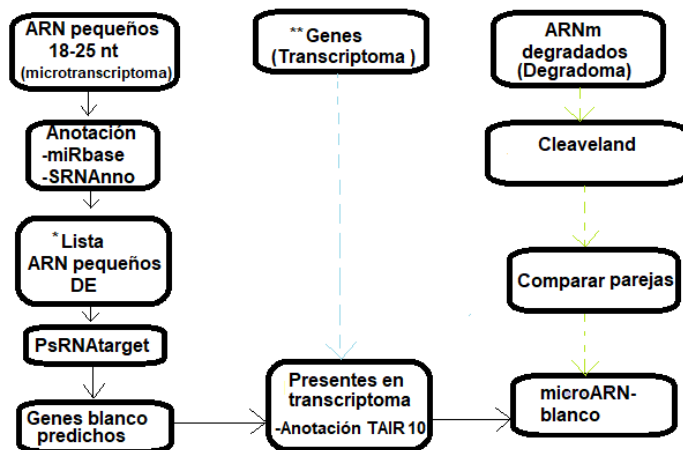


Figura 12. Análisis de datos. Herramientas utilizadas para la anotación de genes y ARN pequeños. Integración de los resultados del microtranscriptoma, transcriptoma y degradoma. Los asteriscos *, ** corresponde a los resultados obtenidos de IDEAMEX.

6.3.4. Degradoma

Para el análisis del degradoma se utilizó el software CleaveLand (Addo-Quaye *et al.*, 2009) el cual fue ejecutado por LC Sciences. Este programa permite encontrar genes blancos de microARN mediante una marca de degradación, utilizando los datos secuenciación del microtranscriptoma, transcriptoma y degradoma (**Figura 13**).

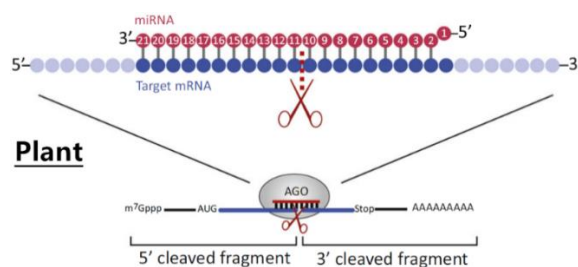


Figura 13. Degradación de un blanco inducida por un microARN. La acción guiada por miARN se presenta en el nucleótido 10 y 11 del microARN dejando el ARN blanco escindido y desprotegido del extremo 5', siendo los fragmentos de interés secuenciados en el degradoma.

CleaveLand proporcionó una lista de los blancos degradados con su correspondiente microARN, donde se seleccionaron las parejas con un p value ≤ 0.05 y una categoría 0-2 (**Figura 12**).

6.3.5. Candidatos microARN/blancos

Se realizó la integración de los resultados de secuenciación (**Figura 11 y 12**) para seleccionar los mejores candidatos microARN/blancos. Como prioridad se consideraron aquellas parejas con una relación inversa de su expresión, un p-value ≤ 0.05 en ambos candidatos. Cumplir con la identificación de *MIRNA* de acuerdo a los parámetros de Shortstack y confirmar las parejas candidatas con los resultados de CleaveLand. Aun así, de no cumplir todos los requisitos se tomaron en cuenta varios candidatos con resultados menos estrictos.

6.4. Análisis funcional

6.4.1. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Se realizó un pedido de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con inserciones de T-DNA del banco ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center), con el fin de analizar el fenotipo en raíz a los 14 días en simbiosis con *P. indica*. Se pidieron tres líneas diferentes con la misma inserción de T-DNA.

6.4.2. Cultivo de plantas

Debido a que los stocks de líneas mutantes tenían semillas limitadas, se realizó el cultivo de las plantas en sustrato para generar más cantidad de semillas. Por lo cual se usaron macetas con sustrato Sunshine mezcla #3 y vermiculita. Se sembraron alrededor de 25 semillas por línea, incluyendo a Col-0. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero por seis semanas después se colectaron las semillas y se almacenaron a 4 °C.

6.4.3. Genotipificación de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Se colectaron entre 4-5 hojas de la roseta de una planta con dos semanas de crecimiento en invernadero. Esto se realizó en tres plantas individuales por línea. Para identificar las líneas homocigotas se extrajo el ADN de las muestras de acuerdo al protocolo de Doyle & Doyle (1987) utilizando CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (**Anexo 11.8**).

Luego se genotipificó cada línea por PCR (**Anexo 11.4**). Los juegos de oligonucleótidos utilizados son específicos de las líneas mutantes LBb1.3, LB1 y GK para las líneas SALK, SAIL y GK respectivamente, los cuales se unen a la inserción de T-DNA. En cambio, los oligonucleótidos que se unen al gen de interés son LP (Left Primer) y RP (Right Primer) (**Figura 14**).

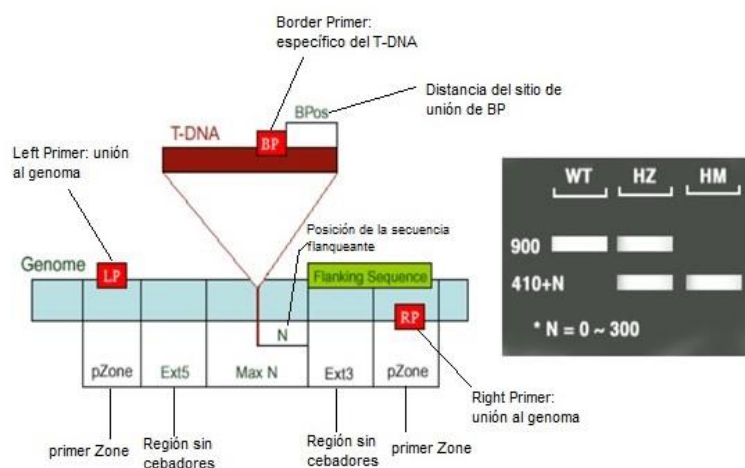


Figura 14. Inserción de T-DNA en el genoma. A la izquierda se muestran los sitios de unión de oligonucleótidos. El lado derecho de la figura muestra los productos de PCR en un gel de agarosa Wild Type (WT), Homocigous (HZ) y Heterocigous (Signal Salk Institute Genomic Analysis Laboratory).

El escrutinio de líneas heterocigotas consistió en cultivar 15 semillas in vitro y genotipificar cada planta hasta obtener una línea homocigota. La planta HM se aisló y se cultivó en invernadero para producción de semillas.

6.4.4. Fenotipificación

Se evaluó el fenotipo de la raíz en líneas mutantes en simbiosis con *P. indica*. Por lo tanto, se hizo el cultivo y co-cultivo de ambos organismos de acuerdo al apartado 6.1.1- 6.1.3. Se realizó la misma metodología en los controles Col-0 y líneas mutantes -*P. indica*, así como Col-0 +*P. indica*.

El co-cultivo de la línea mutante +*P. indica* se mantuvo hasta los 14 días. Se evaluaron 15 plántulas por línea de las cuales se tomaron fotografías para medir longitud de raíz con el programa Fiji IMAGE. Después se tiñeron de acuerdo al apartado 6.1.4. Se repitió el mismo procedimiento en los controles (**Figura 15**).



Figura 15. Raíz de *Arabidopsis thaliana*. Longitud de raíz medida con Fiji IMAGE

Después se obtuvo el porcentaje de colonización haciendo un conteo de esporas intra y extracelulares mediante el método McGonigle *et al.*, 1990 que se adaptó para el análisis de la colonización con *P. indica* en raíz de *A. thaliana*. Por consiguiente, se observó la raíz en el microscopio compuesto (**Figura 16**). Los datos se analizaron con la prueba estadística tukey ($p \leq 0.05$) en Graph Pad Prism 8.

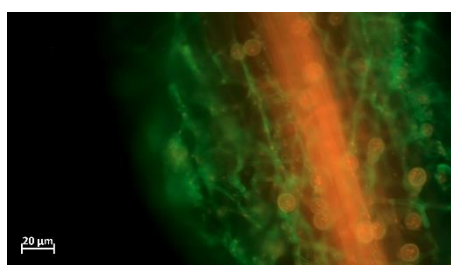
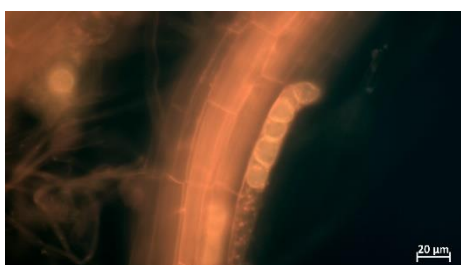


Figura 16. Estructuras fúngicas. Con la doble tinción en raíz con WGA-AF488 y yoduro de propidio se visualizaron las esporas. El conteo de esporas intracelulares y extracelulares se realizó con un aumento de 40x (barra 20 μ m) en _intersecciones en _segmentos de raíces.

Por otro lado, también se evaluó el fenotipo mediante la tinción en raíz con azul-tripano para visualizar y contar las esporas totales intra y extracelulares por microscopio (**Figura 17**) (Vahabi *et al.*, 2011). Los datos se analizaron con la prueba estadística tukey ($p \leq 0.05$) en Graph Pad Prism 8.

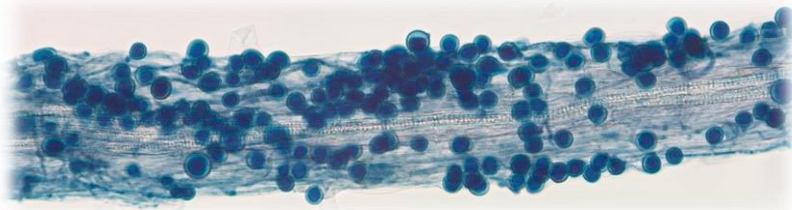


Figura 17. Estructuras fúngicas. Mediante tinción con azul-tripano se visualizaron las esporas y se realizó el conteo total en la raíz completa.

7. RESULTADOS

7.1. Material Vegetal

Se obtuvieron plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) las cuales se sometieron a co-cultivo con el hongo *Piriformospora indica* (**Figura 18**). Se realizaron tres réplicas biológicas de cada lote \pm *P. indica* a los 3, 7 y 14 días post-co-cultivo.

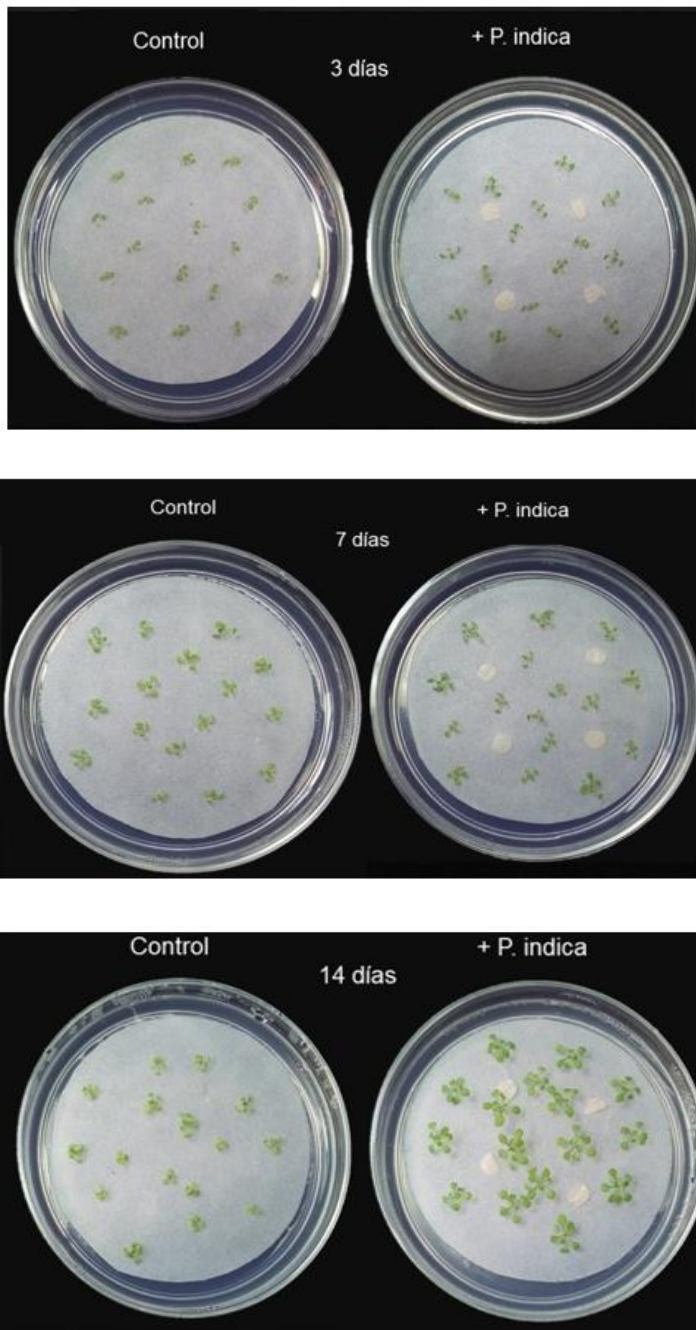
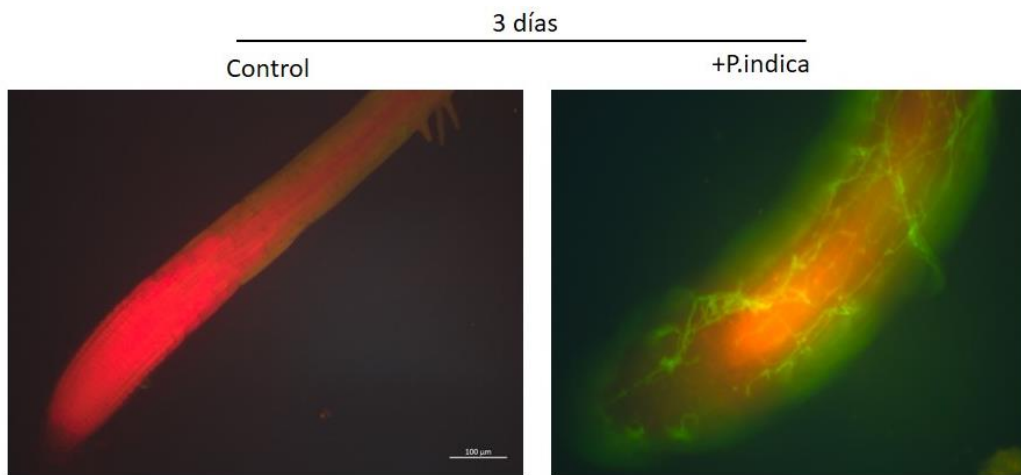


Figura 18. Cultivo in vitro de Col-0 en medio PNM \pm *P. indica*. Las plántulas con 10 días de crecimiento en medio MS se trasplantaron a medio PNM con un filtro Whatman 541 sin el hongo (control) y en co-cultivo, después se colectaron las raíces a los 3, 7 y 14 días post-co-cultivo.

Las plántulas con *P. indica* a los 3 y 7 días post-co-cultivo no presentaron cambios visibles en la parte aérea. Por otro lado, a los 14 días post-co-cultivo, las plántulas presentaron un mejor crecimiento de las hojas comparado a la condición control, mostrándose un efecto positivo en la promoción del crecimiento en Col-0 gracias a *P. indica*. En cada colecta se analizaron algunas raíces mediante una doble tinción con WGA-AF488 y yoduro de propidio los cuales emiten fluorescencia. De acuerdo a lo esperado, en los co-cultivos de los tres tiempos se observaron hifas, y en los tiempos 7 y 14 días se observaron esporas. En los controles no se observaron estructuras fúngicas (**Figura 19**). El material biológico colectado se utilizó para extraer el ARN total de las raíces.



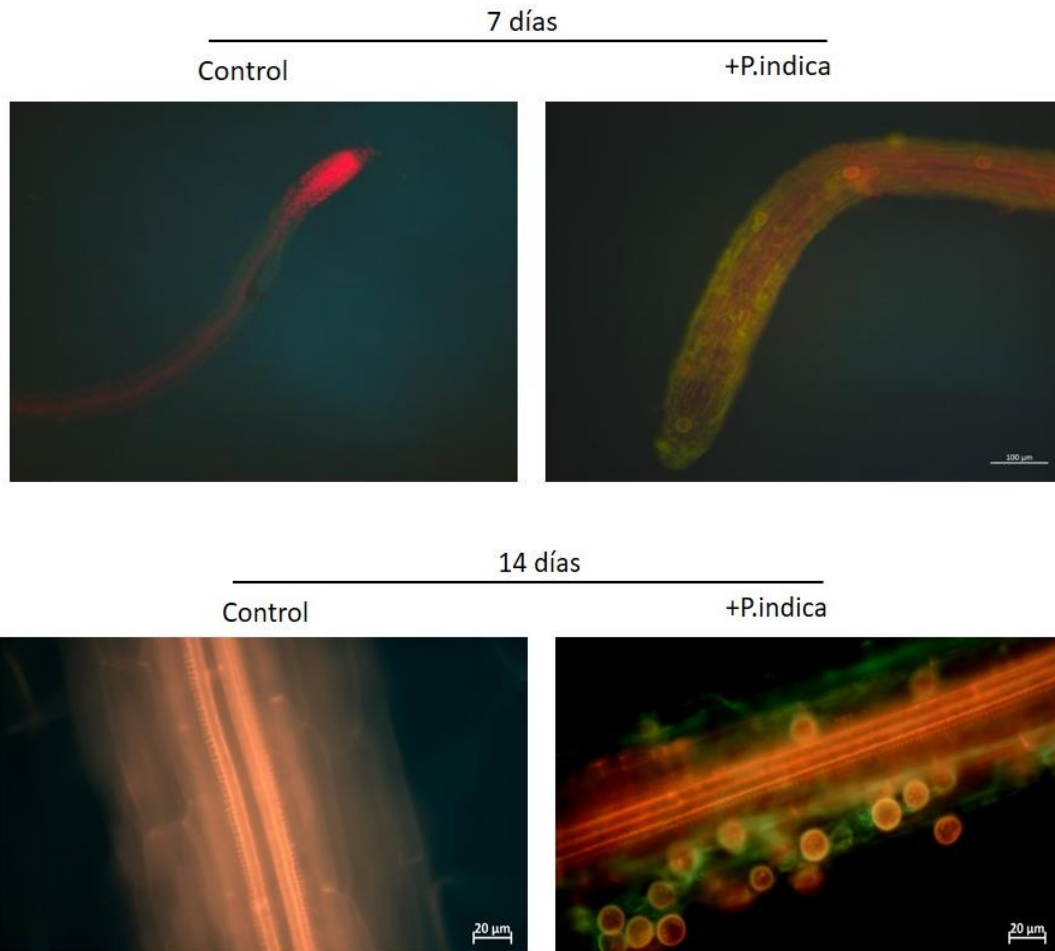


Figura 19. Tinción de raíces de *A. thaliana* \pm *P. indica*. Raíces teñidas con WGA-AF488 (fluorescencia verde y/o amarilla) para visualizar estructuras fúngicas y yoduro de propidio (fluorescencia roja/anaranjada) para visualizar la pared celular de la raíz. La columna izquierda muestra los controles a 3, 7, y 14 días (sin *P. indica*) y la columna derecha muestra raíces con *P. indica* a 3, 7 y 14 días post-co-cultivo.

7.2. Análisis de muestras de ARN total

Se verificó la integridad del ARN total de las muestras obtenidas de raíces \pm *P. indica* mediante electroforesis. En un gel de agarosa se observaron las dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 25S y 18S de plantas, indicando la integridad de las muestras (**Figura 20**).

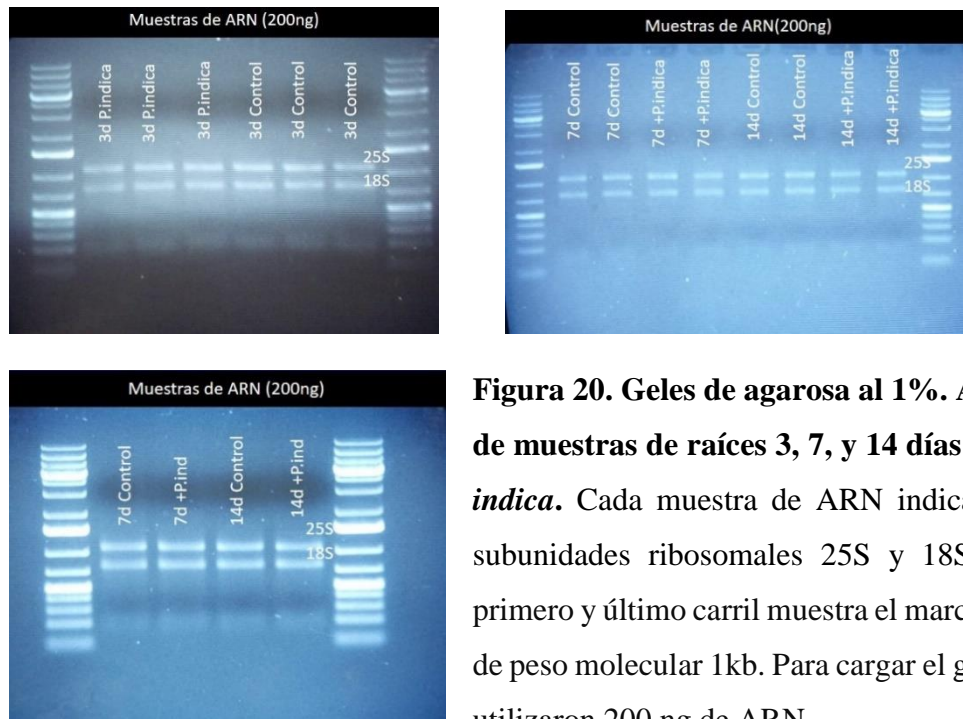


Figura 20. Geles de agarosa al 1%. ARN de muestras de raíces 3, 7, y 14 días \pm *P. indica*. Cada muestra de ARN indica las subunidades ribosomales 25S y 18S. El primero y último carril muestra el marcador de peso molecular 1kb. Para cargar el gel se utilizaron 200 ng de ARN.

Con el fin de analizar el ARN total de las tres réplicas biológicas \pm *P. indica*, se evaluó la expresión de dos genes marcadores de la vía del ácido salicílico y la vía del ácido jasmónico relacionados en la defensa de las plantas, *PR1* y *PDF1.2*. También se evaluó la expresión de las moléculas de los microARN miR397 y miR408 inducidos en otras especies de plantas durante la simbiosis con *P. indica*.

Los resultados de qPCR de las tres réplicas biológicas por gen o microARN analizado mostraron un perfil de expresión similar de acuerdo a lo esperado. La expresión relativa del microARN miR397 en los tres tiempos no presentó diferencias significativas en muestras + *P. indica* comparado con el control. Por otro lado, el microARN miR408 se mostró más acumulado a los 3 y 14 días con *P. indica* comparado al control y en el tiempo 7 días no había diferencia significativa (**Figura 21**).

El transcrito del gen *PR1* se acumuló significativamente a los 3 y 14 días, en cambio, el tiempo 7 días no presentó diferencia significativa. El gen *PDF1.2* se acumuló significativamente a los 14 días (**Figura 22**).

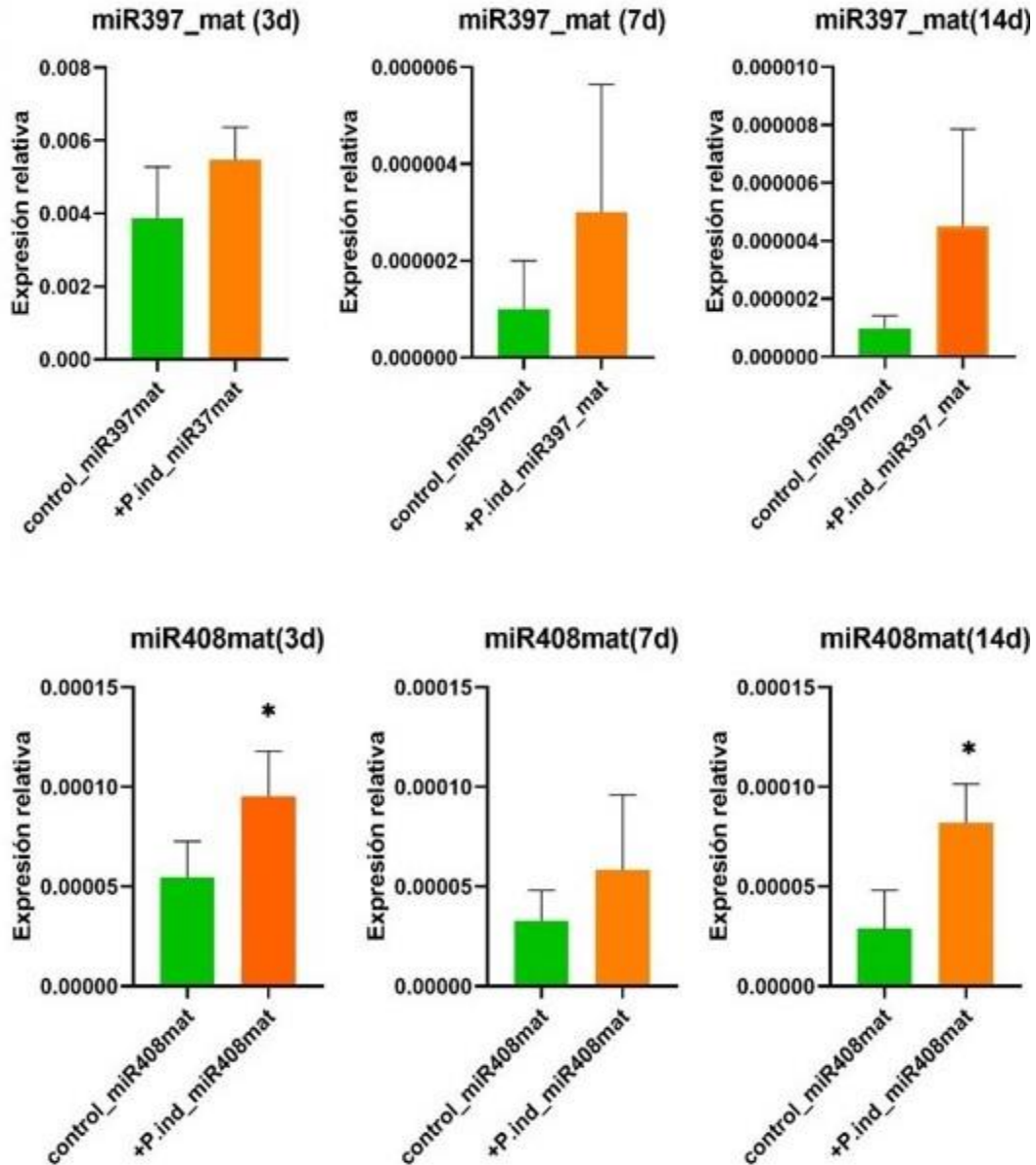


Figura 21. Nivel de expresión relativa del microARN miR397 y miR408 en *A. thaliana* \pm *P. indica* en 3, 7 y 14 días. Los histogramas verdes corresponden a los controles – *P. indica*. Los histogramas anaranjados corresponden a muestras + *P. indica*. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Los datos se normalizaron con la expresión del snRNA U6. (*) Significativo $\alpha=0.05$ de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney.

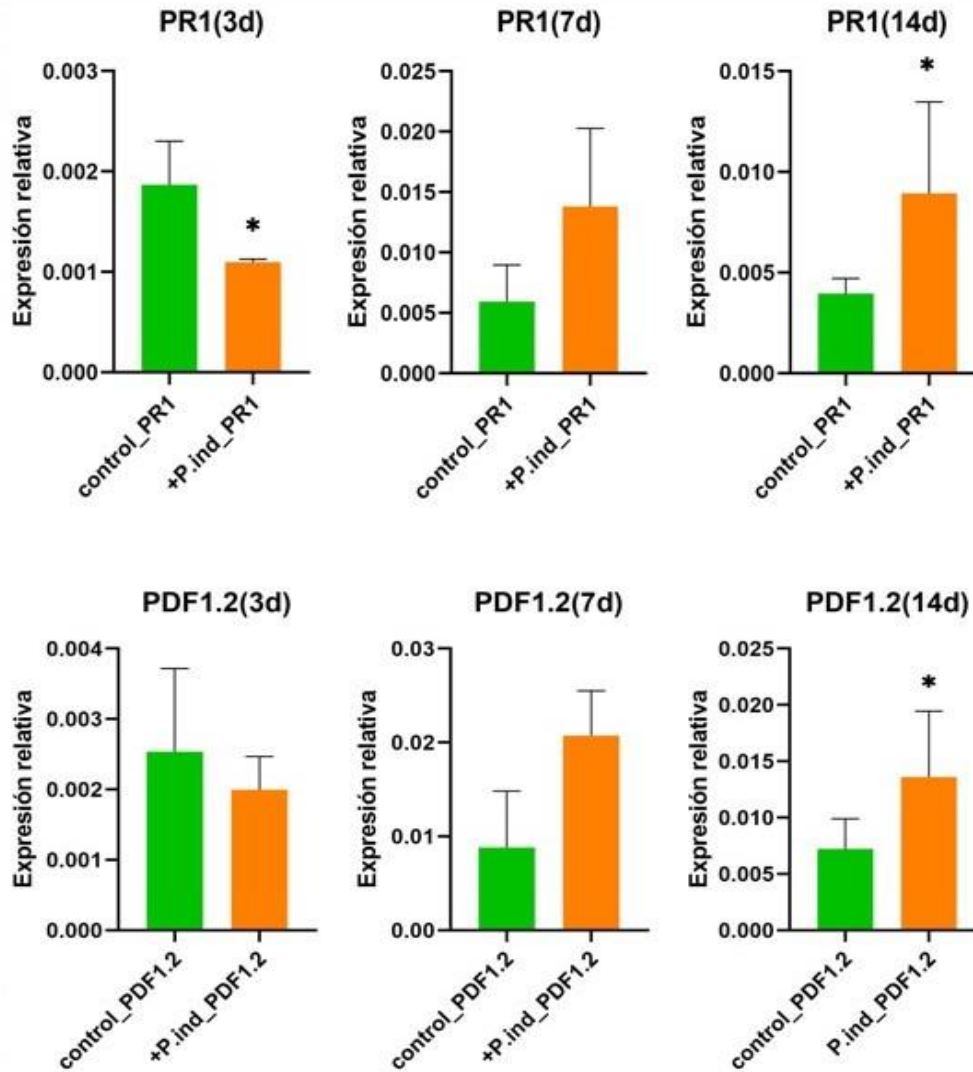


Figura 22. Nivel de expresión relativa de los genes *PR1* y *PDF1.2* en *A. thaliana* \pm *P. indica* en 3, 7 y 14 días. Los histogramas verdes corresponden a los controles – *P. indica*. Los histogramas anaranjados corresponden a muestras + *P. indica*. Las barras de error muestran la desviación estándar con respecto a la media. Los datos se normalizaron con la expresión de los genes Actina y *CF150*. (*) Significativo $\alpha=0.05$ de acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney.

Los resultados de qPCR mostraron los cambios de expresión de un gen o microARN en presencia o ausencia del hongo (**Figura 21 y 22**). Una vez terminado el análisis molecular en las muestras de ARN, estas se enviaron a secuenciar.

7.3. Análisis Bioinformático

7.3.1. Secuenciación de muestras de ARN

El transcriptoma y microtranscriptoma se mandaron a secuenciar en BGI Genomics (Beijing Genomics Institute, Hong Kong) donde confirmaron el control de calidad (**Figura 23; Anexo 11.10**). Los resultados recibidos incluían un filtrado de datos, es decir, se eliminaron las secuencias de los adaptadores, la contaminación y las lecturas de baja calidad.

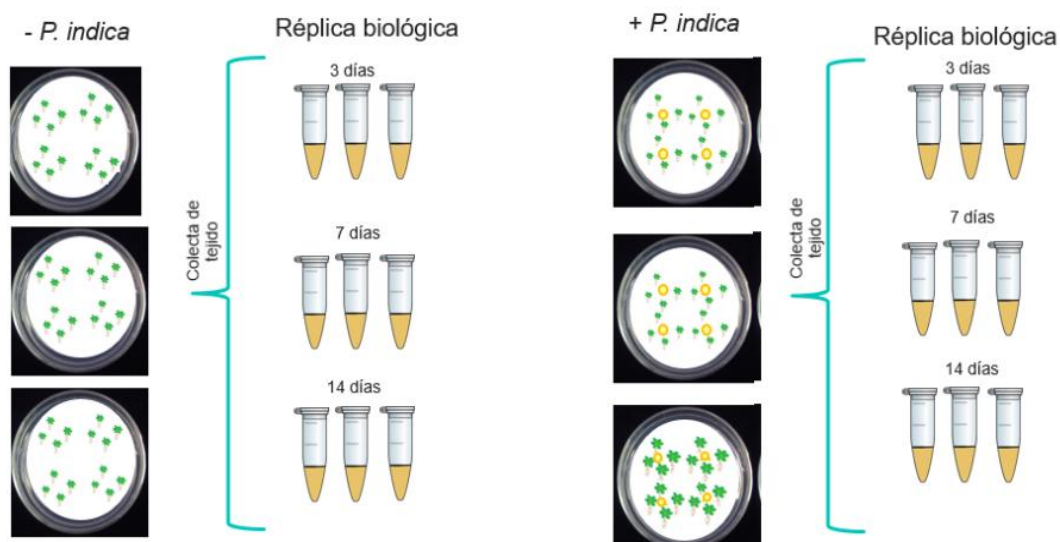


Figura 23. Esquema general de las muestras que se enviaron a secuenciar para el transcriptoma (RNAseq) y microtranscriptoma (small-RNAseq). El tejido de raíz se obtuvo de 18 colectas que incluye los tiempos a 3, 7 y 14 días \pm *P. indica*.

Para la secuenciación del degradoma se enviaron dos pool, uno de muestras +*P. indica* y el otro de muestras control (**Figura 24**). Los resultados de secuenciación masiva del degradoma fueron proporcionados por LC Sciences (Houston, Texas, USA).

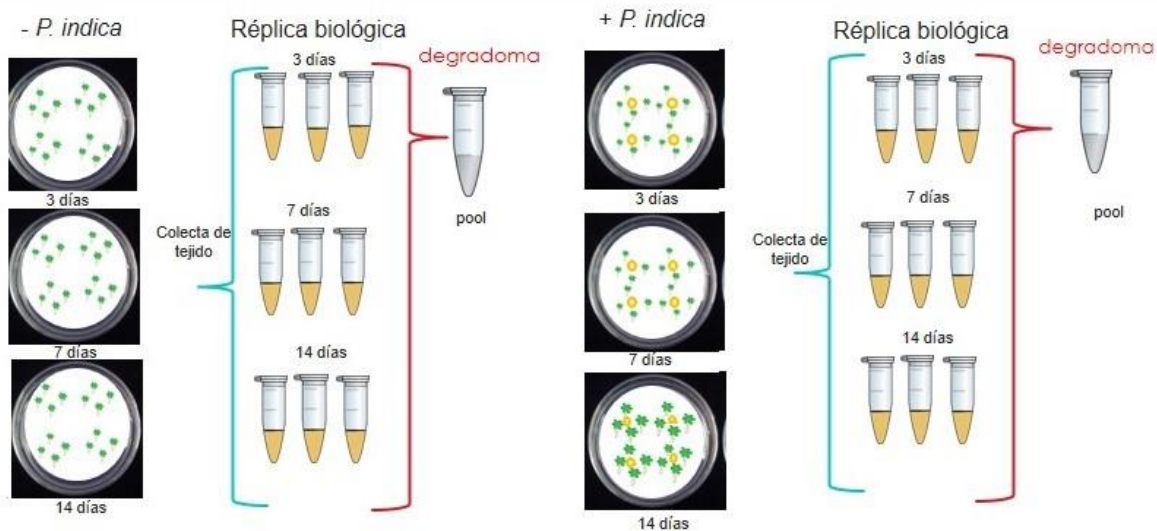


Figura 24. Esquema general de muestras que se enviaron a secuenciar para el **degradoma**. Se enviaron 2 muestras, la primera corresponde a un pool de muestras control y la segunda a un pool de muestras +*P. indica*.

7.3.2. Transcriptoma

Los datos crudos del transcriptoma se ejecutaron en Bowtie2 y RSEM para cuantificar la abundancia de los genes, después en IDEAMEX se obtuvieron los genes diferencialmente expresados (DEG) de los tres tiempos. Las bibliotecas +*P. indica* vs Control en el tiempo 3 días generó en total 1,221 DEG, de los cuales 803 están up y 418 down. El tiempo 7 días generó 2,115 DEG con, 1082 up y 1033 down. Y en el tiempo 14 días se expresaron diferencialmente 1,498 genes con 1,017 up y 481 down (**Figura 25**).

Posteriormente, de acuerdo a la literatura, se buscó en los resultados del transcriptoma algunos genes marcadores de la vía del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), de la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a microbios (MTI) y de un regulador negativo de la muerte celular, debido a que dichos oligonucleótidos se utilizaron en la interacción con *A. thaliana* y *P. indica* (Jacobs et al., 2011). En el tiempo 3 días *VSP2* está menos acumulado, mientras que *CBP60g* está más acumulado. *WRKY33* se mantiene acumulado en los tres tiempos indicando una respuesta continua. Por último, *BOI* está expresado en los tiempos 7 y 14 días, relacionándose esta respuesta transcripcional con la etapa asociada a muerte celular (**Tabla 3**). Los cambios transcripcionales de los genes

marcadores durante la interacción entre *A. thaliana* con *P. indica* son similares a lo descrito en Jacobs et al., 2011.

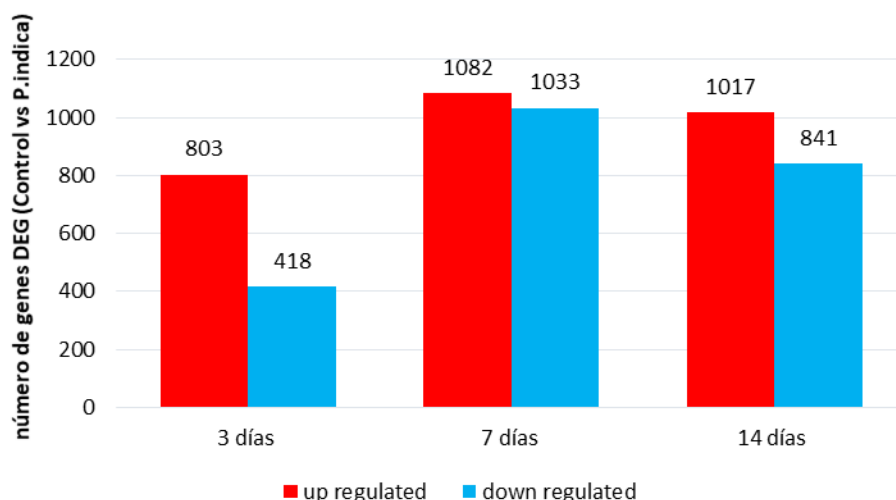


Figura 25. Genes diferencialmente expresados en los tiempos 3, 7 y 14 días post-co-cultivo. Los histogramas rojos representan los DEG más acumulados (up) y los histogramas azules a los DEG menos acumulados (down) comparado al control correspondiente. Sobre cada histograma se encuentra el número de genes respectivamente.

Tabla 3. Lista de genes marcadores. La primera columna corresponde a la vía en la que se involucra cada marcador. En la segunda y tercera columna se muestra el nombre del gen y su ID. Las seis últimas columnas corresponden a los resultados del transcriptoma indicando la expresión en Log2FoldChange y su respectivo p-value ≤ 0.05 . En rojo se indican los genes más acumulados (up) y en azul los menos acumulados (down).

Marcador	Gen	ID	3 días		7 días		14 días	
			Log2FC	padj	Log2FC	padj	Log2FC	padj
Jasmonate (JA)	Vegetative Storage Protein 2 (VSP2)	At5g24770	-1.55	0.002	-2.23	0.0009	-1.12	0.29
Salicylic acid (SA)	CAM-Binding Protein 60-like-g (CBP60g)	At5g26920	2.73	9.70E-29	2.91	0.12	2.55	1.68E-21
MAMP-triggered immunity (MTI)	WRKY33	At2g38470	1.14	9.85E-08	1.54	3.85E-19	1.31	6.54E-12
Negative cell death regulator	Botrytis Suceptible1_Interaction(BOI)	At4g19700	0.03	0.89	0.68	0.001	1.27	0.008

7.3.2. Microtranscriptoma

El reporte de los ARN pequeños muestra la distribución de estas moléculas de acuerdo a su longitud. Los ARN pequeños más abundantes tienen 24 nucleótidos, seguido de 23 y 21 nucleótidos (**Figura 26**) (**Anexo 11.11**).

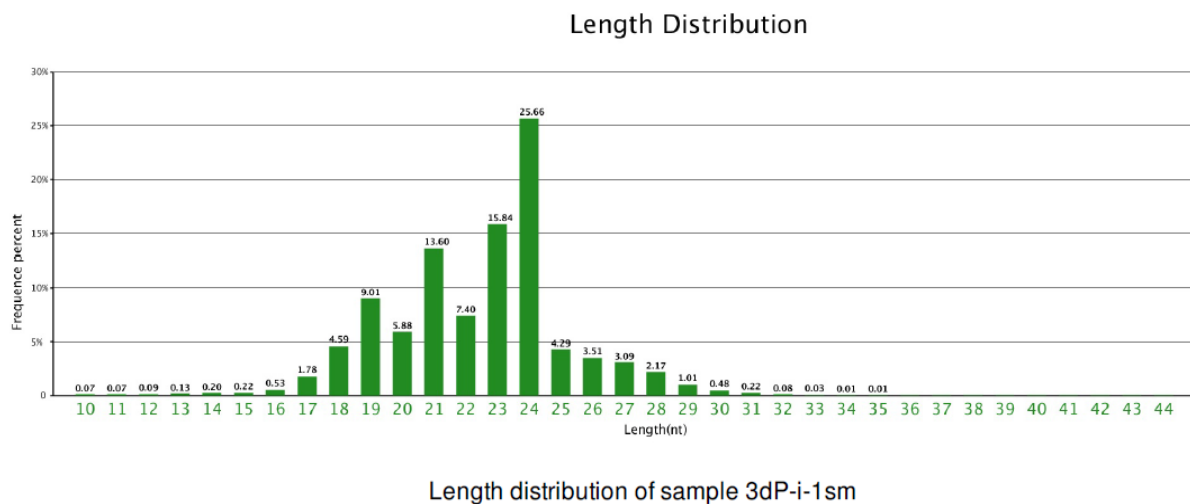


Figura 26. Distribución de los ARN pequeños de acuerdo a su longitud. Ejemplo: muestra correspondiente al ARN total de tejido de raíz del tiempo 3 días *A.thaliana* +*P. indica* réplica 1. El eje X muestra la longitud en nucleótidos. El eje Y corresponde al porcentaje de frecuencia.

Los resultados crudos del microtranscriptoma se ejecutaron en Shortstack, lo cual resultó en la cuantificación de los loci con mejor probabilidad de producir ARN pequeños en *A. thaliana* contemplando las alineaciones de las lecturas sobre el genoma, así como otros análisis incluyendo la estructura del precursor, longitud del ARN pequeño, códigos para considerarse un gen *MIR*.

Posteriormente, los resultados “expect count” obtenidos de Shortstack se ejecutaron en IDEAMEX obteniendo los ARN pequeños diferencialmente expresados (DE), por lo que se procedió a realizar un filtrado de las secuencias, lo cual consistió en eliminar la redundancia y seleccionar aquellas con una longitud de 18-25 nucleótidos con un $p \text{ value} \leq 0.05$ en todos o alguno de los tres tiempos (3, 7,14 días) (**Tabla 4**). En total se encontraron 136 secuencias únicas de ARN pequeños con estos parámetros. Con las bases de datos miRBase y sRNAanno se identificaron 23 ARN pequeños en la categoría de microARN y

otros tres correspondían a isoformas de microARN. Los demás ARN pequeños pertenecían a phasiRNA, ARN derivados de tRNA (tRFs) y secuencias sin identificar (**Anexo 11.16**) los microARN putativos se consideraron como tal por el parámetro de Shortstack N11 que indica posible microARN maduro con >5 bases desapareadas en el precursor predicho y los phasiRNA putativos se consideraron por el parámetro Phase score >30 de Shortstack (**Tabla 5**).

Tabla 4. Filtro de secuencias de ARN pequeños. Resultados del microtranscriptoma. La columna izquierda corresponde al filtrado de secuencias y la columna derecha indica el número de secuencias.

Microtranscriptoma	Secuencias
Resultados crudos	84,168
Sin redundancia de secuencias	81,643
Selección de longitud 18-25 nt	74,473
◦ DE (≤ 0.05)	136
Sobrante (> 0.05)	74,337

◦ARN pequeños diferencialmente expresados (p-value ≤ 0.05)

Tabla 5. Identificación de ARN pequeños. La columna izquierda muestra la clasificación de los ARN pequeños con las bases de datos miRBase, SRNAanno.

Clasificación	◦ ARN pequeños DE
miARN	23
Nueva isoforma	3
PhasiRNA	1
tRFs	9
microARN_putativo	1
PhasiRNA_putativo	1
Sin identificar	98
TOTAL	136

Los ARN pequeños más acumulados comparados al control (up) se encuentran en mayor proporción que los menos acumulados (down). Varios de estos ARN pequeños están presentes en los tres tiempos: ocho en up y tres en down. Solo un ARN pequeño se encontró en down a los 3 días y en después en up a los 14 días, el cual corresponde a un ARN pequeño sin identificar (**Figura 27**).

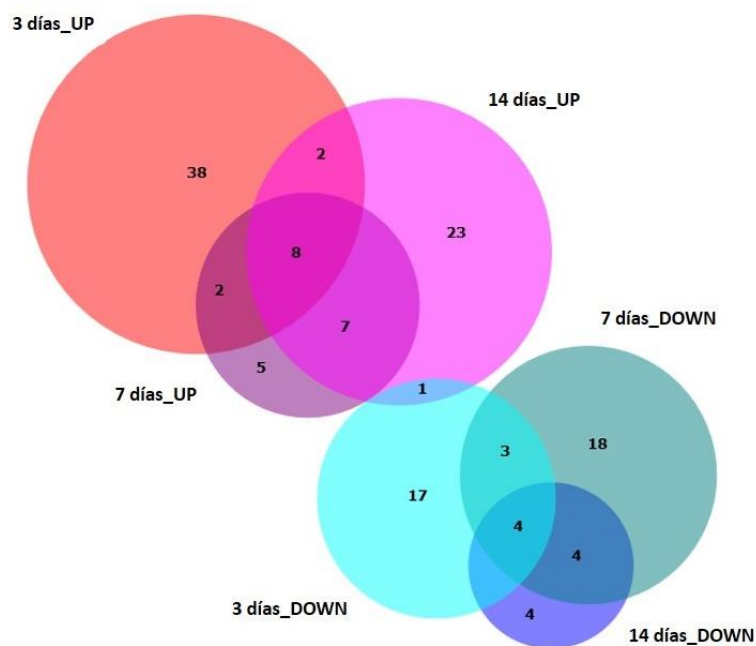


Figura 27. Diagrama de Venn con la distribución de los 136 ARN pequeños en los tres tiempos (3, 7 y 14 días). Los ARN pequeños en up están en color rojo (3d), púrpura (7d) y rosa (14d). Los ARN pequeños en down están en color azul claro (3d), verde (7d) y azul navy (14d).

Para seleccionar los mejores candidatos microARN-blancos se englobaron los resultados del transcriptoma y microtranscriptoma. Para ello, las secuencias de los 136 ARN pequeños se ejecutaron en PsRNAtarget. Como resultado se obtuvo una lista de los genes blancos con mayor probabilidad y complementariedad de bases a los ARN pequeños. Los genes predichos se correlacionaron con los respectivos ID del transcriptoma obteniendo una lista con las parejas de ARN pequeños y sus blancos. Después se revisaron los datos del transcriptoma y microtranscriptoma para encontrar la relación inversa entre el ARN pequeño y su gen blanco (**Tabla 8**).

Debido a que se consideraron varios criterios para obtener las mejores propuestas, primero se tomaron en cuenta los ARN pequeños anotados como microARN, los cuales se encontraban diferencialmente expresados en todos los tiempos como el miR398b-3p o en alguno de los tres tiempos como el miR399a (**Tabla 8**). Cada microARN presentaba varios genes blancos predichos de acuerdo a PsRNAtarget. Para seleccionar los mejores candidatos se tomaron en cuenta varios parámetros: los transcritos blancos son significativa y diferencialmente expresados y que presenten una relación inversa a su microARN, además que tengan una probabilidad alta de ser degradados por este mismo microARN en los datos del degradoma (categoría inferior a 3 y un valor estadístico inferior a 0.05), es decir, que la escisión del blanco haya sido confirmada. Por ejemplo, la pareja miR824-5p/AT3G14560 con una expresión inversa en el tiempo 14 días y con una categoría 0 en el degradoma (**Tabla 8**).

Sin embargo, no se descartaron los demás candidatos de no cumplir con todos los criterios estrictamente debido a que las regulaciones por ARN pequeños pueden ocurrir sin que haya una variación de la acumulación tanto del ARN pequeño o de sus blancos, y sin el corte de este último. Por otro lado, la lista de los blancos de microARN DE (**Tabla 8**) es significativamente enriquecida con varios genes que codifican a proteínas presentando dominios de repeticiones de pentatricopeptidos, factor de transcripción, SBP-box y factor de transcripción TCP (**Tabla7**).

Tabla 7. Enriquecimiento de genes que codifican para proteínas presentando dominios específicos. La primera columna corresponde al dominio de las proteínas seguido del p-value.

Proteína de Dominio	P-valor	Matches
Pentatricopeptide repeat [IPR002885]	0.01	7
Transcription factor, SBP-box [IPR004333]	0.02	3
Transcription factor TCP subgroup [IPR017887]	0.03	3
Transcription factor, TCP [IPR005333]	0.031	3

Las parejas como miR399a/*PHO2* (AT2G33770), miR161.2/*PPR* (AT5G55840), isomiR860/*PLATI*, miR168a-5p/*AGO1* (AT1G48410), miR398b-3p/*CSD1* (AT1G08830), miR408-3p/*ARPN* (AT2G02850) y miR157a-5p/*SPL2* (AT5G43270) (**Tabla 8**) son interesantes, ya que su función se involucra en la homeostasis de fósforo, defensa y estrés de las plantas (discutido en la sección “Discusión”). También se obtuvo una lista de ARN pequeños/blancos putativos que no tienen anotación como microARN (**Tabla 9**). Por otra parte, el análisis del degradoma con el programa CleaveLand proporcionó una lista adicional de parejas microARN/blancos candidatas para la regulación de la interacción entre *A.thaliana* con *P. indica* (**Tabla 10**). La comparación de las familias de microARN diferencialmente expresadas entre cuatro plantas en asociación con *P. indica*, incluyendo nuestros resultados en *A. thaliana*, mostraron que 11 familias de microARN se comparten entre *A. thaliana* y los 3 otros modelos, en respuesta a *P. indica* (**Figura 28, Anexo 11.18**). Por otra parte, 8 familias de microARN diferencialmente expresadas en plantas durante la micorrización arbuscular se compartieron con las encontradas en *A. thaliana* + *P. indica* (**Figura 29**).

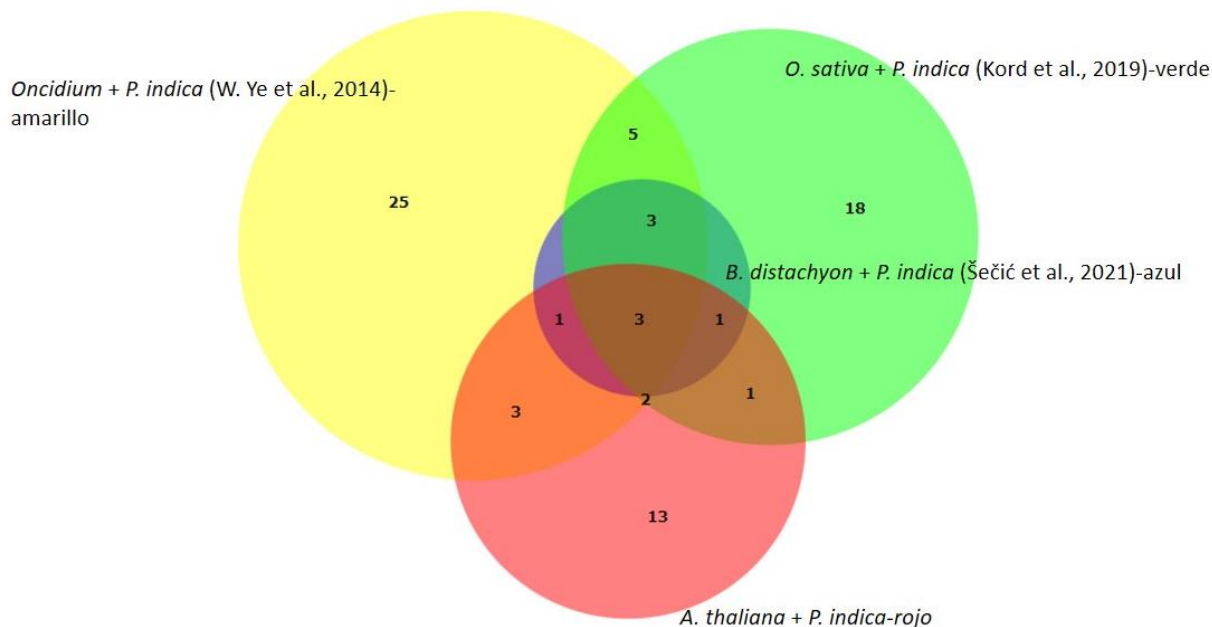


Figura 28. Diagrama de Venn con la comparación de familias de microARN diferencialmente expresadas entre las plantas de *Oncidium* (orquídea), *O. sativa* (arroz),

***B. distachyon* (pasto) y *A. thaliana* durante la interacción con *P. indica*.** Las familias de microARN en rojo corresponde a *A. thaliana* + *P. indica*, en azul las familias de microARN de pasto + *P. indica*, en amarillo las familias de microARN de orquídea + *P. indica* y en verde las familias de microARN de arroz + *P. indica*. Las intersecciones muestran las familias compartidas de microARN.

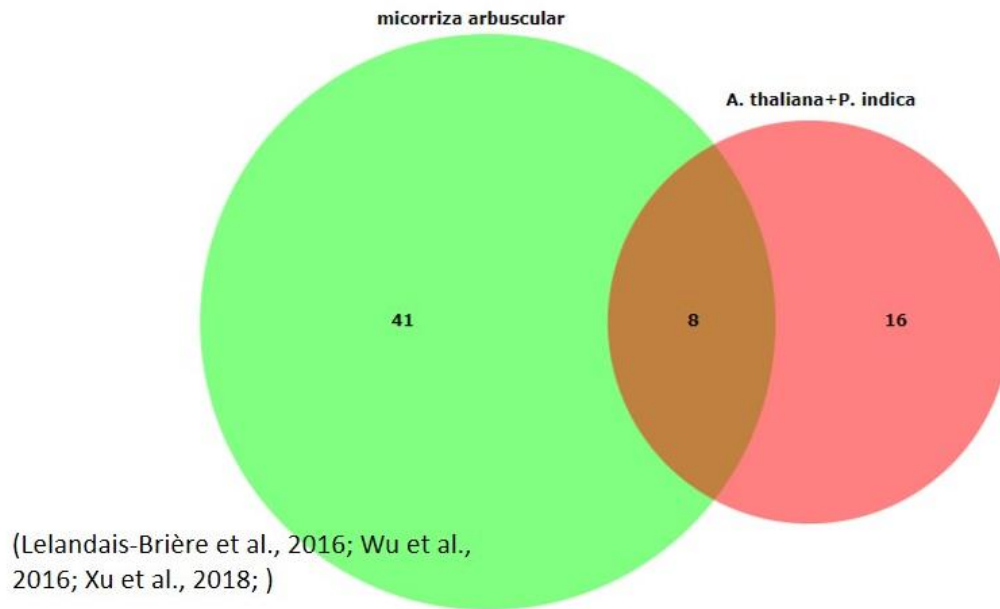


Figura 29. Diagrama de Venn con la comparación de familias de microARN diferencialmente expresadas en plantas durante la micorrización arbuscular comparado a las familias de microARN DE encontradas en *A. thaliana* con *P. indica*. Las familias de microARN en rojo corresponde a *A. thaliana* + *P. indica* y en verde a las familias de microARN expresadas durante la micorrización arbuscular. Las intersecciones muestran las familias compartidas de microARN.

Tabla 9. Lista de candidatos de ARN pequeños/ blancos durante la interacción con *P. indica*. Resultados integrados del microtranscriptoma (encabezado amarillo), ShortStack (encabezado gris), PsRNAtarget (encabezado anaranjado) y transcriptoma (encabezado azul). Los números en rojo indican los Log2FC significativos ($p \leq 0.05$) en up y azules en down.

ARN pequeño	Clasificación	Microtranscriptoma				Shortstack				PsRNAtarget				Transcriptoma					
		3días	7días	14días	padj	MIRNA	Phase score	Blancos predichos	Transcrito blanco	Expectativa	3días	7días	14días	padj	Log2FC	padj	Log2FC	padj	
PT-166237	IRFS	1.85	0.82	1.26	1.00	1.44	0.02	N2	-1	9	AT1622880	3	0.96	0.37	-1.34	0.08	-0.6	2.754E-08	
PT-395295	IRFS	0.24	1.00	0.77	1.00	0.88	0.02	N2	-1	9	AT1673360	3	-0.68	0.39	-1.2	0.02	-1.47	0.03	
CATGCTAATCTCTCTGTATCGT	phasIRNA	-0.19	1.00	0.30	1.00	0.86	0.02	N5	38.5	22	AT2624420	3	-0.03	0.97	0.34	0.59	-1.22	2.871E-05	
CCTCCCGGAAGTCTCGTG	miRNA?	-1.82	0.06	-3.26	0.04	-1.48	1.00	N11	-1	11	AT1618160	3	0.13	0.79	0.4	0.02	0.29	0.49	
TGAAGAAGTTGGAGATCT	sin identificar	-2.45	0.007412972	-4.88	0.15	-1.47	1.00	N2	-1	45	AT4609480	3	1.68	0.04	1.82	0.05	0.78	0.62	
											AT3658660	3	1.10	0.004	0.72	0.05	0.29	0.65	
											AT4609470	3	2.62	0.0002	2.87	0.00001	2.25	0.00006	
GTAGAAGAAAGAAATGATG	sin identificar	0.98	0.006	0.65	1.00	0.84	0.38	N2	-1		AT1613260	2.5	-0.87	0.01	-0.26	0.67	0.75	0.3	
AGATCATCTCCATGGAAGTAT	sin identificar	-1.05	0.02	-1.01	0.09	-0.68	0.94	N5	14.5	34	AT4622710	2.5	1.84	0.00000004	1.86	0.0000000000	2.63	0.0000000001	
											AT4622690	2.5	1.19	0.001	0.89	1	0.0003	1.66	0.002
AGGCAATGATGAACAGAAATG	sin identificar	1.07	0.03	1.29	0.003	0.94	0.30	N2	-1	19	AT1653560	3	-0.8	0.003	-0.65	0.16	-0.21	0.82	
TGACAGTTTTGGCTGTGTT	sin identificar	-1.25	0.006158703	-1.36	0.02	-1.33	0.945	N5	12.5	36	AT3607870	3	0.06	0.94	1.07	6.38407E-07	0.8	0.04	
CCTCCTGGATGCTGAGACC	sin identificar	-1.26	0.001	-1.72	0.002	-1.61	0.003	N2	-1	25	AT5642950	2	-0.07	0.86	0.49	0.007	0.08	0.9	
											AT3622060	2.5	1.65	4.886E-12	1.64	1.353E-08	1.47	1.10962E-13	
TTTAGACCGTAGGCCAACTT	sin identificar	-0.08	0.99950769	-0.64	0.04	-0.13	0.98	N5	-1	11	AT5604720	1.5	0.13	0.71	0.66	8.34081E-06	0.53	0.02	
AAAGGTCARAATTTGGGGTGA	sin identificar	-0.33	0.97	-0.83	0.01	-0.45	1.00	N5	4	29	AT1651810	2			6.27	0.001			
AAGGGCCCAAAAGTCCGGGG	sin identificar	-0.75	0.27	-1.75	2.87031E-06	-1.22	0.001	N5	5.1	6	AT3611080	3	1.22	3.277E-06	2.05	2.5653E-09	1.56	5.615E-13	
CCTTGGGGAGAGTAGTAG	sin identificar	-1.75	0.07	-3.98	0.0002	-1.87	0.02	N2	-1	12	AT4631170	3	0.23	0.72	1.11	0.0001	0.04	0.96	
TTTACTAATGATCTGTTGTTT	sin identificar	1.03	0.45331716	1.42	0.04	1.59	0.002	N2	-1	23	AT3609960	3	0.09	0.88	-0.44	0.01	-0.56	0.02	
ACCACCAAGATCTGAGGCCT	sin identificar	-0.66	0.88	-0.79	1.00	-1.83	0.001	N2	-1	22	AT5638940	2.5	2.39	1.45E-09	3.92	1.93E-23	2.89	0.001	
											AT5638930	3	8.21	5.24E-09	6.72	0.00002	7.95	2.93E-06	
TTTCGGGGTTTATCATTGTT	sin identificar	0.14	0.99950769	0.48	0.55	0.78	0.03	N5	-1	30	AT1626190	3	0.24	0.74	-0.18	0.66	-1.11	0.0001	
CCGACGGGATTACGGTGGC	sin identificar	-0.27	1.00	-0.22	1.00	0.79	0.03	N2	-1	5	AT2623410	3	0.17	0.9	0.07	0.93	-0.86	0.01	
GGTGAAGTGTCCGATCCGGG	sin identificar	-0.94	0.009	-0.19	1.00	0.97	0.02	N5	-1	15	AT4621380	1.5	2.77	0.00002	3.04	0.0000000001	2.63	0.0000000001	
											AT3623190	3	1.46	5.39549E-38	1.51	6.639E-18	1.06	1.474E-06	
TGAACTAGTAGCTCTACATT	sin identificar	3.34	6.26E-08	2.22	0.27	2.77	0.001	N2	-1	16	AT5649460	2.5	0.59	0.02	-0.02	0.97	-0.82	0.02	

Tabla 10. Lista de candidatos de microARN/ blancos identificados en CleaveLand con los resultados del Degradoma. La fila amarilla muestra la condición raíces + *P. indica*, en azul la condición control (sin *P. indica*) y en verde ambas condiciones (*P. indica* vs Control). La primera fila muestra los datos obtenidos de Cleaveland, como la categoría (0-2) con el p- value correspondiente (≤ 0.05) y los datos obtenidos del transcriptoma. Los números en rojo indican los Log2FC significativos ($p \leq 0.05$) en up y azules en down.

microARN	Degradoma						Transcriptoma					
	Blanco	categoría (P.ind)	P value (P.ind)	categoría(Ctrl)	P value (Ctrl)	Regulación P. ind vs Ctrl	3días		7días		14días	
							Log2FC	padj	Log2FC	padj	Log2FC	padj
miR5014a-5p	AT1G56500	0	0.01	NA	NA	up	-0.65	0.02	-0.45	0.09	-0.48	0.46
miR164a	AT5G39610	1	0.01	NA	NA	up	-0.62	0.04	-0.21	0.59	0.73	0.36
miR395a	AT5G43780	2	0.03	NA	NA	up	-0.60	0.00	0.19	0.48	0.01	0.99
miR4228-5p	AT1G16460	1	0.01	NA	NA	up	-0.53	0.05	0.03	0.96	0.22	0.61
miR396b-5p	AT1G53910	0	0.05	1	0.06	down	0.26	0.90	1.32	1.0031E-05	-0.57	0.77
miR396b-3p	AT1G01190	1	0.00	NA	NA	up	-0.08	0.95	-1.61	0.02	0.11	0.95
miR172d-3p	AT4G36920	2	0.05	2	0.07	up	-0.26	0.88	-0.76	0.05	-0.36	0.69
miR863-5p	AT1G04710	1	0.00	4	0.35	up	-0.11	0.84	-0.56	0.03	-0.49	0.27
miR172c	AT4G36920	2	0.03	NA	NA	up	-0.07	0.89	-0.09	0.81	-0.58	0.00
miR169n	AT3G05690	0	0.01	2	0.50	up	-0.01	0.98	-0.06	0.93	-0.55	0.03
miR846-3p	AT1G52130	NA	NA	0	0.00	down	4.70	0.00	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
miR399d	AT1G20510	4	0.61	0	0.01	down	1.91	0.00	1.40	0.16	0.92	0.77
miR171b-3p	AT2G45160	NA	NA	0	0.00	down	0.47	0.01	0.28	0.18	-0.08	0.87
miR319c	AT3G15030	4	0.08	0	0.00	down	#N/A	#N/A	7.096	0.003	#N/A	#N/A
miR447b	AT5G60760	NA	NA	2	0.04	down	0.55	0.39	1.64	0.00	1.65	0.11
miR447c-3p	AT5G42870	NA	NA	2	0.04	down	0.03	0.97	0.37	0.04	0.24	0.48
miR5629	AT4G35090	4	0.04	2	0.04	down	-0.14	0.65	0.26	0.00	0.09	0.78
miR414	AT5G24890	NA	NA	2	0.04	down	-0.16	0.77	0.17	0.70	0.49	0.03
miR842	AT5G38550	2	0.15	0	0.00	down	1.23	1.6319E-09	1.44	2.7913E-12	1.21	5.8404E-05
miR396b-5p	AT2G36400	1	0.00	0	0.00	down	0.42	0.03	0.12	0.85	-0.05	0.94
miR171c-3p	AT3G60630	0	0.00	0	0.00	down	0.40	0.03	0.16	0.44	-0.43	0.14
miR5650	AT1G66880	2	0.03	0	0.00	down	-0.29	0.88	0.85	0.00	0.38	0.54
miR164b-5p	AT5G07680	0	0.00	0	0.00	up	-0.98	0.00	-1.27	0.05	-0.27	0.84
miR156g	AT5G50670	0	0.00	0	0.00	down	0.97	0.08	1.27	0.00	0.83	0.01
miR823	AT1G69770	2	0.03	2	0.04	up	0.53	0.04	0.00	1.00	-0.60	0.00
miR164a	AT1G56010	0	0.00	0	0.00	up	-0.37	0.03	0.27	0.21	0.67	0.00
miR165a-3p	AT5G60690	0	0.00	0	0.00	up	0.06	0.88	-0.30	0.20	-0.47	0.03

7.4. Análisis funcional

7.4.1. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Se realizó un análisis funcional de las mutantes *mir161* y *ago5* obtenidas de Arabidopsis Biological Resource Center, con el fin de evaluar la interacción de la planta con *Piriformospora indica*. Para ello se cultivaron semillas de las líneas mutantes para coleccionar tejido de hojas y obtener mayor número de semillas (**Figura 30**).



Figura 30. Propagación de semillas. Se cultivaron semillas de las líneas mutantes (*mir161*, *ago5*) y Col-0 en macetas con sustrato y vermiculita para la obtención de tejido de hojas (roseta) y semillas.

7.4.2. Genotipificación

Inicialmente, se pidieron tres líneas diferentes por cada mutante, sin embargo, algunas eran heterocigotas. Con el tejido de hojas se genotipificaron las líneas mutantes para hacer un escrutinio de las plantas homocigotas (**Figura 31**). Finalmente, se evaluaron tres líneas diferentes de la mutante *mir161*, y solamente una línea de *ago5* debido a problemas de germinación de las otras dos líneas mutantes.

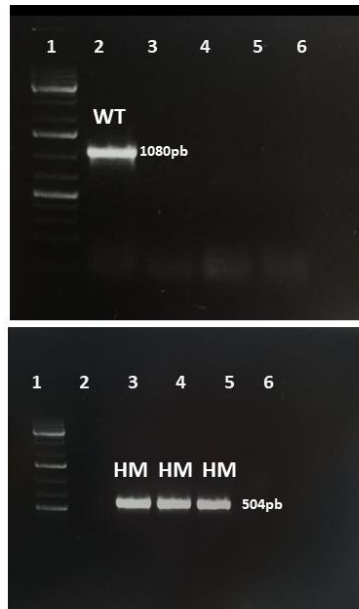


Figura 31. Geles de Agarosa 1.2% de la genotipificación de una línea mutante. En el gel superior se observa la banda que corresponde a la amplificación del ADN del gen sin inserción (WT-1080pb). En el gel inferior se observa la amplificación del ADN con inserción de T-DNA de la mutante homocigota (HM-504pb) *mir161* de tres plantas independientes de la misma mutante. El primer pozo de ambos geles corresponde a la escala molecular (1Kb de thermo scientific).

7.4.3. Fenotipificación

Se realizaron cultivos in vitro de las líneas mutantes $\pm P. indica$, como control se utilizó Col-0 $\pm P. indica$. Se obtuvieron plántulas con 10 días de crecimiento en medio MS, las cuales se trasplantaron a medio PNM con un papel filtro Whatman 541. Las raíces se colectaron a los 14 días para su fenotipificación. Se midió la longitud de raíz (cm) con el programa Fiji IMAGE y posteriormente se tiñeron las raíces para un conteo de esporas intracelulares y extracelulares. Se utilizaron dos metodologías para el conteo de esporas, para la fenotipificación de *mir161* se obtuvo el porcentaje de colonización mediante el conteo de estructuras (esporas) en intersecciones de la raíz. Dos líneas mutantes del *mir161* (2 y 3) presentaron menor porcentaje de esporas extracelulares significativamente con respecto al control, además no se observaron esporas intracelulares. La línea 1 *mir161* presentó un fenotipo intermedio entre *mir161* y Col-0 (**Figura 32**). Para la fenotipificación de *ago5* se realizó un conteo total de esporas de manera manual. La mutante *ago5* presentó mayor número de esporas intracelulares y extracelulares significativamente comparado a Col-0 (**Figura 33**).

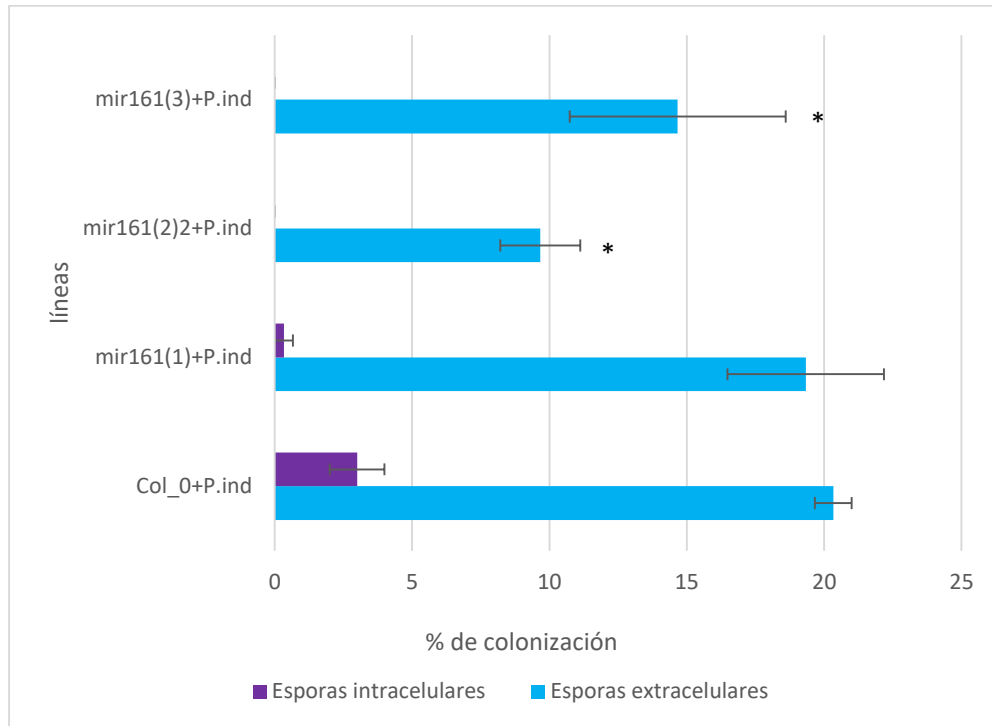


Figura 32. Fenotipificación de la mutante *mir161*. Los histogramas azules corresponden al porcentaje de esporas extracelulares y los histogramas morados al porcentaje de esporas intracelulares. El eje X muestra el porcentaje de colonización y el eje Y el nombre de la línea. Prueba Tukey $p=0.05$ (*).

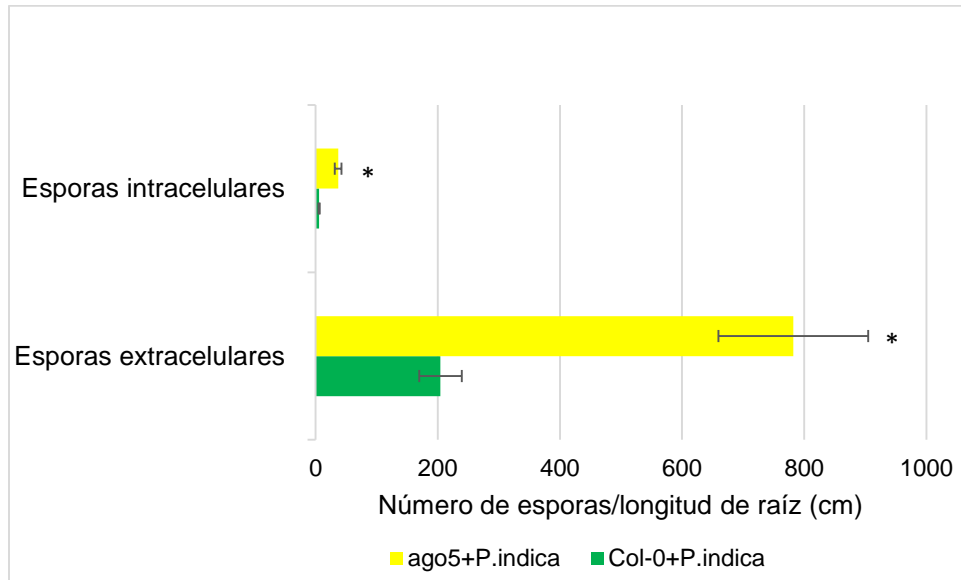


Figura 33. Fenotipificación de la mutante *ago5*. Los histogramas verdes corresponden a la línea Col-0 y los histogramas amarillos a la línea *ago5*. El eje X muestra el número de esporas/ longitud de raíz y el eje Y muestra los grupos analizados. Prueba Tukey $p=0.05$ (*).

8. DISCUSIÓN

Las relaciones simbióticas mutualistas planta-microorganismo son importantes, puesto que las plantas se benefician de un mejor rendimiento, defensa y resistencia a estreses bióticos o abióticos durante la interacción (Varma et al., 2013). El proceso simbiótico comprende numerosas regulaciones como la vía de los microARN los cuales se encargan de regular negativamente a sus ARN mensajeros (blancos) gracias a una maquinaria especializada (J. Wang et al., 2019). El hongo mutualista *Piriformospora indica* se ha caracterizado por promover varios beneficios a sus plantas hospederas (Johnson et al., 2011; Varma et al., 2013). Actualmente, no hay antecedente de los microARN en este modelo simbiótico, por lo que se ha propuesto conocer los microARN involucrados durante esta interacción y proponer parejas microARN/blancos.

Con el objetivo de caracterizar parejas de microARN/blancos durante la simbiosis, se utilizaron los cultivos *in vitro* para coleccionar el tejido de raíces en los tiempos 3, 7, 14 días (+*P. indica*) incluyendo los controles (-*P. indica*). Se propuso la colecta en tres diferentes tiempos, de acuerdo a lo reportado en Jacobs y colaboradores en 2011, donde se describen las etapas de colonización del hongo biotrófica, asociada a la muerte celular y esporulación en un espacio-tiempo 1-14 días post-co-cultivo. La interacción *in vitro* entre *A. thaliana* y *P. indica* bajo las condiciones experimentales realizadas en este proyecto mostró evidencia sobre la promoción del crecimiento en las plántulas en co-cultivo con *P. indica* en cajas Petri a los 14 días comparado al control (**Figura 18**), validando nuestro diseño experimental y el buen establecimiento de la simbiosis. La promoción del crecimiento se ha reportado en otros estudios sobre la interacción con *P. indica* y *A. thaliana* así como en otras plantas hospederas, por ejemplo, en la cebada, orquídea y arroz. Este beneficio se puede observar mejor en condiciones de suelo (Ghabooli, 2014; Jogawat et al., 2013; Johnson et al., 2011; W. Ye et al., 2014).

Se evaluó el material vegetal antes de coleccionar el tejido, realizando varias tinciones de raíces para observar la colonización de las hifas y esporas en co-cultivos. A los 3 días se observaron hifas en la raíz, a los 7 días, hifas y esporas extracelulares, y a los 14 días, hifas, esporas intra y extracelulares. Se observaron las estructuras fúngicas de acuerdo a lo descrito en Varma et al., 2013 (**Figura 19**). La integridad del ARN total del tejido de raíz se observó

en geles de agarosa, mostrando las dos bandas 25S y 18S en todas las muestras ($\pm P. indica$) (**Figura 20**) del cual se realizó la síntesis de ADN complementario para evaluar por qPCR genes marcadores de la vía del ácido jasmónico y ácido salicílico *PDF1.2* y *PRI*, dos microARN maduros miR397 y miR408 identificados en las simbiosis entre *P. indica* y plantas de arroz, orquídeas o en pasto (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021; W. Ye et al., 2014, 2019). Gracias a este análisis se verificaron las réplicas biológicas del ARN previo a la secuenciación. Las tres réplicas biológicas de cada tiempo (3, 7, 14 días) mostraron el mismo perfil de acuerdo al gen o microARN analizado.

Nuestros resultados de qPCR sobre el marcador *PDF1.2* muestran que a 3 y 7 días no hay diferencia significativa ($+P. indica$ vs Control), mientras que en el tiempo 14 días se acumula más el transcrito comparado al control, lo que podría indicar una respuesta ante la presencia del hongo (**Figura 22**). El gen *PRI* regulado por la vía del ácido salicílico fue diferencialmente menos acumulado a los 3 días en tejido de raíz con *P. indica* comparado al control, y a los 14 días fue diferencialmente más acumulado con *P. indica* con respecto al control (**Figura 22**). Se ha reportado que los genes *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* se regulan en respuesta a la señalización de ácido salicílico, la cual involucra la activación de la defensa contra patógenos biotróficos (Pieterse et al., 2012). *Piriformospora indica* es un hongo con un estilo de vida biotrófico y necrotrófico (Jacobs et al., 2011). Por lo que, la disminución de la expresión de *PRI* en muestras $+ P. indica$ a 3 días podría tratarse de alguna respuesta biológica que permite que la planta de *A. thaliana* sea colonizada por *P. indica*, mientras que el incremento de *PRI* a 14 días en $+P. indica$ comparado al control podría tratarse de una respuesta a estrés general. Se conoce que la inmunidad innata de la planta vía el ácido salicílico (SA) típicamente contrarresta de manera eficiente a los hongos biotróficos mientras que la vía del ácido jasmónico se activa eficientemente contra hongos necrotróficos cuando se trata de microorganismo patógeno, sin embargo, podría ser diferente la respuesta en hongos mutualistas (Pieterse et al., 2012).

Los microARN maduros miR397 y miR408 que se analizaron por qPCR mostraron que para el miR397 no hubo diferencia significativa y para el miR408 se mostró una mayor acumulación en los tiempos 3 y 14 días en muestras $+ P. indica$ comparado al control (**Figura 21**). Ambos microARN son conservados en plantas y, antecedentes en arroz, orquídea y pasto

han demostrado un cambio de expresión de estas moléculas durante la presencia de *P. indica* (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021; W. Ye et al., 2014). En nuestros resultados en *A. thaliana*, se observó solamente un cambio de expresión significativo del miR408 a 3 y 14 días, correspondiente con lo observado en los estudios en monocotiledóneas. Además, en los resultados de secuenciación de los ARN pequeños se muestra que a los 14 días el Log2FC de miR408 es de 1.49 (p adj=0.05) en muestras +*P. indica* vs Control. Por otro lado, no se mostró diferencia significativa en la expresión del miR397 en los resultados de small RNA-seq. Aquí mostramos una diferencia de respuesta de los miRNA en *A. thaliana* en interacción con *P. indica*, comparada a las otras plantas modelos. Este resultado refuerza el interés de analizar estas regulaciones en diferentes organismos para entender la diversidad de respuesta microtranscriptómica a este hongo.

Los resultados del transcriptoma (+ *P.indica* vs Control) mostraron una mayor abundancia de genes diferencialmente más expresados (up) con respecto a genes diferencialmente menos expresados (down) en los tres diferentes tiempos (**Figura 25**). Algunos genes marcadores de la defensa de la planta se buscaron en el transcriptoma *P. indica* vs Control. Se observó que *VSP2* marcador de JA se acumuló diferencialmente a 3 (Log2FC, -1.55) y 7 días (Log2FC, -2.23). Para *CBP60g* se mostró una acumulación diferencial a 3 (Log2FC, 2.73) y 14 días (Log2FC, 2.5) (**Tabla3**). Jacobs y colaboradores (2011) observaron que el ecotipo Landsberg erecta (Ler) de *Arabidopsis thaliana* mostró una expresión menor del marcador *VSP2* en raíces con *P. indica* comparado al Control. Por otra parte, en este mismo trabajo se reportó que *CBP60g* se inducía en Col-0 con *P. indica* con respecto al control. El marcador *BOI*, es un regulador negativo de la muerte celular, en nuestros resultados su acumulación diferencial se presentó a los 7 (Log2FC, 0.68) y 14 días (Log2FC, 1.27) (**Tabla3**). Se ha descrito que la alta expresión de este regulador puede suprimir la colonización de *P. indica* en *A. thaliana*, además se cree que el hongo podría estar regulando la muerte celular en raíz utilizando la maquinaria molecular de la planta (Jacobs et al., 2011). En este caso, a los 7 y 14 días, *BOI* se encuentra más acumulado con respecto al control, coincidiendo su expresión con la etapa de muerte celular y esporulación. También se realizó la búsqueda de *WRKY33* en el transcriptoma el cual corresponde a un marcador de la MTI, los resultados mostraron que el marcador está más acumulado diferencialmente en + *P. indica* comparado al control (3d Log2FC, 1.14; 7d Log2FC, 1.54; 14d Log2FC, 1.31)

(**Tabla3**). La expresión de *WRKY33* en *A. thaliana* con *P. indica* se induce en raíces durante la interacción (Peskan-Berghöfer et al., 2015), lo cual se observó en el transcriptoma en los tres tiempos.

Recientemente, en 2021, Opitz et al., reportaron algunos genes que participan en el metabolismo del azúcar durante la interacción entre *A. thaliana* y *P. indica*, de los cuales para el análisis de expresión de varios genes aislaron tejido de raíces en los tiempos 3, 7 y 14 días. En sus resultados, los genes *SUS1*, *SUS3* y *SUS4* que codifican para sacarosas sintasas mostraron diferencia significativa (Opitz et al., 2021). Se realizó la búsqueda de los mismos genes en nuestros resultados de transcriptoma, de los cuales se observó que su acumulación es muy similar, corroborando nuevamente los resultados (**Anexo 11.13**).

La combinación de los resultados de transcriptoma y su confirmación por qRT-PCR indica que el material generado presenta las respuestas transcriptómicas esperadas y adecuadas, validando el buen establecimiento de la simbiosis con *P. indica*, y confirmando la posibilidad de analizar este material al nivel microtranscriptómico, sin preocupación mayor de efectos artefactuales.

Del lado del análisis del microtranscriptoma, el tema principal de esta tesis, se obtuvo el reporte de las frecuencias de distribución de estas moléculas de acuerdo a su longitud. Los ARN pequeños más frecuentes fueron de 24 nucleótidos, seguidos de 23 y 21 nt (**Figura 26; Anexo 11.11**). Este perfil de distribución es típico de las muestras de plantas, validando la calidad de nuestro microtranscriptoma. Resultados de secuenciación en muestras de orquídea + *P. indica*, *B. distachyon* + *P. indica* y sus controles, revelaron una distribución del tamaño de los ARN pequeños con el pico más alto en 24 nt seguido de 21 nt (Šečić et al., 2021; W. Ye et al., 2014). En cambio, en los resultados de secuenciación en muestras de arroz + *P. indica* la distribución del tamaño de ARN pequeños fue de 24 nt (12.5%), 23 nt (9.8%), 21 nt (9.8%) (Kord et al., 2019). Por lo que, en nuestros resultados la frecuencia del tamaño se asemeja más a los datos de arroz + *P. indica*.

La secuenciación de los ARN pequeños arrojó miles de lecturas crudas, las cuales mediante un filtrado se obtuvieron 136 secuencias de ARN pequeños significativos y diferencialmente expresados (**Tabla 4 y 5; Anexo 11.14**). Se observa que la mayor parte de los ARN pequeños se encuentra up, de los cuales ocho se comparten en los tres tiempos (3,

7 y 14 días): por ejemplo, el miR398b y una nueva isoforma del miR159, los seis restantes no están identificados por alguna base de datos de ARN pequeños. Por otro lado, solamente cuatro ARN pequeños down se comparten en los tres tiempos, los cuales están sin identificar. Finalmente, solamente un ARN pequeño sin identificar se encuentra down a 3 dpi y después up a 14 dpi (**Figura 27; Anexo 11.16**). Del total de 136 ARN pequeños, 23 corresponde su anotación a microARN y 3 a nuevas isoformas de microARN, es decir, que presentan variaciones de secuencias y longitud de los microARN maduros ya identificados (**Tabla 5**). Se integraron los resultados de secuenciación del transcriptoma y microtranscriptoma resultando en una lista con candidatos de microARN/blancos y de otros ARN pequeños/blancos (**Tabla 8 y 9**).

El microARN miR399a diferencialmente expresado a los 3 días (Log₂FC, -0.94) tiene como blanco confirmado en degradoma a *PHO2* (Phosphate 2, AT2G33770) específico de la biblioteca +*P. indica* (**Tabla 8**). El miR399a juega un papel muy importante en la vía de señalización del fosfato (Pi) en *A. thaliana*, ya que modula a *PHO2* que codifica para una enzima ubiquitina conjugada E2 que activa la degradación del transportador de alta afinidad PHT1 (Phosphate Transporter 1) y el exportador PHO1 para evitar la sobreacumulación de fosfato en las células (Phosphate 1) (Liu et al., 2012; Rouached et al., 2010). La acumulación del miR399 aumenta en la célula cuando se presentan niveles bajos de Pi citosólico (Bari et al., 2006). En nuestros resultados se muestra una menor acumulación del miR399 a 3 días pos-co-cultivo (**Tabla 8**), lo que podría significar que las células cuentan con el Pi suficiente, por lo que PHO2 podría ser requerido para regular la sobreacumulación de fosfato. Es interesante tener como candidato a la pareja miR399/*PHO2* porque su participación en la homeostasis del fostafo incluye el papel de un ARN largo no codificante IPS1 (Induced by Phosphate Starvation) que actúa mediante un mecanismo de mimetismo atrapando el miR399 permitiendo como resultado la expresión del blanco *PHO2* (Bari et al., 2006; Isidra-Arellano et al., 2021).

Por otro lado, el microARN miR775 presentó una acumulación de 0.74 Log₂FC a los 3 días y su respectivo gen blanco que codifica para una proteína de la superfamilia alfa/beta hidrolasas (AT1G52700) fue confirmado en el degradoma. Un estudio del miR775 reportó que este microARN desempeña un papel en el crecimiento de la raíz en *A. thaliana*, sin

embargo, no hay antecedente sobre su regulación específica sobre el blanco AT1G52700 (Gaddam et al., 2021). De otro lado, en *A. thaliana* este blanco ha sido encontrado inducido en un set de genes en respuesta a un hongo responsable de la enfermedad del mildiu, y podría estar relacionado con la defensa a este patógeno. Es posible que la inducción del miR775 participe a la regulación de la defensa, vía AT1G52700, para permitir la colonización por *P. indica* (Christiansen et al., 2011). El miR168a-5p muestra una acumulación de 0.82 Log₂FC mientras que en el transcriptoma su gen blanco *AGO1* (Argonaute 1, AT1G48410) tiene una acumulación inversa al microARN con un Log₂FC de -0.69. Además, este blanco se confirmó por el degradoma en ambas bibliotecas, lo cual podría indicar que el blanco es escindido en raíces en ausencia y presencia del hongo (**Tabla 8**). Se conoce que la pareja miR168/AGO1 está involucrada en la respuesta a estrés abiótico en *A. thaliana* (W. Li et al., 2012) y también que miR168 está inducido por elicitores fúngicos (Baldrich et al., 2014).

La pareja candidata iso-miR860/ *PLAT1* (Polycystin Lipoxygenase Alpha-toxin and Triacylglycerol lipase, AT4G39730) (**Tabla 8**) es interesante porque se ha reportado que la proteína PLAT1 tiene un posible papel en la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*, dicha proteína siendo secretada específicamente en el co-cultivo (Thürich et al., 2018). Después de detectar la proteína PLAT1, Thürich y colaboradores (2018) analizaron la mutante *plat1* y encontraron durante la simbiosis con *P. indica* que la raíz de *plat1* era fuertemente colonizada por el hongo después de 7 días, curiosamente observaron también que la expresión del gen *PLAT1* durante la simbiosis WT, es decir, *A. thaliana* + *P. indica* se reduce los primeros días de colonización y después de dos semanas no se detecta su expresión. Además, el análisis fenotípico de la mutante *plat1* durante la simbiosis con *P. indica* mostró que la raíz era fuertemente colonizada por el hongo después de 7 días. Nuestros resultados del transcriptoma coincide con lo reportado por Thürich et al., puesto que *PLAT1* está diferencialmente menos acumulado a los 3 y 7 días (Log₂FC, -0.5 y -1.02 respectivamente) a su vez iso-miR860 está más acumulado a los 3 días (Log₂FC, 0.83) observándose una regulación inversa del blanco y el microARN en este tiempo (**Tabla 8**). El degradoma no mostró resultado para esta pareja, sin embargo, podría indicar que la acción del iso-miR860 sea la inhibición de la síntesis de proteínas y no la degradación del transcrito.

El miR164c-5p se encuentra reprimido a 7 días en plantas inoculadas con *P. indica*. La pareja miR164c-5p/*NAC4* (NAC domain containing protein 4, AT5G07680) se confirmó en los resultados del degradoma en las dos librerías (+*P. indica* y Control) (**Tabla 8**), esto sugiere que la acción del microARN sobre su blanco se lleva a cabo en ambas condiciones y no necesariamente es un evento específico de la interacción. Sin embargo, cabe mencionar que en 2017, Lee y colaboradores proponen que el factor de transcripción *NAC4* promueve la muerte celular hipersensible en hojas de *A. thaliana* durante la infección con el hongo necrotrófico *Alternaria brassicicola*, vía la regulación positiva modulada por miR164c-5p. En nuestras muestras, la represión del miR164 a 7 días podría permitir la traducción de *NAC4* y, en consecuencia, la muerte celular inducida necesaria en esta etapa de la colonización por *P. indica*.

Por otro lado, los microARN miR156a-5p y miR157a-5p, reprimidos a 14 días y 7 días, respectivamente, mostraron cada uno 3 blancos candidatos de la familia *SPL* (Squamosa Promoter Binding Protein-Like) (**Tabla 8**). Se conoce que los factores de transcripción *SPL* están involucrados en la regulación del desarrollo de la raíz lateral y su regulación puede ser mediada por miR156 y/o miR157 (Zheng et al., 2019). La inducción de *SPL* vía la regulación de miR156 y miR157 podría participar al mejoramiento del desarrollo de la raíz observado después de 7 dpi por *P. indica*.

La pareja miR319a/*TCP* (Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor) también está incluida en la lista de mejores candidatos donde miR319a presenta 3 blancos de la familia *TCP* (AT3G15030, AT4G18390 y AT1G30210) (**Tabla 8**). Este microARN es uno de los más conservados en plantas y está involucrado en el desarrollo y respuesta a los estreses bióticos y abióticos, vía la regulación de la síntesis del ácido jasmónico, hormona multifuncional en las plantas (Y. Fang et al., 2021). En nuestros resultados, el miR319a está diferencialmente menos acumulado en el tiempo 7 días (Log₂FC, -1.39) y el blanco *TCP4* (AT3G15030) se expresó únicamente en el tiempo 7 días (Log₂FC, 7.09) observándose una regulación inversa de expresión entre el microARN y el blanco. En cambio, los otros dos genes *TCP2* y *TCP24* se expresan diferencialmente a los 7 días, pero también en otros tiempos y su acumulación ha sido menor que *TCP4* (**Tabla 8**). Sin embargo, debido a que el

miR319 regula varios genes de una misma familia, puede ser más difícil un estudio funcional, ya que podría haber redundancia.

El microARN miR824-5p se encuentra diferencialmente más acumulado a los 14 días (Log2FC, 1.01) y su blanco *AGL16* (*Agamous-Like16*, AT3G57230) se confirmó en el degradoma en las dos bibliotecas, por lo que es probable que su función no sea específica de la interacción (**Tabla 8**). Sin embargo, cabe mencionar que el miR824-5p es específico de las *Brassicaceae*. La aparición del miR824-5p probablemente sucedió por la duplicación de su gen blanco *AGL16*, el cual es un factor de transcripción que regula el tiempo de floración en *A. thaliana* (Hu et al., 2014). También *AGL16* ha sido identificada como un inhibidor del crecimiento de la raíz durante estrés abiótico (P. X. Zhao et al., 2021). Durante la colonización por *P. indica*, podemos imaginar que la represión de la producción de *AGL16* por miR824 podría ayudar a la promoción del crecimiento de la parte aérea observado a 14 días.

El microARN miR408-3p está diferencialmente más acumulado a los 14 días con un Log2FC de 1.5 coincidiendo con nuestros resultados de qPCR donde también en el tiempo 14 días se obtuvo una mayor acumulación del microARN en la muestra +*P. indica* comparada al control (**Figura 21**). La pareja miR408-3p/*ARPN* (Plantacyanin, AT2G02850) se confirmó en los resultados del degradoma en ambas bibliotecas. El microARN miR408 es uno de los microARN más conservados en plantas, reportándose su anotación en más de 30 especies, así mismo, está involucrado en la homeostasis del cobre, promoción del crecimiento y biosíntesis de pigmentos en plantas de *A. thaliana* (Song et al., 2018; Zhang & Li, 2013). Además, la acumulación de este microARN también se había reportado en plantas de pasto y arroz durante la simbiosis con *P. indica* (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021).

El microARN miR398b-3p se encontró inducido en los tres tiempos (3, 7 y 14 días) y su respectivo gen blanco es *CSD1* (Copper/zinc Superoxide Dismutase 1, AT1G08830), el cual también se confirmó en los resultados de degradoma en ambas bibliotecas (**Tabla 8**). *CSD1* es un gen involucrado en la respuesta a estrés en *A. thaliana* (Sunkar et al., 2006) y el miR398 se ha propuesto como un regulador maestro del desarrollo de las plantas (J. Li et al., 2022). Finalmente, no es sorprendente encontrar este nodo regulatorio diferencialmente

expresado durante la colonización por *P. indica*, sin embargo, su papel particular queda todavía por investigar.

Los genes blancos de los microARN (**Tabla 8**) mostraron un enriquecimiento en diferentes dominios de proteínas tales como Pentatricopeptide repeat, Transcription factor SBP-box, Transcription factor TCP subgroup y Transcription factor TCP (**Tabla 7**). Lo cual es interesante, porque destacan elementos conocidos por ser reguladores de las interacciones planta microorganismos vía la modulación de las defensas. El desafío a futuro es conocer las regulaciones río arriba y río abajo de cada red regulatoria que pueda dar más información de genes específicos que regulen la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*, donde, gracias a este estudio, conocemos que la presencia y la probable participación de los microARN pueden ser puntos clave de la interacción.

También se obtuvieron otras dos listas de parejas candidatas, una de ARN pequeños con sus respectivos blancos putativos (**Tabla 9**) y otra de las parejas de microARN/blancos que arrojó CleaveLand con los resultados de secuenciación del degradoma y que no se integraron en la Tabla 8 debido a que sus microARN no se encontraban diferencialmente expresados (**Tabla 10**). De la lista de ARN pequeños/blancos putativos, algunos ejemplos importantes son la presencia de la secuencia “CCTCCCGGGAAGTCTTCGTG” diferencialmente menos acumulada a los 7 días (Log2FC, -3.26), que de acuerdo a los resultados de ShortStack es un microARN putativo cuyo respectivo blanco *M3KDELTA7* (AT1G18160) es una cinasa requerida para la transducción de señales de estrés osmótico y ABA (TAIR). También se obtuvo una secuencia “CATGCTAATCTTCTCTGTATCGTT” que corresponde a un phasiRNA putativo (Phased Secondary Small Interfering RNAs) el cual está diferencialmente más acumulado a los 14 días (Log2FC, 0.86) y su blanco putativo es AT2G24420 que codifica para una proteína de reparación del ADN relacionada con ATPasa (TAIR). Por otro lado, también se identificaron dos tRFs (tRNA-derived fragments) PT-166237 y PT-395295, donde ambos están diferencialmente más acumulados a los 14 días (**Tabla 9**) y sus respectivos blancos putativos AT1G22880 y AT1G73360 codifican para CEL5 (Cellulase 5) y EDT1 (Enhanced Drought Tolerance 1) respectivamente. Las 16 secuencias restantes de ARN pequeños están sin identificar y un análisis breve en ShinyGo

reveló que la red de procesos biológicos que involucra a los blancos putativos es la respuesta al ácido salicílico y respuesta a la defensa (**Tabla 9, Anexo 11.17**).

La lista de las parejas microARN/blancos obtenida del degradoma mostró 10 microARN específicos de la biblioteca + *P. indica*, es decir, que no se encontraron en la condición control (*-P. indica*) lo que sugiere una mayor probabilidad de que tengan un papel específico de la simbiosis (**Tabla 10**). Algunos ejemplos son la pareja miR396b-5p y su blanco *RAP2.12* (Ethylene Response Factor Related to AP2 12, AT1G53910) que codifica para un factor de transcripción que pertenece a su vez al grupo ERF (Ethylene Responsive Factors). La función de la proteína RAP2.12 es la activación de varios genes ante una respuesta de baja disponibilidad de oxígeno, se ha reportado en *A. thaliana* que la expresión continua de RAP2.12 tiene un efecto represor sobre el desarrollo de las raíces laterales (Shukla et al., 2019). La pareja miR169n/ *NF-YA2* (Nuclear Factor Y Subunit A2, AT3G05690) es importante porque el blanco tiene varias funciones como el crecimiento, desarrollo, respuesta al estrés en plantas y también el crecimiento de la raíz primaria (H. Zhao et al., 2017). El miR164a y su gen blanco *NAC6* (NAC Domain Containing Protein 6, AT5G39610) que codifica para un factor de transcripción involucrado en la senescencia en hojas (Kim et al., 2011) también se ha propuesto que tiene un papel en raíz ya que, en 2015, Lachowiec y colaboradores observaron que la mutante disponible para *NAC6* (AT5G39610) presentó una disminución de la longitud de la raíz. La pareja miR172c/ *AP2* (Apetala 2, AT4G36920) está involucrada en promover la floración en *A. thaliana* (Chen, 2004) aunque en soja se ha reportado que el microARN gma-miR172c regula la infección de rizobios y la organogénesis del nódulo (Y. Wang et al., 2014). Por lo tanto, las parejas miR396b-5p/ *RAP2.12*, miR169n/ *NF-YA2*, miR164a/ *NAC6* y miR172c/ *AP2* son relevantes porque están involucradas en la fisiología de la raíz y además una pareja tiene un papel importante en otra simbiosis mutualista. Lo que sugiere que alguna pareja mencionada en los resultados pueda tener un papel en la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*.

Nuestros resultados revelaron 26 microARN diferencialmente expresados anotados por miRBase y sRNAanno, lo cual nos permitió compararlos con las familias diferencialmente expresadas obtenidas de los microtranscriptomas de las plantas de orquídeas, arroz y pasto con *P. indica* (Kord et al., 2019; Šečić et al., 2021; W. Ye et al.,

2014). Se obtuvieron 11 familias diferencialmente acumuladas en *A. thaliana*, en interacción con *P. indica*, compartidas con una o varias plantas. Únicamente las familias del miR156, miR159 y miR168 se compartían en las cuatro plantas (**Figura 28, Anexo 11.18**). Por lo tanto, se puede suponer que estas familias agrupan reguladores clave de la simbiosis con *P. indica* en plantas monocotiledóneas, como en *A. thaliana*. De otro lado, la proporción de familias de microARN específicamente DE en cada planta modelo indica que la respuesta microtranscriptómica ante *P. indica* está realizada mayormente por microARN no conservados o, de manera menos parsimoniosa, regula vías independientes. Más estudios de microARN en plantas dicotiledóneas durante la simbiosis con *P. indica* nos permitirá tener más conocimiento sobre la conservación y la especificidad de la respuesta microtranscriptómica en cada taxón mono- o dicotiledóneas durante la interacción con *P. indica*.

Por otro lado, la comparación de las familias de microARN diferencialmente expresadas en la simbiosis con micorrizas arbusculares (Lelandais-Brière et al., 2016; Wu et al., 2016; Xu et al., 2018) con nuestros resultados mostró 8 familias compartidas entre las dos simbiosis: miR156, miR159, miR164, miR168, miR319, miR398, miR399 y miR408 (**Figura 29**). En particular, las familias de miR171, miR393 y miR396 involucradas en la formación de arbusculos durante la micorriza, no se comparte con los resultados de *A. thaliana* + *P. indica*, sugiriendo que difícilmente estas interacciones comparten una misma vía de regulación simbiótica. En cambio, se puede observar que las familias compartidas en ambas simbiosis tienen papeles generales involucrados en el crecimiento, absorción de nutrientes y defensa de la planta, lo cual muestra que *A. thaliana*, a pesar de no ser capaz de asociarse con micorrizas arbusculares, conserva varias familias de microARN importantes para la interacción fúngica durante su asociación con *P. indica*.

Otra pareja candidata prioritaria es miR161/*PPR* (Pentatricopeptide repeat (*PPR*) superfamily protein). El microARN miR161.2 se encuentra inducido a los 3 días y curiosamente se obtuvieron ocho blancos para este microARN confirmados en el degradoma, AT5G55840 (*PPR*), AT1G63150 (Tetratricopeptide repeat (*TPR*)-like superfamily protein), AT1G62590 (*PPR*), AT1G63330 (*PPR*), AT1G63400 (*PPR*), AT1G62910 (*PPR*), AT1G62914 (*PPR*), AT1G62930 (*TPR*) pero solamente el blanco AT5G55840, el único

localizado en el cromosoma 5 (los demás están en un cluster del cromosoma 1), está degradado exclusivamente en la muestra +*P. indica* (**Tabla 8**), lo que sugiere una mayor probabilidad de tener un papel durante la interacción. La función del gen PPR (AT5G55480) en *A. thaliana* no es completamente clara, se sugiere que es un regulador maestro putativo de múltiples transcritos, con un total 2090 transcritos asociados, de los cuales la red más enriquecida de estos genes es la biosíntesis de metabolitos secundarios (X. Wang et al., 2020). En cambio, los PPR localizados en el cromosoma 1 producen ARN pequeños de interferencia. En 2018, Hou et al., encontraron que los ARN de interferencia (ARNi) derivados de PPR (incluyendo nuestros 7 genes candidatos) en *A. thaliana* actuaban sobre ARN mensajeros del oomiceto *Phytophthora* como mecanismo de defensa contra el patógeno y, a su vez, el oomiceto producía un inhibidor específico PSR2 (*Phytophthora* suppressors of RNA silencing 2) encargado de suprimir la vía de silenciamiento de ARN en plantas, particularmente sobre ARNi generados a partir de transcritos PPR y TAS1/2 en *A. thaliana*. Una línea transgénica de *A. thaliana* que expresa constitutivamente a PSR2 obtuvo una reducción del >90% de ARN de interferencia derivados de PPR (Hou et al., 2019). Por lo que, posiblemente el microARN miR161 y sus respectivos blancos PPR participen en un papel importante durante la simbiosis con *P. indica*. En nuestros datos, el miR162 siendo inducido a 3 dpi, es posible que promueva la generación de ARNi para modular la defensa contra *P. indica* u otros patógenos, o, que el miembro del cromosoma 5 (AT5G55840) tenga un papel independiente de la vía de ARNi, todavía desconocido.

Para seguir con el análisis funcional de un miRNA candidato, seleccionamos al miR161 basado en los resultados obtenidos. Se evaluaron 3 líneas diferentes de la mutante *mir161* durante la simbiosis con *P. indica*, de las cuales 2 mostraron un menor número de esporas extracelulares y ausencia de esporas intracelulares en la raíz comparada a Col-0 +*P. indica* (Control) (**Figura 32**). Como se mencionó anteriormente, el miR161.2 presentó varios blancos candidatos que correspondían a genes *PPR* (Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein). Curiosamente, en la interacción entre *A. thaliana* y el oomiceto *Phytophthora* se observó que, en líneas mutantes del miR161, las plantas eran hipersensibles al oomiceto, relacionando este fenotipo con la ausencia de ARN pequeños secundarios de interferencia producidos por genes *PPR* degradados por el miR161 y que regulan negativamente genes blancos del oomiceto, como vía de defensa (Hou et al., 2019). En

nuestras condiciones, se esperaría que las mutantes analizadas estuvieran más colonizadas por el hongo, sin embargo, el fenotipo que resultó parece indicar que hay menor colonización. En nuestros resultados de secuenciación, varios *PPR* descritos por Hou y colaboradores (2019) se confirmaron en el degradoma, pero, según los datos, la degradación inducida por el miR161.2 está en ambas condiciones (**Tabla 8**) lo que podría indicar que esta regulación se deba a otros eventos biológicos, no exclusivamente de la interacción planta-hongo. De igual manera, podemos imaginar que la coevolución entre *P. indica* y *A. thaliana* no permitió el desarrollo de una regulación ARNi trans-simbionte, como ocurrió entre las Brassicaceae y otras especies de hongos. Además de estos blancos, se identificó otro blanco *PPR* (AT5G55840), del cual la degradación está inducida por el miR161.2 únicamente en la biblioteca +*P. indica*, y que no produce ARNi. Se sabe que varias familias de proteínas con motivos repetidos en tándem (e.g. Leucine Rich Repeats (LRR) juegan papeles claves en la defensa. La función del *PPR* (AT5G55840) podría ser relacionada con la defensa y la ausencia de miR161 podría inducir la acumulación de este gen, y promover la resistencia a la colonización por *P. indica*. Sin embargo, su papel en *A. thaliana* no es muy claro) por lo que es difícil concluir precisamente que el fenotipo es afectado por una acumulación del blanco *PPR* en la planta o si es un efecto independiente de los *PPR* y miR161 posiblemente teniendo otro blanco.

En paralelo, como proyecto adicional, también se analizó la mutante *ago5*, con inserción de T-DNA en el gen *ARGONAUTE5* (*AGO5*). Esta última se eligió porque *AGO5* está asociada a la acción de microARN en plantas y ha sido identificada como reguladora de una simbiosis radical (Reyero-Saavedra et al., 2017). Este análisis fenotípico se realizó en una sola línea mutante debido a problemas de germinación en las otras dos líneas. El fenotipo observado de las mutantes en simbiosis con el hongo fue un mayor número de esporas intra y extracelulares comparado al Control (**Figura 33**). El fenotipo de *ago5* durante la simbiosis con *P. indica*, parece indicar que hay una sobre colonización del hongo en la raíz lo cual coincide con una respuesta de defensa reducida. Se conoce que las proteínas *AGO5* pueden unirse tanto a microARN así como a ARN viral, un ejemplo de ello es que *AGO5* de *A. thaliana* regula la resistencia al virus X de la patata (Brosseau & Moffett, 2015). Otro estudio reveló que *AGO5* también tiene un papel importante en el proceso de nodulación en leguminosas, puesto que el silenciamiento de genes *AGO5* en frijol (*P. vulgaris*) en simbiosis

con rizobios presentaba defectos en la formación de nódulos (Reyero-Saavedra et al., 2017). Al estar involucrada en la defensa y en interacciones beneficiosas, es muy probable que AGO5 tenga un papel en la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*. Se sugiere que AGO5 es importante para tener una simbiosis equilibrada, dejando como interrogante si una menor acción de uno o varios microARN debido a la ausencia de AGO5 sería responsable del fenotipo o si el efecto observado es la alteración del diálogo molecular entre AGO5 y un ARN exógeno proveniente del hongo.

9. CONCLUSIONES

1. Logramos identificar diferentes parejas de microARN/blancos acumuladas diferencialmente, o con una degradación diferencial, en los tiempos 3, 7 y 14 días post-co-cultivo en tejido de raíz de *A. thaliana* en interacción con *P. indica*.
2. Varios genes blancos de los microARN candidatos identificados resultaron ser relevantes debido a que su función involucra la defensa, homeostasis del fosfato, crecimiento de la raíz, o desarrollo general de las plantas.
3. Las mutantes *mir161* y *ago5* de *A. thaliana* en simbiosis con *P. indica* tienen un fenotipo alterado que podría indicar que tanto el microARN miR161 como AGO5 son importantes para esta simbiosis.

10. PERSPECTIVAS

1. Analizar la función de las diferentes parejas de microARN/blancos candidatas, identificadas gracias a los resultados de secuenciación masiva, durante la simbiosis entre *A. thaliana* y *P. indica*.
2. Estudiar extensivamente el fenotipo observado en el análisis funcional del *mir161* utilizando mutantes y líneas sobre-expresantes de los diferentes genes blancos correspondientes, así como de los ARNi secundarios producidos.
3. Ampliar el análisis del fenotipo observado en las plantas mutantes *ago5* con el análisis de otras líneas mutantes, líneas sobre-expresantes y la identificación de los ARN pequeños asociados con AGO5.
4. Analizar la existencia de ARN pequeños trans-simbiontes gracias a los resultados de secuenciación que obtuvimos.
5. A largo plazo, el análisis funcional de las parejas microARN/blancos durante la simbiosis con *P. indica* nos podrá proporcionar candidatos interesantes que puedan ser estudiados a futuro en otras plantas de interés agrícola.

11. ANEXOS

11.1. Preparación de medio KM y PNM

- ❖ Preparación de medio KM para el crecimiento de *P. indica* obtenido de Jacobs *et al.*, 2011.

Table 1: Kaefer Medium (KM; Hill and Käfer 2001) composition for *P. indica*.

Components for 1 liter	Amounts
D-glucose	20.0 g
peptone/trypton	2.0 g
yeast extract	1.0 g
casein hydrolysate	1.0 g
macronutrient mix (20x) ^{1*}	50.0 ml
micronutrient mix (100x) ^{2*}	10.0 ml
Fe-EDTA (100x) ^{3*}	1.0 ml
agar	10.0 g
adjust pH to 6.5 with 10N KOH autoclave at 121°C for 20 min add 1 ml filter sterilised vitamin mix (100x) ^{4*} before pouring the media (temperature 45 to 50°C) to Petri dishes.	
1* macronutrient mix (20x) for 1 liter: 12 g NaNO ₃ ; 10.4 g KCl; 10.4 g MgSO ₄ ·7H ₂ O; 30.4 g KH ₂ PO ₄ . All components are dissolved in sterile H ₂ O and then stored at 4°C.	
2*micronutrient mix (100x) for 1 liter: 2.2 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 1.1 g H ₃ BO ₃ ; 0.5 g MnSO ₄ ·4H ₂ O; 0.16 g CoCl ₂ ·5H ₂ O; 0.16 g CuSO ₄ ·5H ₂ O; 0.11 g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (ammonium molybdate tetrahydrate). All components are dissolved in sterile H ₂ O and then stored at 4°C.	
3*Fe-EDTA (100x) for 50 ml: 0.77 g Na ₂ EDTA; 0.556 g FeSO ₄ ·7H ₂ O. All components are dissolved in sterile H ₂ O, heat to boil and stir for 30 min while cooling and then store at 4°C.	
4*vitamin mix (100x) for 100 ml: 10 g thiamin; 0.04 g glycin; 0.01 g nicotinic acid; 0.01 g pyridoxine. All components are dissolved in sterile H ₂ O, then filter-sterilized and stored as aliquots of 1 ml at -20°C.	

- ❖ Preparación de medio PNM para el crecimiento de *P. indica* y *A. thaliana* (Co-cultivo) obtenido de Jacobs *et al.*, 2011.

Table 2: Modified PNM medium composition used for co-cultivation experiments (*A. thaliana* and *P. indica*).

Components
5 mM KNO ₃ 2 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 2 mM Ca(NO ₃) ₂ 2.5 ml Fe-EDTA ^{1*} /1 liter 1.0 ml micronutrient-mix ^{2*} /1 liter 10.0 g agar (Serva)/1 liter
sterilize at 121°C for 20 min
Adjust pH (under sterile conditions) to 5.6 by adding 2.5 ml filter-sterilized 1 M KH ₂ PO ₄ .
1* Fe-EDTA add 2.5 g FeSO ₄ ·7H ₂ O in 400 ml sterile H ₂ O add 3.36 g Na ₂ EDTA heat to boil in the microwave stir for about 30 minutes while cooling bring to the final volume of 450 ml.
2* Micronutrient-mix 70 mM H ₃ BO ₃ ; 14 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O; 0.5 mM CuSO ₄ ·5H ₂ O; 1 mM ZnSO ₄ ·7H ₂ O; 0.2 mM Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O; 10 mM NaCl; 0.01 mM CoCl ₂ ·6H ₂ O.
Pour approximately 20 ml of PNM medium to each plate.

11.2. Protocolo de Extracción de ARN total (miRVana miRNA isolation kit protocol de Ambion)

Nota:

- ✚ No dejar que la columna se seque.
- ✚ No tocar la membrana.
- ✚ Tener los tubos en hielo hasta el paso de fenol/cloroformo.
- ✚ Usar 100mg de tejido molido (usar más de 100mg podría saturar la columna) en un tubo de 2 ml.
- ✚ Realizar todas las centrifugaciones a 10.000 g a temperatura ambiente.
- ✚ Tener los tubos de 2ml, y las puntas RNA free ya estériles listos un día antes.
- ✚ Tener Water free nuclease listo
- ✚ Tener el Etanol al 100%
- ✚ Etiquetar todos los tubos
- ✚ Revisar que los aparatos funcionen. Antes de iniciar el protocolo poner la centrifugadora 10 000g y a 5 minutos.

PROTOCOLO:

1. Pre-calentar RNase-free H₂O o Elution Solution a 95°C. El EtOH 100%, Wash Solution 1 y Wash solution 2/3 tenerlos a temperatura ambiente. Checar si las soluciones Wash no forman cristales y agitar para homogenizar la solución.
2. Primero poner hielo en un recipiente y Preparar el vortex (tener un cronometro). Sacar las muestras con el tejido molido (almacenadas a -80°) pasarlas a nitrógeno líquido. Sacar todas las muestras y ponerlas rápidamente en el hielo, abrir los tubos (no importa mucho el orden en poner los tubos), poner rápidamente 900µl de Lysis/Binding Buffer y 90 µl miRNA Homogenate Additive dentro del tubo que contiene el tejido molido (Ver que el volumen en la pipeta este bien), cerrar el tubo y vortexear 30 a 60 segundos.
3. Después de vortexear, incubar 10 minutos en hielo (nota:volver a vortexear durante esta incubación porque se sedimenta la muestra). Al terminar los 10 minutos rápido ir a la campana.
4. (Nota: en campana) Añadir 900µl de acid-Phenol Cloroformo frío (pipetear la fase inferior), abrir los tubos y poner el fenol-cloroformo, vortexear por 30 o 60 segundos hasta que quede blanca la muestra, rápidamente ir a la centrifugadora.
5. Centrifugar 5 min y checar si la interfase esta compacta (casi siempre es compacta). Si esto no ocurre, repetir la centrifugación.
6. Transferir 800µl de la fase superior sin perturbar la interfase dentro de un tubo nuevo de 2 ml. (hacerlo en campana)
7. Añadir 1ml de etanol 100% a temperatura ambiente y mezclar a fondo pipeteando. (nota: se pipetea lentamente).
8. Poner las columnas sobre los tubos colección suministrado por el kit y transferir 650µl de la mezcla. (hasta 700µl). El total de mezcla pasa en tres aplicaciones es decir trasferir de 650 µl de muestra hasta acabarse la muestra.
9. Centrifugar 15 segundos y descartar el sobrenadante. Repetir hasta que toda la mezcla pase a través de la columna.
10. Aplicar 700µl de Wash Solution 1 y centrifugar 5-10 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilizar el mismo tubo colección.
11. Aplicar 500µl de Wash Solution 2/3 y centrifugar 5-10 segundos. Descartar el sobrenadante y reutilizar el mismo tubo colección.
12. Repetir el paso 11.
13. Descartar el sobrenadante y centrifugar por 1 min para remover los fluidos residuales de la columna utilizando el mismo tubo colección

14. Transferir las columnas a otro tubo limpio que contiene el kit. Aplicar 100µl de Elution Solution o nuclease free wáter pre-calentado (95°C) en el centro del filtro y cerrar el tapón. Centrifugar por 20-30 segundos.
15. Recoger la muestra (la cual contiene el RNA)
16. Cuantificar el RNA por nanodrop
17. Almacenar-80°C.

11.3. Protocolo RT-PCR

Análisis de expresión de microARN maduros por RT-PCR

Aproximadamente 10ug de RNA total será utilizado para la síntesis de cDNA, Pulsed RT-PCR. Se utilizara el primer específico del microRNA o RT primer, también se añadirá el primer dT.

Preparar el siguiente mix:

Reagente	Volume / uL
RNA tratado (2,5 ug)	10,0
1 uM RT Primer*	1,0
Ollgo dT (500 ng/uL)	1,0
10 mM dNTP Mix	1,0
TOTAL	13,0

*Primer específico para el microARN

El mix de la muestra es incubado a 65 °C por 10 minutos para desnaturalizar estructuras secundarias del RNA. Posteriormente incubar en hielo o en termociclador a 4°C por 2 minutos. Después agregar el siguiente mix adicional:

Reagente	Volume / uL
<i>5X First Strand Buffer</i>	4,0
0,1 M DTT	2,0
<i>RNaseOut</i> (40 U/uL)	0,1
SuperScript III RT (200 U/uL)	1,0
TOTAL	20,0

Correr la PCR en el termociclador con los siguientes parámetros: 16 °C por 30 minutos, seguido de una retrotranscripción pulsada de 60 ciclos a 30°C por 30 segundos, 42 °C por 30

segundos y 50°C por 1 segundo, como se describe en Varkonyi *et al.*, (2007). Posteriormente incubar a 85°C por cinco minutos para inactivar la enzima RT.

11.4. Protocolo PCR. Genotipificación

Los oligonucleótidos deben estar a una concentración 10µM. Para la reacción se utilizó: PCR maxter Mix (2X) que contiene dNTPs, buffer, y la enzima Taq Polimerasa. Con un volumen final de 10µL.

Las condiciones en el termociclador son las siguientes para Genotipificación:

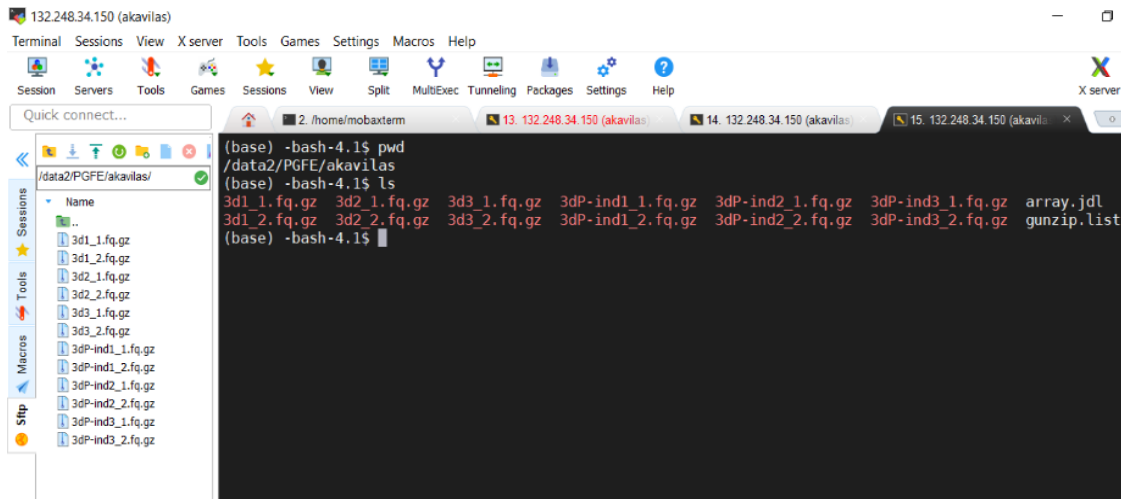
1T_{mp}: 94 °C por 3 minutos, 3T_{mp}: 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 68°C por 3 minutos, 2T_{mp}: 1 ciclo a 68°C por 2 minutos, 10 °C ∞

11.5. Análisis bioinformático Transcriptoma

PARTE 1 gunzip

Los archivos generados por BGI estaban en formato fq.gz

Ejemplo del tiempo 3 días:



```
(base) -bash-4.1$ pwd
/data2/PGFE/akavilas
(base) -bash-4.1$ ls
3d1_1.fq.gz  3d2_1.fq.gz  3d3_1.fq.gz  3dP-ind1_1.fq.gz  3dP-ind2_1.fq.gz  3dP-ind3_1.fq.gz  array.jdl
3d1_2.fq.gz  3d2_2.fq.gz  3d3_2.fq.gz  3dP-ind1_2.fq.gz  3dP-ind2_2.fq.gz  3dP-ind3_2.fq.gz  gunzip.list
(base) -bash-4.1$
```

Se genera la lista de gunzip:

*gunzip.list: Bloc de notas

```
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d1_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d1_2.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d2_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d2_2.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d3_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3d3_2.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1_2.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2_2.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3_1.fq.gz
gunzip -d /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3_2.fq.gz
```

El archivo gunzip se descomprime con los siguientes comandos, agregando la lista (gunzip.list):

array.jdl: Bloc de notas

```
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
#$ -S /bin/bash
#$ -cwd
#$ -e error
#$ -N Array
SEEDFILE=/data2/PGFE/akavilas/gunzip.list
SEED=$(cat $SEEDFILE | head $SEEDFILE -n $SGE_TASK_ID | tail -n 1)
$SEED
```

Se generan los siguientes archivos Fastq:

```
(base) -bash-4.1$ ls
3d1_1.fq 3d3_1.fq 3dP-ind2_1.fq
3d1_2.fq 3d3_2.fq 3dP-ind2_2.fq
3d2_1.fq 3dP-ind1_1.fq 3dP-ind3_1.fq
3d2_2.fq 3dP-ind1_2.fq 3dP-ind3_2.fq
(base) -bash-4.1$
```

PARTE 2 bowtie

Se genera la lista bowtie, Ejemplo:

```
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3d1_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3d1_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3d1.sam
```

bowtie.list: Bloc de notas

```
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
bowtie2 -p 8 -q --phred33 --sensitive --dpad 0 --gbar 99999999 --mp 1,1 --np 1 --score-min L,0,-0.1 -I 1 -X 1000 --no-mixed
```

```

bowtie.list: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3d1_1.fq
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3d2_1.fq
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3d3_1.fq
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind:
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind:
--no-mixed --no-discordant -k 200 -x /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind:

```

```

: Bloc de notas
iición Formato Ver Ayuda
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3d1_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3d1_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3d1.sam
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3d2_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3d2_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3d2.sam
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3d3_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3d3_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3d3.sam
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1.sam
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2.sam
i -1 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3_1.fq -2 /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3_2.fq -S /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3.sam

```

Se agrega la lista (bowtie.list):

```

*array.jdl: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
#$ -S /bin/bash
#$ -cwd
#$ -e error
#$ -N Array
SEEDFILE=/data2/PGFE/akavilas/bowtie.list
SEED=$(cat $SEEDFILE | head $SEEDFILE -n $SGE_TASK_ID | tail -n 1)
$SEED

```

Se generan los archivos SAM

```

(base) -bash-4.1$ ls -l
total 102424468
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8179369045 Nov 30 13:44 3d1_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8179369045 Nov 30 13:47 3d1_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 285212672 Mar 1 20:50 3d1.sam
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8195668805 Nov 30 13:47 3d2_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8195668805 Nov 30 13:52 3d2_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 285212672 Mar 1 20:50 3d2.sam
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8193356300 Nov 30 13:49 3d3_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8193356300 Nov 30 13:53 3d3_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 285212672 Mar 1 20:50 3d3.sam
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8141946530 Dec 1 00:02 3dP-ind1_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8141946530 Jan 19 17:31 3dP-ind1_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 286261248 Mar 1 20:50 3dP-ind1.sam
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8330443660 Dec 1 00:10 3dP-ind2_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8330443660 Dec 1 00:11 3dP-ind2_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 285212672 Mar 1 20:50 3dP-ind2.sam
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8077018505 Dec 1 00:11 3dP-ind3_1.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 8077018505 Dec 1 00:01 3dP-ind3_2.fq
-rw-r--r-- 1 akavilas users 1515192320 Mar 1 20:50 3dP-ind3.sam

```

Se agrega al cluster el índice de *Arabidopsis thaliana*

```

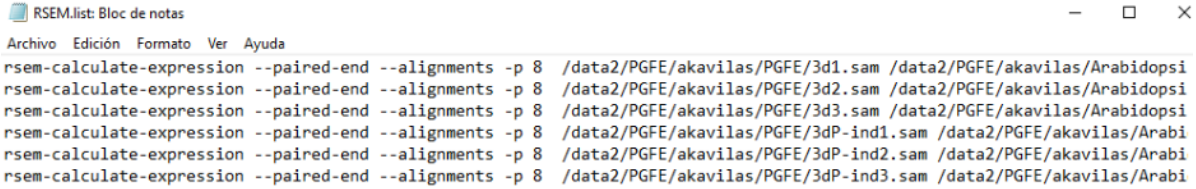
-rw-r--r-- 1 akavilas users 34371965 Feb 9 17:55 Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa.1.bt2
-rw-r--r-- 1 akavilas users 21617280 Feb 9 17:55 Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa.2.bt2
-rw-r--r-- 1 akavilas users 435338 Feb 9 17:55 Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa.3.bt2
-rw-r--r-- 1 akavilas users 21617272 Feb 9 17:55 Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa.4.bt2
-rw-r--r-- 1 akavilas users 279054 Feb 9 17:55 Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa.grp

```

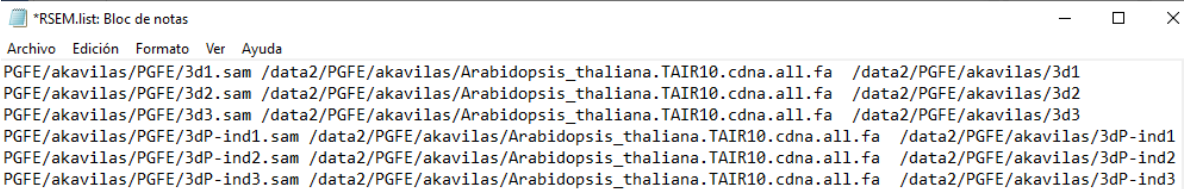
PARTE 3 RSEM

🔗 Se genera la lista RSEM, ejemplo :

```
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3d1.sam  
/data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3d1
```

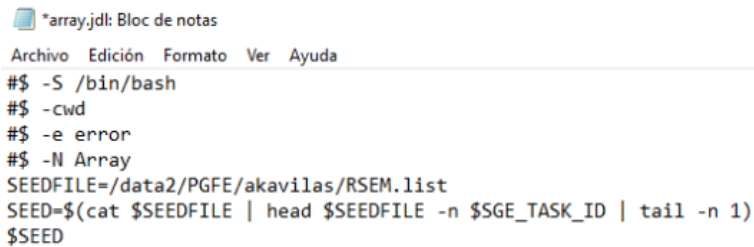


```
RSEM.list: Bloc de notas  
Archivo Edición Formato Ver Ayuda  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3d1.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsi  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3d2.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsi  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3d3.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsi  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind1.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabi  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind2.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabi  
rsem-calculate-expression --paired-end --alignments -p 8 /data2/PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind3.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabi
```



```
*RSEM.list: Bloc de notas  
Archivo Edición Formato Ver Ayuda  
PGFE/akavilas/PGFE/3d1.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3d1  
PGFE/akavilas/PGFE/3d2.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3d2  
PGFE/akavilas/PGFE/3d3.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3d3  
PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind1.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind1  
PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind2.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind2  
PGFE/akavilas/PGFE/3dP-ind3.sam /data2/PGFE/akavilas/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.cdna.all.fa /data2/PGFE/akavilas/3dP-ind3
```

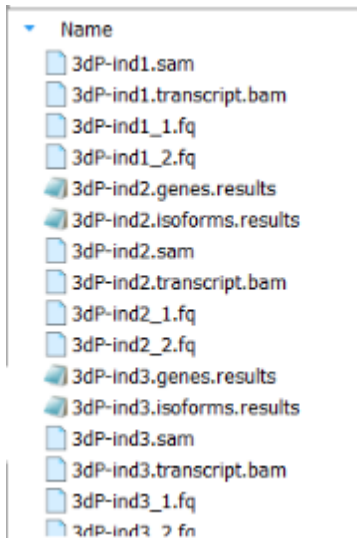
🔗 Se agrega la lista (RSEM.list):



```
*array.jdl: Bloc de notas  
Archivo Edición Formato Ver Ayuda  
## -S /bin/bash  
## -cwd  
## -e error  
## -N Array  
SEEDFILE=/data2/PGFE/akavilas/RSEM.list  
SEED=$(cat $SEEDFILE | head $SEEDFILE -n $SGE_TASK_ID | tail -n 1)  
$SEED
```

🔗 Se generan los archivos BAM

🔗 Se generan los resultados. Archivos con todos los genes secuenciados (Transcriptoma)



Los resultados, por ejemplo, de [3dP-ind2.genes.results](#) se insertan en un archivo Excel CSV delimitado por tabulaciones.

	A	B	C	D	E	F	G
1	gene_id	transcript_id(s)	length	effective_length	expected_count	TPM	FPKM
2	AT1G01010.1	AT1G01010.1	1688	1442.34	635	25.84	20.12
3	AT1G01020.1	AT1G01020.1	1329	1083.34	168.29	9.12	7.1
4	AT1G01020.2	AT1G01020.2	1087	841.34	0	0	0
5	AT1G01020.3	AT1G01020.3	1420	1174.34	17.48	0.87	0.68
6	AT1G01020.4	AT1G01020.4	1397	1151.34	9.19	0.47	0.36
7	AT1G01020.5	AT1G01020.5	1306	1060.34	29.04	1.61	1.25
8	AT1G01020.6	AT1G01020.6	944	698.34	0	0	0
9	AT1G01030.1	AT1G01030.1	1905	1659.34	35	1.24	0.96
10	AT1G01030.2	AT1G01030.2	1836	1590.34	0	0	0
11	AT1G01040.1	AT1G01040.1	6276	6030.34	632.3	6.15	4.79
12	AT1G01040.2	AT1G01040.2	5877	5631.34	266.7	2.78	2.16
13	AT1G01050.1	AT1G01050.1	994	748.34	1842.12	144.49	112.49
14	AT1G01050.2	AT1G01050.2	810	564.34	2.88	0.3	0.23
15	AT1G01060.1	AT1G01060.1	2708	2462.34	183.19	4.37	3.4
16	AT1G01060.2	AT1G01060.2	2814	2568.34	26.8	0.61	0.48
17	AT1G01060.3	AT1G01060.3	2517	2271.34	0	0	0
18	AT1G01060.4	AT1G01060.4	2641	2395.34	189.56	4.65	3.62
19	AT1G01060.5	AT1G01060.5	2722	2476.34	0	0	0
20	AT1G01060.6	AT1G01060.6	2933	2687.34	0	0	0
21	AT1G01060.7	AT1G01060.7	2908	2662.34	13.77	0.3	0.24
22	AT1G01060.8	AT1G01060.8	2132	1886.34	145.68	4.53	3.53
23	AT1G01070.1	AT1G01070.1	1692	1446.34	761.6	30.91	24.06
24	AT1G01070.2	AT1G01070.2	1451	1205.34	73.4	3.57	2.78

11.6. Procedimiento en IDEAMEX

Los **expected count** del transcriptoma y microtranscriptoma se analizan en IDEAMEX (Jiménez-Jacinto *et al.*, 2019)

Disponible en IDEAMEX: <http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/>

Expected count de ARN pequeños

		Control3d_1	Control3d_2	Control3d_3	P.indica3d_1	P.indica3d_2	P.indica3d_3
1							
2	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	6676	962	4799	981	646	2117
3	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	9383	1204	6556	1269	963	2958
4	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	16105	2129	11112	2131	1711	5071
5	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	530	481	7598	346	620	1769
6	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	13104	1831	9071	1745	1432	4186
7	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	1221	933	17077	699	1341	4150
8	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	37875	5145	26081	5238	3938	12074
9	GGCUGUAGUUUAGUGGUAAGAAUUC	56769	7510	39033	7774	5942	18097
10	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	2339	1525	22558	994	1871	6078
11	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	3905	2615	39126	1720	3487	10360
12	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	5304	3554	56837	2624	5246	15428
13	GCACCAGUGGUCUAGUGGUAGAAUAGUACCC	3599	2602	31490	1552	3129	9175
14	GCUAACGUCGAUGGAUACA	100	57	62	18	16	49

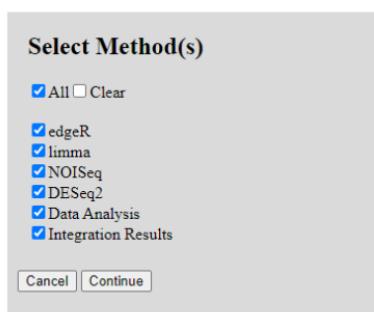
Expected count de genes de *Arabidopsis thaliana* (proviene de archivos de salida de RSEM)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1		Control3d_1	Control3d_2	Control3d_3	P.indica3d_1	P.indica3d_2	P.indica3d_3	
2	AT1G01010.1	635	547	573	475	457	587	
3	AT1G01020.1	168.29	95.81	123.23	89.57	66.96	124.38	
4	AT1G01020.2	0	19.92	8.59	10.37	0	16.14	
5	AT1G01020.3	17.48	19.29	11.67	19.06	21.51	31.69	
6	AT1G01020.4	9.19	6.78	26.41	20.92	20.66	0	
7	AT1G01020.5	29.04	56.21	48.63	48.08	56.87	68.79	
8	AT1G01020.6	0	2.99	6.47	0	0	0	
9	AT1G01030.1	35	30.04	26	43	39	38	
10	AT1G01030.2	0	2.96	0	0	0	0	
11	AT1G01040.1	632.3	793.96	783.14	642.45	447.75	818.7	
12	AT1G01040.2	266.7	79.04	268.86	273.55	263.25	234.3	
13	AT1G01050.1	1842.12	1797	1700	1941	2002.09	1936.61	
14	AT1G01050.2	2.88	0	0	0	2.91	5.39	
15	AT1G01060.1	183.19	86.44	6.75	44.98	31.77	8.5	
16	AT1G01060.2	26.8	8.94	0	7.96	0	0	
17	AT1G01060.3	0	0	0	15.02	0	0	

Los counts se guardaron en archivos CSV (delimitados por tabulaciones) y después se ejecutaron en IDEAMEX.

🚦 Se selecciona el bioconductor. Para nuestros resultados se utilizó DESeq 2, pero también se pueden seleccionar los demás.

Header file is CORRECT



Se puede seleccionar la opción de efecto de lote “Batch”. No se seleccionó para este estudio.

The analysis will be performed with: edgeR, limma, NOISeq, DESeq2, Data Analysis

Header file is CORRECT
Samples names can be edited if required

Samples Names	Batch
Control3d_1	
Control3d_2	
Control3d_3	
P.indica3d_1	
P.indica3d_2	
P.indica3d_3	

If you are interested in analyzing a possible batch effect in your samples use the "batch" column to assign each sample to a batch.

Por último, se selecciona la comparación de las muestras

Define comparisons:

	Control3d	P.indica3d
Control3d		<input checked="" type="checkbox"/>
P.indica3d	<input type="checkbox"/>	

TOP

FDR o Padj

LogFC

CPM

The results of the analysis requested can be consulted on:

http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/ana_karen2809

If you want to download all the results generated in this analysis we suggest you download the file:

http://www.uusmb.unam.mx/ideamex/ana_karen2809/DiffExpAllResults.tar.gz

Citation

For citation when you publish results obtained using the IDEAMEX Website:

Jiménez-Jacinto V, Sanchez-Flores A and Vega-Alvarado L (2019) Integrative Differential Expression Analysis for Multiple EXperiments (IDEAMEX): A Web Server Tool for Integrated RNA-Seq Data Analysis. Front. Genet. Vol 11, pg 279. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00279>

11.8. Extracción de ADN con CTAB

1. Colectar 100mg de tejido en un tubo eppendorf de 2ml esteril
2. Moler el tejido con pistilos estériles (utilizar nitrógeno líquido)
3. Precalear el CTAB2x a 65°C
4. Añadir 1 volumen de hot CTAB2x a cada muestra e incubar por 10-30 minutos a 65°C. Vortexear 1 vez cada 15 minutos.
5. Añadir un volumen de cloroformo- alcohol isoamyl y vortexear por 30 seg.
6. Centrifugar al máximo speed (rpm) por 2 minutos.
7. Pasar la fase acuosa a otro tubo eppendorf de 2ml estéril.
8. Añadir 0.7 volumen de isopropanol frío e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a máximo speed por 15 minutos room °T
10. Descartar el sobrenadante y enjuagar el pellet con 500ml de etanol al 70% frío. Centrifugar por 2 minutos brevemente y descartar nuevamente sobrenadante. Secar el pellet vacum por 3 minutos.
11. Agregar 50ul o 100ul de agua mmQ o agua libre de nucleasas al tubo con el pellet de ADN (blanco).

11.9. Lista de Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Oligonucleótido 5´-3´ Forward	Oligonucleótido 3´-5´ Reverse
<i>PRI</i> (At2g14610)	TTC TTC CCT CGA AAG CTCA A	AAG GCC CAC CAG AGT GTA TG
<i>PDF1.2^a</i> (At5g44420)	CCA AGT GGG ACA TGG TCAG	ACT TGT GTG CTG GGA AGA C
At1g72150	CCG ACA AGG AGA AGC TTA ACA AG TT	CGG CAG ATT TGG ATG GAC CAG CAAG
ACTINA	GCC ATC CAA GCT GTT CTC TC	GCT CGT AGT CAA CAG CAA CAA
miR397a	GAC AAT CAT TGA GTG CAG CG	
miR397a StemLoop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC ATC AA	
miR408	CAG AAT GCA CTG CCT CTTC	
miR408 StemLoop	GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACG CCA GG	
U6 Stem loop	GTG CAG GGT CCG AGG TTT TGG ACC ATT TCT CGA T	
Universal Stem loop qPCR		GTG CAG GGT CCG AGG T

U6 qPCR	GAG AAG ATT AGC ATG GCC CCT	
LBb1.3 (SALK)	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C	
LB1 (SAIL)	GCC TTT TCA GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TTC C	
GK (GABI)	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC	

11.10. Calidad de las muestras de ARN total

Sample Name	Test Instrument	Test Kit	Dilution Ratio(x)	Test Concentration(ng/μL)	Concentration of original sample(ng/μL)	RIN/RQN	28S/18S	Remark
-3d-1small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	82	82	9.2	1.6	
-3d-2small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	88	88	9.1	1.6	
-3d-3small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	83	83	9.1	1.7	
3dP.i-1sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	168	168	9.2	1.7	
3dP.i-2sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	115	115	9.4	1.5	
3dP.i-3sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	99	99	8.9	1.4	

Sample Name	Test Instrument	Test Kit	Dilution Ratio(x)	Test Concentration(ng/μL)	Concentration of original sample(ng/μL)	RIN/RQN	28S/18S	Remark
-3d-1small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	82	82	9.2	1.6	
-3d-2small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	88	88	9.1	1.6	
-3d-3small	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	83	83	9.1	1.7	
3dP.i-1sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	168	168	9.2	1.7	
3dP.i-2sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	115	115	9.4	1.5	
3dP.i-3sm	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	99	99	8.9	1.4	

Sample Name	Test Instrument	Test Kit	Dilution Ratio(x)	Test Concentration(ng/μL)	Concentration of original sample(ng/μL)	RIN/RQN	28S/18S	Remark
C7dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	77	77	7.8	1.5	
C7dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	77	77	7.8	1.4	
C7dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	64	64	7.5	1.4	
P.in7dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	93	93	7.7	1.3	
P.in7dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	170	170	8.6	1.5	
P.in7dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	124	124	8.6	1.5	
C14dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	120	120	7.9	1.4	
C14dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	92	92	8.7	1.6	
C14dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	98	98	8.7	1.7	
P.in14dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	131	131	7.9	1.4	
P.in14dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	88	88	8.4	1.5	
P.in14dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	147	147	5.4	0.6	

Sample Name	Test Instrument	Test Kit	Dilution Ratio(x)	Test Concentration(ng/μL)	Concentration of original sample(ng/μL)	RIN/RQN	28S/18S	Remark
smC7dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	85	85	8.2	1.6	
smC7dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	111	111	8.5	1.6	
smC7dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	74	74	8.3	1.5	
smP.in7dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	97	97	7.8	1.5	
smP.in7dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	158	158	8.4	1.5	
smP.in7dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	134	134	8.7	1.8	
smC14dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	77	77	7.2	1.4	
smC14dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	86	86	8.8	1.6	
smC14dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	88	88	8.5	1.5	
smP.in14dR1	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	85	85	8.2	1.5	
smP.in14dR2	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	113	113	8.2	1.4	
smP.in14dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	160	160	3.4	0.1	

smP.in14dR3	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent RNA 6000 nano Reagents Part 1	1	160	160	3.4	0.1	
-------------	--------------------------	---------------------------------------	---	-----	-----	-----	-----	--

11.11 Reporte de ARN pequeños por BGI

BGI Bioinformatics Report for SmallRNA Pure-sequencing Project

1 Data Production

After sequencing, the raw reads were filtered. Data filtering includes removing adaptor sequences, contamination and low-quality reads from raw reads. Next, we get the statistics of data production. Table 1-1 shows statistical results after data treatment.

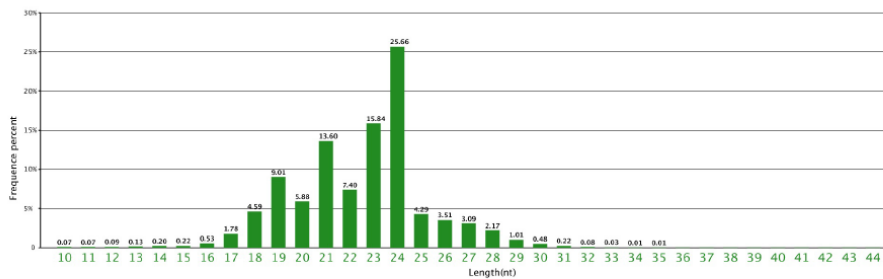
Table 1-1 Reads statistics results

Sample Name	Clean Reads	Clean bases	Read length (bp)	Q20(%)	GC(%)
3dP-i-1sm	67,629,923	1,534,242,403	50	98.49%	50.22%
3dP-i-2sm	44,993,951	1,009,380,483	50	98.67%	49.43%
3dP-i-3sm	37,514,172	827,153,949	50	98.64%	50.72%
minus3d-1small	45,991,593	1,072,665,899	50	98.74%	47.54%
minus3d-2small	40,117,981	888,340,766	50	98.65%	49.97%
minus3d-3small	56,048,281	1,289,162,645	50	98.59%	49.47%

2. Data Quality Control

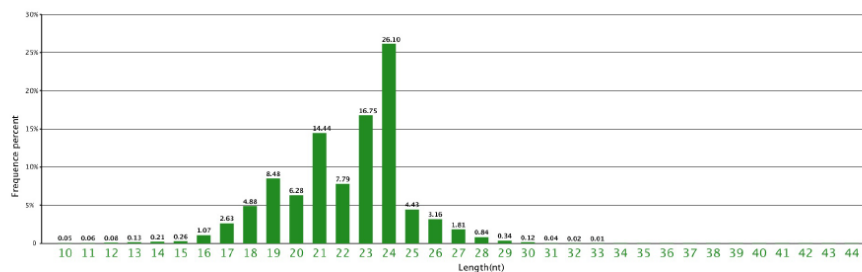
2.1 Length distribution

Length Distribution



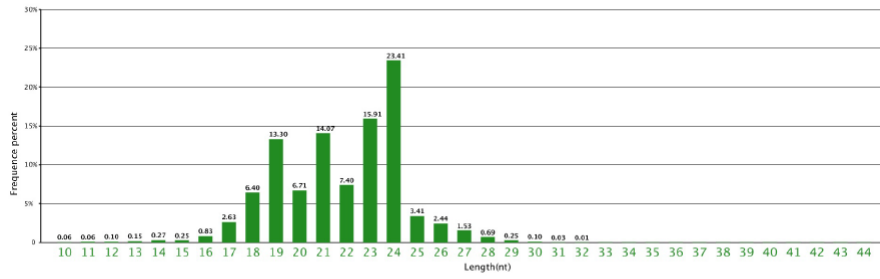
Length distribution of sample 3dP-i-1sm

Length Distribution



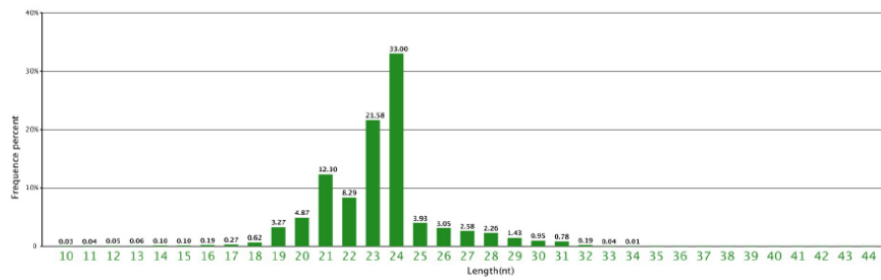
Length distribution of sample 3dP-i-2sm

Length Distribution



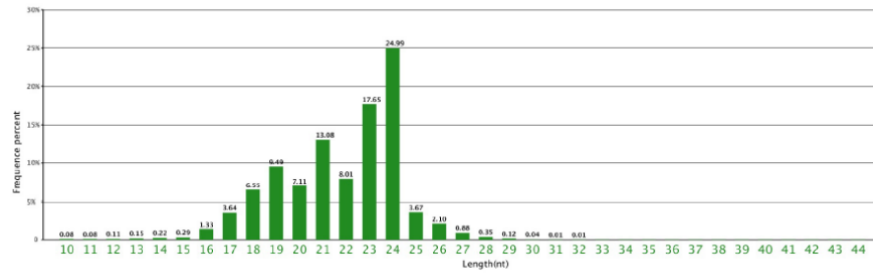
Length distribution of sample 3dP-i-3sm

Length Distribution



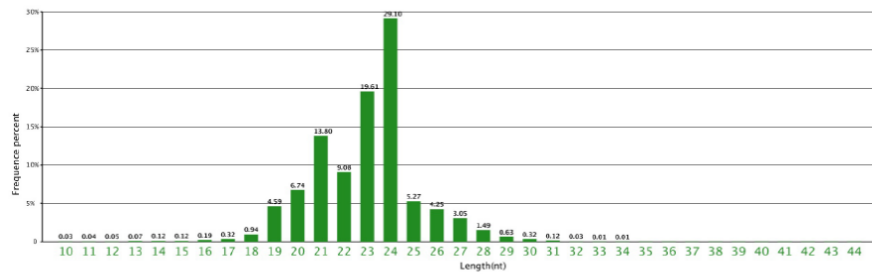
Length distribution of sample minus3d-1small

Length Distribution



Length distribution of sample minus3d-2small

Length Distribution



Length distribution of sample minus3d-3small

11.12. Vías KEGG y procesos biológicos en relación a los genes diferencialmente expresados en los tiempos 3, 7 y 14 días +*P.indica* vs Control (Resultados del transcriptoma)

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados (DE) **down** en muestras de 3 días +*P.indica* vs Control

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
3.1E-03	33	1243	1.9	Biosynthesis of secondary metabolites
1.5E-24	24	76	22.7	Photosynthesis
1.3E-03	13	269	3.5	Carbon metabolism
9.8E-05	8	69	8.3	Carbon fixation in photosynthetic organisms
1.3E-03	6	53	8.1	Porphyrin and chlorophyll metabolism

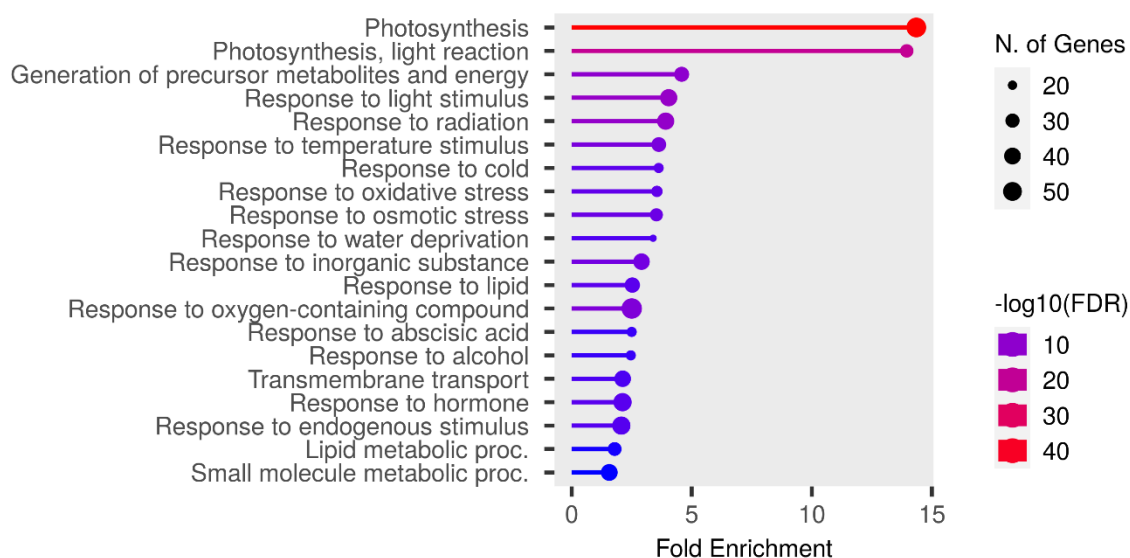


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados en **down** a 3 días en muestras +*P.indica* vs Control.

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados **up** en muestras de 3 días +*P.indica* vs Control.

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
5.6E-05	20	201	3.7	Plant-pathogen interaction
3.6E-03	15	174	3.2	Phenylpropanoid biosynthesis

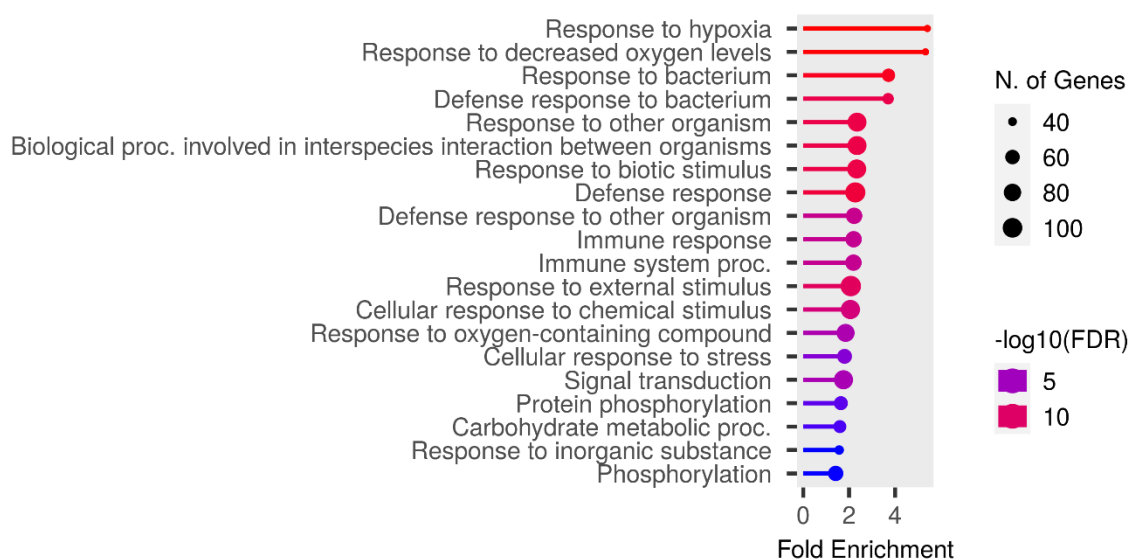


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados en **up** a 3 días en muestras +*P.indica* vs Control.

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados **down** en muestras de 7 días +*P.indica* vs Control.

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
2.2E-17	107	1243	2.5	Biosynthesis of secondary metabolites
5.8E-24	31	76	12.1	Photosynthesis
2.2E-06	28	269	3.1	Carbon metabolism
8.0E-05	19	174	3.2	Phenylpropanoid biosynthesis
2.1E-10	18	69	7.7	Carbon fixation in photosynthetic organisms
1.6E-04	18	168	3.2	Starch and sucrose metabolism
2.2E-06	12	53	6.7	Porphyrin and chlorophyll metabolism
3.3E-05	12	68	5.2	Cyanoamino acid metabolism
2.1E-03	10	77	3.8	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
1.0E-02	10	97	3.1	Pyruvate metabolism
4.7E-02	7	69	3	Glycine, serine and threonine metabolism
1.0E-03	6	24	7.4	Flavonoid biosynthesis
1.0E-02	6	38	4.7	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis
6.4E-03	5	23	6.4	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis
2.4E-02	5	32	4.6	Zeatin biosynthesis

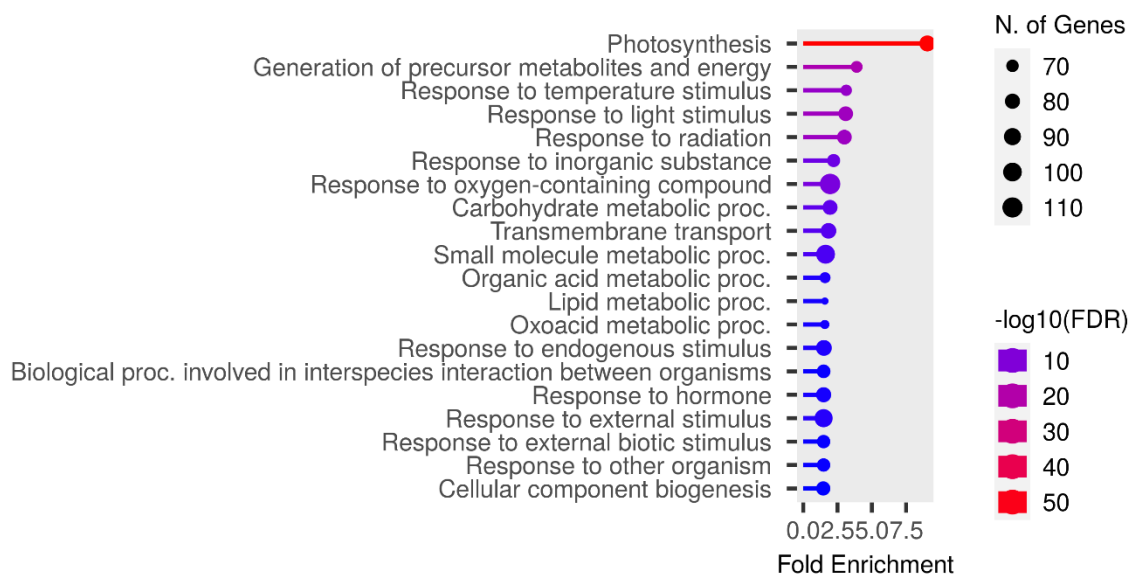


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados **down** a 7 días en muestras +*P.indica* vs Control.

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados **up** en muestras de 7 días +*P.indica* vs Control.

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
4.9E-05	23	201	3.3	Plant-pathogen interaction

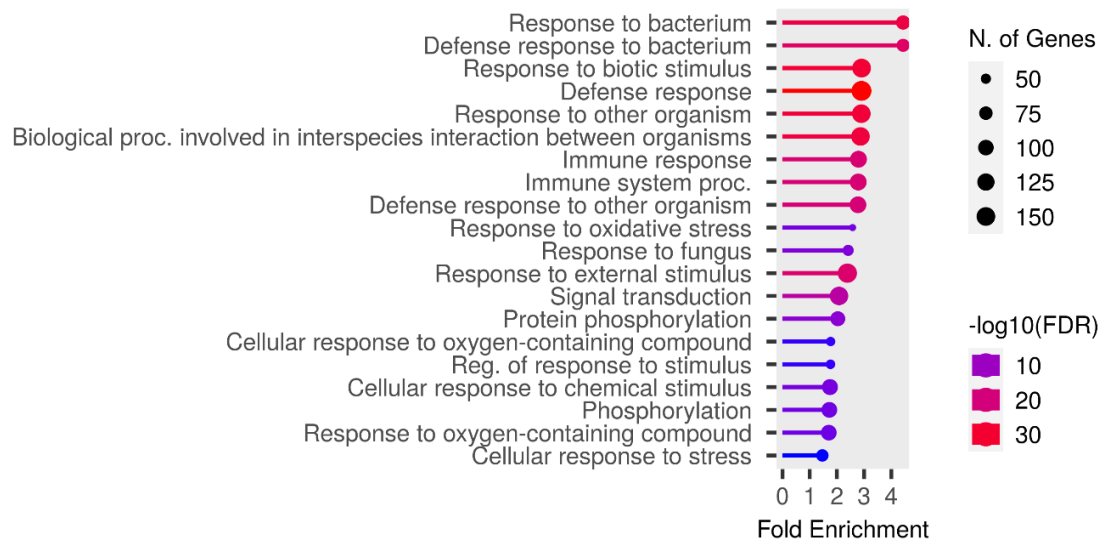


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados en **up** a 7 días en muestras +*P.indica* vs Control.

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados **down** en muestras de 14 días +*P.indica* vs Control.

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
2.4E-07	51	1243	2.5	Biosynthesis of secondary metabolites
4.3E-03	14	269	3.1	Carbon metabolism
7.3E-06	10	69	8.7	Carbon fixation in photosynthetic organisms
1.5E-02	7	97	4.3	Pyruvate metabolism
3.8E-02	7	120	3.5	Cysteine and methionine metabolism
3.8E-02	6	92	3.9	Ribosome biogenesis in eukaryotes
1.1E-02	4	24	10	Flavonoid biosynthesis
1.5E-02	4	29	8.3	Carotenoid biosynthesis

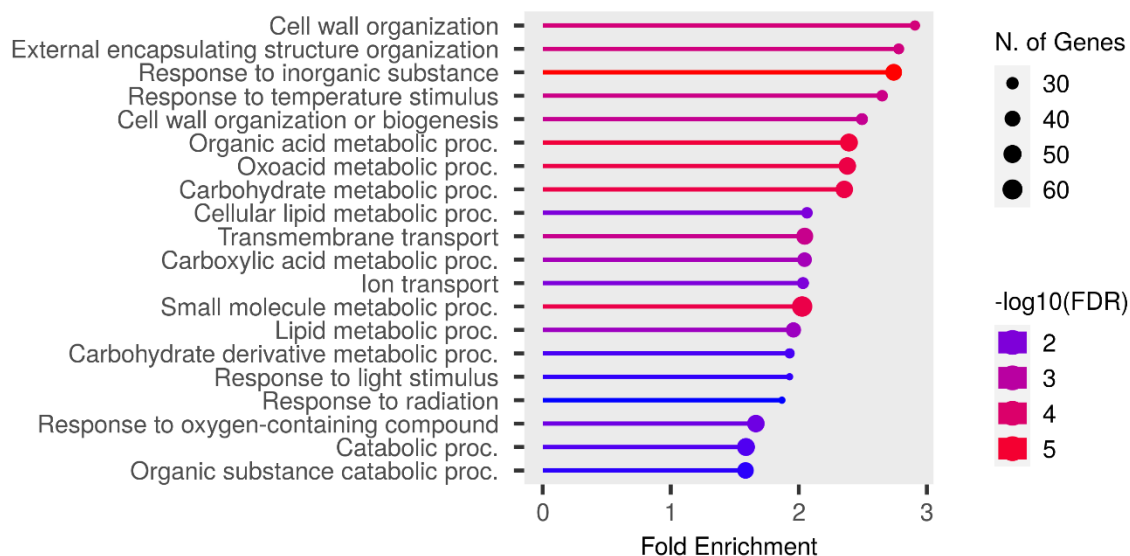


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados en **down** a 14 días en muestras +*P.indica* vs Control.

Tabla de las vías KEGG obtenidas de ShinyGO. Genes diferencialmente expresados **up** en muestras de 14 días +*P.indica* vs Control.

Enrichment FDR	nGenes	Pathway Genes	Fold Enrichment	Pathways (click for details)
3.4E-02	15	174	2.6	Phenylpropanoid biosynthesis
3.4E-02	17	201	2.5	Plant-pathogen interaction

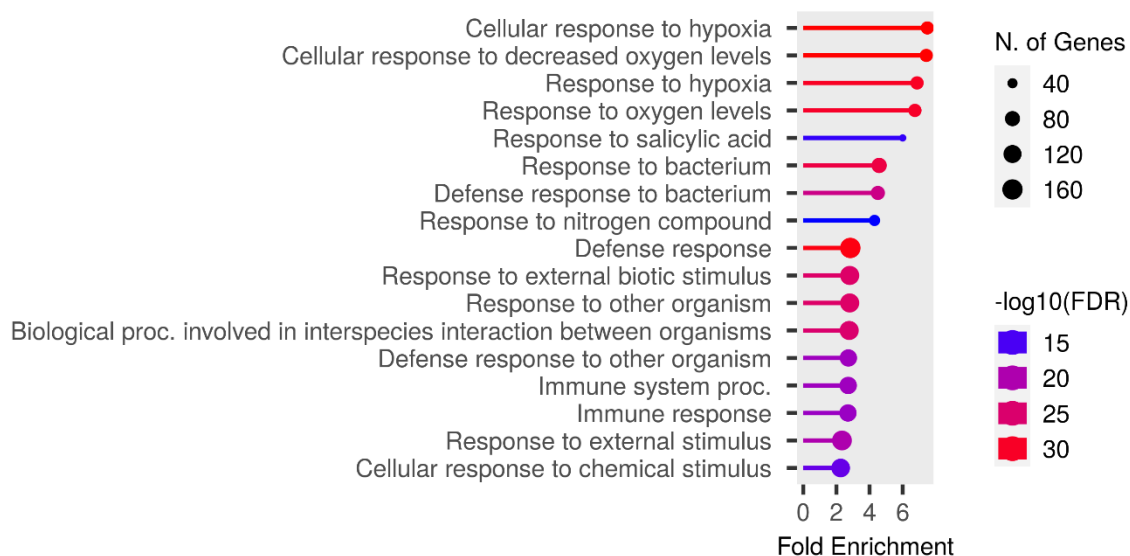


Figura obtenida de ShinyGO que indica la lista de genes DE involucrados en diferentes procesos biológicos. Genes diferencialmente expresados en **up** a 14 días en muestras +*P.indica* vs Control.

11.13. Resultados de Transcriptoma. Genes involucrados en el metabolismo del azúcar durante la interacción entre *A. thaliana* y *P. indica*

Genes *SUS* de *A. thaliana* expresados en el tejido de raíz con *P.indica* comparado al control. Los números en color azul y rojo corresponden a los Log₂FC diferencialmente expresados (p adj= <0.05) en el Transcriptoma en los tres diferentes tiempos.

genes	colonized roots		
	3 dai	7 dai	14 dai
<i>AtSUS1</i>	0.9	0.9	0.8
<i>AtSUS3</i>	-1.05	-1.56	-1.21
<i>AtSUS4</i>	1.08	1.79	0.71

Resultados de (Opitz et al., 2021) que muestra la relativa expresión de genes *AtSUS* y *AtCINV*, los números remarcados en negro son diferencialmente significativos por lo que fueron los que se compararon a nuestros resultados del Transcriptoma

Supplementary Table S2 Relative gene expression (ddCt) of *AtSUS* and *AtCINV* genes in roots and shoots of *S. indica* colonized *A. thaliana* plants in comparison to non-colonized controls ($n=3$; \pm SE). For each repetition, material from 8-12 plantlets was pooled. Black bold values indicate significant differences (student's t-test, $P<0.05$)

genes	colonized roots			shoots of colonized plants		
	3 dai	7 dai	14 dai	3 dai	7 dai	14 dai
<i>AtSUS1</i>	0.94 (\pm 0.23)	1.36 (\pm0.10)	0.72 (\pm 0.58)	-0.10 (\pm 0.14)	-0.02 (\pm 0.31)	1.03 (\pm0.22)
<i>AtSUS2</i>	-0.06 (\pm 0.18)	-0.44 (\pm 0.24)	0.50 (\pm 0.17)	-0.09 (\pm 0.05)	-0.59 (\pm 0.09)	-0.10 (\pm 0.27)
<i>AtSUS3</i>	-0.11 (\pm 0.17)	-0.12 (\pm 0.56)	1.29 (\pm0.33)	-0.78 (\pm 0.14)	0.20 (\pm 0.20)	1.27 (\pm0.33)
<i>AtSUS4</i>	1.61 (\pm0.39)	1.79 (\pm0.03)	0.71 (\pm 0.68)	0.07 (\pm 0.14)	0.36 (\pm 0.76)	1.65 (\pm 0.93)
<i>AtSUS5</i>	-0.25 (\pm 0.16)	0.32 (\pm 0.22)	-0.25 (\pm 0.68)	-0.38 (\pm 0.09)	-1.01 (\pm0.29)	0.16 (\pm 0.28)
<i>AtSUS6</i>	-0.22 (\pm 0.13)	0.53 (\pm 0.12)	-0.52 (\pm 0.26)	-0.12 (\pm 0.27)	-0.80 (\pm 0.37)	0.42 (\pm 0.25)
<i>AtCINV1</i>	0.32 (\pm 0.20)	0.19 (\pm 0.17)	-0.36 (\pm 0.24)	0.10 (\pm 0.03)	-0.18 (\pm 0.17)	0.16 (\pm 0.28)
<i>AtCINV2</i>	-0.11 (\pm 0.08)	0.00 (\pm 0.09)	-0.15 (\pm 0.33)	-0.49 (\pm 0.31)	-0.61 (\pm 0.08)	0.07 (\pm 0.22)

11.14. Resultado de microtranscriptoma. Distribución de la secuencias de ARN pequeños diferencialmente expresados

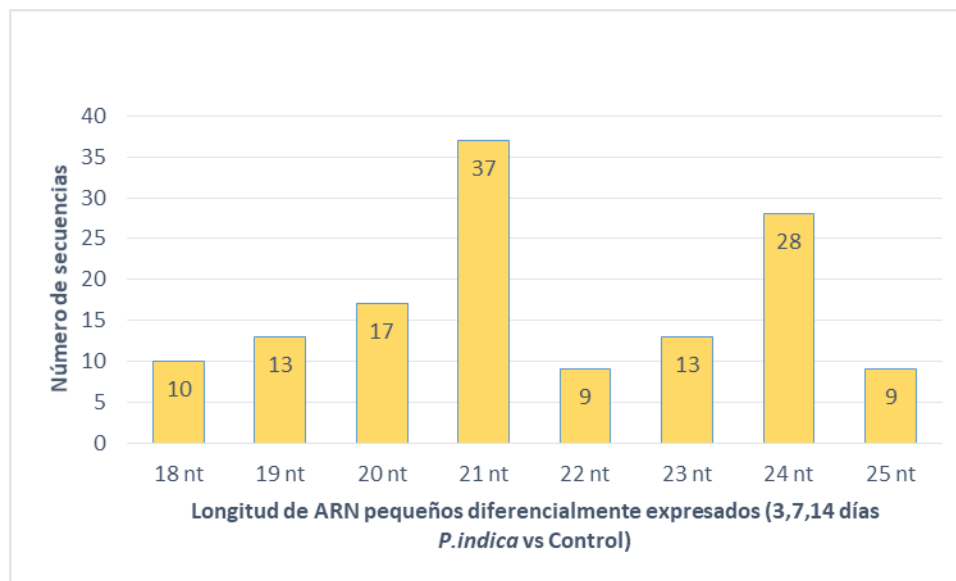


Figura. Total de 136 ARN pequeños diferencialmente expresados en uno o varios tiempos (3,7 y 14 días) en muestras +*P. indica* vs Control. El histograma con más secuencias corresponde a ARN pequeños con 21 nucleótidos.

11.15. ARN pequeños diferencialmente expresados (datos Shortstack)

Shortstack					
Secuencia	Anotación	DicerCall	MIRNA	N	PhaseScore
TGACAGAAAGAGAGTGAGCAC	miR156a-5p	20	N5	5	-1
GCTCACTCTCTATCCGTCAACC	miR156f-3p	21	Y		-1
TTGACAGAAAGATAGAGAGCAC	miR157a-5p	21	N5	5	-1
TCAATGCATTGAAAAGTGACTA	miR161.2	21	N5	5	-1
TGGAGAAAGCAGGGCACGTGCG	miR164c-5p	21	Y		-1
TCGCTTGGTGCAAGGTCGGGAA	miR168a-5p	21	N5	5	-1
TGATTGAGCCGTGTCAAATATC	miR170-3p	21	N5	5	-1
TTGGACTGAAAGGGAGCTCCCT	miR319a	21	N14	14	-1
CTGAAAGTGTGGGGGGGACTC	miR395b	21	N5	5	-1
TGTGTTCTCAGGTCACCCCTG	miR398b-3p	21	N5	5	-1
TGCCAAAGGAGATTTGCCCTG	miR399a	21	Y		-1
TGCCAAAGGAGATTTGCCCCG	miR399d	21	Y		-1
ATGCACTGCCTCTTCCCTGGC	miR408-3p	21	N5	5	-1
TTTTACTGCTACTTGTGTCC	miR5012	21	Y		-1
ACTCATAAGATCCGTGACACGT	miR5026	24	N5	5	37.3
TTCGATGTCTAGCAATGCCA	miR775	20	N5	5	-1
TTTGGTCTGATTACGAATGTA	miR8184	21	N6	6	5.2
TAGACCAATTTGTGAGAAAGGGA	miR824-5p	21	N12	12	-1
ACTTTGAAAGCTTTGATTTGAA	miR829-5p	21	N5	5	-1
TGATCTTCTCGTACTCTTCTTG	miR831-3p	22	N5	5	-1
ATCAGTTTCTTGTTCGTTTCA	miR837-5p	N	N2	2	-1
TTTAGGTGCGAGCTTCAATGGA	miR843	21	N5	5	100.8
CGGCTCTGATACCAATTGATG	miR845a	21	Y		-1
TTTGGATTGAAAGGAGCTCC	iso-miR159	20	N5	5	-1
CTGATCCCATCAGAACTCCGC	Sin identificar	24	N5	5	-1
CATTTGGTCTAGTGGTATGATTTCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
CGGCGAGAGTAGTACTAGGA	Sin identificar	N	N2	2	-1
AAGCAGAAGGTCGTAGGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TACTTACGACATGGACAGAAAT	Sin identificar	21	N5	5	-1
ATCCGTGTACAAATTAAGCCGATG	Sin identificar	N	N2	2	-1
GTCAAGCCAATTAAGTCTGATCCTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCGAGGTGACGATAGAAATT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GCAATTTGGTCTAGTGGTATGATTTCT	PT-184858*	N	N2	2	-1
TCGAGATGACTAACCGATATT	Sin identificar	24	N5	5	24.4
TGGAACAATGTAGGCAAGG	Sin identificar	19	N11	11	-1
AGCGAAGGTTTGA TCCGTACGGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GTCGCTTTGGCCGAGTGGTTAA	PT-346546*	N	N2	2	-1
GGAGTCTGACATGTGTGC	Sin identificar	N	N2	2	-1
CGCACGGCGTCTGACAGGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GCTGTTTCTCCCGAAATGCGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GCTCGTGTACCAAAATCAG	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCCGCTGTAGCACATCGGTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
CACGCACCGTGTATCAGAACTTAC	Sin identificar	N	N2	2	-1
GCCCGTATAGCTCAGTGGTA	PT-188229*	N	N2	2	-1
CGGTTAAGGCTCTCCACATT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TGAACTCAGTAGCTCCTACATTC	Sin identificar	N	N2	2	-1
AAGGGCCCAAAAAGTCCGGGGTGA	Sin identificar	24	N5	5	5.1
ACCACCAAGATCTCTGAGGCCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TTAAAGTCAATAATACCTTG	iso-miR864-3p	22	N5	5	-1
TTTACTAAATGATCTTGTTTTGTAG	Sin identificar	N	N2	2	-1
CCTTCTTGGATGTCTGAGACCA	Sin identificar	N	N2	2	-1
GAAGGCAGCTCTCTGGGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TACTAAAGAAATACCGTGTGCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GCGAGAGGTCCCGATTTCCG	Sin identificar	N	N2	2	-1
GTCGATATGTCCGAGTGGTTAAGGA	PT-343479*	N	N2	2	-1
TCCGTTGTAGTCTAGCTGG	PT-425415*	N	N2	2	-1
GGTGAAAGTGTTCGGATCGCGGC	Sin identificar	24	N5	5	-1
CCTTGGGCGAGAGTAGTACTAGGA	Sin identificar	N	N2	2	-1

GTTGATATGGCCGAGTTGG	PT-395295*	N	N2	2	-1
CATGCTAATCTTCTCTGTATCGTT	Sin identificar	24	N5	5	38.5
GACTCCGTGGCCCAATGGA	PT-166237*	19	N5	5	-1
CCGACGCGGATTACGGTGCC	Sin identificar	N	N2	2	-1
TTTCGGGGTTTACTACTTTGTT	Sin identificar	22	N5	5	-1
TGACAAGTTTTGGCTGTGTTT	Sin identificar	24	N5	5	12.5
GTGCGAGAGGTCCCGAGTTCCG	Sin identificar	N	N2	2	-1
AAGACAGGAGAACCGTGCATCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TGGATCTGCTCAACCTCTGGTTA	Sin identificar	24	N5	5	40.9
TGAGATCTTCTTCTATGATGGGGC	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCCGAGACCGAGTTCACTCCG	Sin identificar	21	N5	5	2.8
TGGTCGACGGATCTCTATGGT	Sin identificar	21	N5	5	-1
TTGCCGTATACAAGTGCTCA	Sin identificar	N	N2	2	-1
AACTCTGAGGTCGAGAGTTC	Sin identificar	20	N5	5	-1
GACGAGTGGCCTAGGCTAGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
AGGCAGTGATGACGAGAAATGTC	Sin identificar	N	N2	2	-1
GTAAGAAGAAAGAAAATGATGGAGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TACCGATGATGATTA TTGCTAAACT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TATGGTGATGATACAAGAGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
AAGGCTCCATTTTTATCGA	Sin identificar	N	N2	2	-1
TACTAAAGAAATACCGTGTGCTCTCC	Sin identificar	N	N2	2	-1
ATAGATTGGA CTATGATATT	iso-miR860	21	N5	5	-1
TGGCCAAATGATTTAATCAAAA	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCTGAAGGTCGCGTGTTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TGGTATGATCTCGCTTTG	Sin identificar	N	N2	2	-1
AGATCACTCCATTGGAAATATC	Sin identificar	24	N5	5	14.5
AACGAGTGATCATGGTGTTTAAG	Sin identificar	24	N5	5	24.2
TTTCTACTGAGTAACGGGTCATA	Sin identificar	24	N5	5	1.7
ACAAAAAGGCAAAAGTGGGCTGGGT	Sin identificar	24	N5	5	48.1
GCTGGAGTAGCTCAGTTGGT	PT-247946*	N	N2	2	-1
CCGATGTCGTCCAGCGTTAGGAT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TACACTGATATGAGCCCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCCATAGCTTAATCTTTGACT	Sin identificar	21	N5	5	14.4
AAAGGTCAAAAATTTGGGGTGCACA	Sin identificar	24	N5	5	4
AAGGCATATTCGACTCCAAAACAC	Sin identificar	24	N6	6	12.5
GTTGGCCTGAAGGATTAACAGTTT	Sin identificar	24	N5	5	18.2
AACGACCTGTGTCCCCCTCGGAAG	Sin identificar	24	N5	5	38.7
ATTA TCCCCCGTGTTTGTCC	Sin identificar	21	N5	5	-1
AGACTCGACACATGGCACAA TCCT	Sin identificar	24	N5	5	108.7
ATATCACTATAAGCATGCTCTA	Sin identificar	24	N5	5	16.5
CCTCCGGGAAGTCTTCGTG	Sin identificar	23	N11	11	-1
TTTAGACCGTGAGGCCAAACTTA	Sin identificar	23	N5	5	-1
AAAAACGACCGCACTATGAGATTT	Sin identificar	24	N5	5	-1
TGATGCGATCATACAGCACT	Sin identificar	24	N5	5	0.7
GCCAGATTA GGTCGTGGTACCA	Sin identificar	24	N5	5	92.5
GAGTATCGATTA TCCCCTGTCTA	Sin identificar	24	N5	5	15.5
GTGGCCGTTGATTTCTTCCA TCGT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TGAAAAGGTTGGAAGATCT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GTGGCCGTTGATTTCTTCCA TCG	Sin identificar	N	N2	2	-1
AGAGTTCTGACTGATATGGCGTA	Sin identificar	24	N5	5	10.5
AGGCTGCTAAACGTTATTTATAT	Sin identificar	24	N5	5	44.7
AAAGTCTGATCA TTGCCAGGTAGTG	Sin identificar	24	N5	5	21
TACCGATGATGATTA TTGCGAAAA T	Sin identificar	N	N2	2	-1
AGAGGTTGTATCATGGGATCCTTG	Sin identificar	24	N5	5	11.8
ATTGTATCA TTA ACTA TTTCTTTAT	Sin identificar	N	N2	2	-1
ATGGCCGATCCAAAATGGGTTCCGTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TGGA TTGGA TTTGGA TAA TCG	Sin identificar	24	N5	5	33
AAAAATAGAGTTGGGCATTTG	Sin identificar	22	N5	5	-1
TTAATGAATGATACATGAGTT	Sin identificar	24	N5	5	40.6
GCA CGCGCTCTGACAGGT	Sin identificar	N	N2	2	-1

AGGGAACCCAAGGCTTTTAATATA	Sin identificar	24	N5	5	20.7
TATTATCAGAGTAGTTATGAT	TAS1b_majorRNA**	21	N5	5	1342
AACTCTACCCATCGTCGCCGGT	Sin identificar	24	N5	5	20.6
ATGGATTTTGACTGAGGCTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
ATAAGAAAAGACTACCATTAAGTA	Sin identificar	24	N5	5	164.6
AGGGCTCCATAACTTGTCTCGGA	Sin identificar	24	N5	5	19.8
GGTTCTATGGTGTAGTGG	PT-321536*	N	N2	2	-1
TTCACTAATGATACGACTTTGTAG	Sin identificar	N	N2	2	-1
AATAAAAGCACACTGAAATAGTTC	Sin identificar	24	N5	5	4
TGGCAGTGATGACTCGGAAAT	Sin identificar	N	N2	2	-1
AGAAAAATGAGGAGAAAGCGTTGTG	Sin identificar	24	N5	5	12.4
TTACCTTGGCATAACAATT	Sin identificar	N	N2	2	-1
CCCAAGCAGCCTCAGACATAT	Sin identificar	N	N2	2	-1
AATCTGGTAGCGACTTTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
TCACTTCAAGGCCTTCTG	Sin identificar	N	N2	2	-1
ATCTTGGTCCTTTTTTTT	Sin identificar	N	N2	2	-1
GGCTAGGCTCAAGGAGTTC	Sin identificar	N	N2	2	-1
TTGAATAAAGTGCGATGA	Sin identificar	N	N2	2	-1

11.16. ARN pequeños diferencialmente expresados (datos IDEAMEX)

Secuencia	Anotación	Small RNA_seq						Longitud
		3dpi Log2FC	3dpi padj	7dpi Log2FC	7dpi padj	14dpi Log2FC	14dpi padj	
TGACAGAAAGAGAGTAGGCAC	miR156a-5p	-0.69	0.431	-1.50	0.000	-0.60	0.827	20
GCTCACTCTCTATCCGTCACC	miR156f-3p	-0.59	0.939	-2.10	0.082	-1.90	0.000	21
TTGACAGAAAGATAGAGAGCAC	miR157a-5p	-0.54	0.582	-1.30	0.000	-0.54	1.000	21
TCAATGCATTGAAAGTACTA	miR161.2	0.89	0.050	-0.14	0.513	-0.29	0.700	24
TGGAGAAAGCAGGGCAGTGC	miR164c-5p	-0.37	0.996	-0.93	0.006	-0.72	0.218	21
TCGCTTGGTGCAAGTGGGAA	miR168a-5p	0.82	0.051	0.18	1.000	-0.22	1.000	21
TGATTGAGCCGTGTCAATATC	miR170-3p	-0.37	0.905	-0.81	0.057	-0.03	1.000	21
TTGGACTGAAGGGAGCTCCCT	miR319a	0.81	1.000	-1.39	0.001	-0.38	1.000	21
CTGAAAGTGTGGGGGAGCTC	miR395b	0.81	0.260	-1.03	0.007	0.82	0.266	21
TGTGTTCTCAGGTCACCCCTG	miR398b-3p	1.94	0.000	1.22	0.003	1.57	0.000	21
TGCCAAAGGAGATTGGCCCTG	miR399a	-0.94	0.023	-1.85	0.139	-0.18	1.000	21
TGCCAAAGGAGATTGGCCCG	miR399d	-1.06	0.042	-2.31	1.000			21
ATGCACTCCCTTCCCTGGC	miR408-3p	0.12	1.000	0.02	1.000	1.50	0.001	21
TTTTACTGCTACTTGTGTTCC	miR5012	0.91	0.004	-0.01	1.000	0.06	1.000	21
ACTCATAAAGTCGTGACCGT	miR5026	0.22	1.000	-1.06	0.036	-0.14	1.000	21
TTCGATGTCTAGCATGCCA	miR775	0.74	0.051	0.03	1.000	0.40	1.000	20
TTTGGTCTGATTACGAAATGTA	miR8184	1.37	0.001	0.57	1.000	1.16	0.378	21
TAGACCAATTTGTGAGAAAGGA	miR824-5p	-0.18	1.000	0.25	1.000	1.01	0.001	21
ACTTTGAAGCTTTGATTTGAA	miR829-5p	0.44	0.633	0.57	0.952	0.83	0.032	21
TGATCTCTTGTACTCTTCTTG	miR831-3p	0.34	1.000	1.63	0.000	1.68	0.000	22
ATCAGTTTCTTGTCTTCTCA	miR837-5p	0.20	1.000	0.14	1.000	0.70	0.056	21
TTTAGGTCGAGCTTCAATTGGA	miR843	-1.75	0.959	-2.34	0.000	-2.15	0.000	21
CGGCTCTGATACCAATTGATG	miR845a	-0.66	0.290	-1.17	0.030	-1.11	0.029	21
TTTGGATTGAAAGGAGCTCC	iso-miR159	2.51	0.000	2.08	0.000	2.77	0.000	20
CTGATCCCATCAAACTCCGC	Sin identificar			5.09	0.001	9.48	0.000	21
CATTTGGTCTAGTGGTATGATCT	Sin identificar	2.29	0.007	5.02	0.000	7.14	0.000	24
CGGCGAGAGTAGTACTAGGA	Sin identificar	-3.09	0.000	-5.43	0.000	-2.82	0.000	20
AAGCAGAAAGGTCGTAGGT	Sin identificar	0.02	1.000	-0.17	1.000	1.75	0.000	18
TACTTACGACATGGACAGAAT	Sin identificar	-0.01	1.000	1.98	0.000	2.24	0.000	21
ATCCGTGTACAAATTAAGCCGATG	Sin identificar	3.54	0.001	5.76	0.000	9.44	0.000	23
GTCAAAGCCAAATAGTCTGACTCT	Sin identificar	3.20	0.006	3.67	0.000	7.53	0.000	24
TCGAGGTGACGATAGAAATT	Sin identificar	0.73	0.507	0.61	1.000	3.12	0.000	20
GCAATTTGGTCTAGTGGTATGATCT	PT-184858*	0.10	1.000	2.68	0.000	4.52	0.000	25
TCGAGATGACTAACCGATATT	Sin identificar	1.62	0.000	2.51	0.000	1.97	0.000	21
TGGAAACAATGTAGGCAAGG	Sin identificar	0.13	1.000	0.48	1.000	1.80	0.000	19
AGCGAAAGTTTGAATCCGTACGGT	Sin identificar	9.32	0.000	7.98	0.000	5.83	0.000	23
GTCGCTTTGGCCGAGTGGTAA	PT-346546*	0.43	0.953	0.69	1.000	1.79	0.000	22
GGAGTCTGACATGTGTGC	Sin identificar	-0.61	1.000	-0.40	1.000	1.79	0.000	18
CGCAGCGCGTCTGACAGGT	Sin identificar	0.43	0.949	-1.21	0.075	-1.48	0.000	20
GCTGGTCTCCCGAAATGCGT	Sin identificar	1.19	0.760	2.51	0.007	2.72	0.001	22
GCTCGTGTACCAATACAG	Sin identificar	8.61	0.000	8.85	0.501	9.01	0.001	18
TCCGCTGTAGCACATCGGTT	Sin identificar	1.24	1.000	-0.22	1.000	1.23	0.001	20
CACGCACCGGTATCAAACTTCA	Sin identificar					6.54	0.001	25
GCCCGTATAGCTCAGTGGTA	PT-188229*	-0.53	0.844	0.02	1.000	1.61	0.001	20
CGGTTAAGGCTCTCCACATT	Sin identificar	3.99	0.000	4.23	0.050	4.80	0.001	20
TGAACTCAGTAGCTCTACATTC	Sin identificar	3.34	0.000	2.22	0.269	2.77	0.001	23
AAGGGCCCAAAAGTCCGGGGTGA	Sin identificar	-0.75	0.272	-1.75	0.000	-1.22	0.001	24
ACCAACCAAGATCTCTGAGGCT	Sin identificar	-0.66	0.883	-0.79	1.000	-1.83	0.001	22
TTAAAGTCAATAACCTTG	iso-miR864-3p	0.60	1.000	0.56	1.000	1.80	0.001	20
TTTACTAATGATCTTTGTTTAG	Sin identificar	1.03	0.453	1.42	0.036	1.59	0.002	25
CCTTCTTGGATGCTGAGACCA	Sin identificar	-1.26	0.001	-1.72	0.002	-1.61	0.003	23
GAAGGCAGCTCTCTGGGT	Sin identificar					5.97	0.005	18
TACTAAAGAAATACGTTGTCT	Sin identificar	-1.59	0.000	-3.09	0.000	-1.33	0.006	21
CCGAGAGGTCGCCGATTCG	Sin identificar	-1.20	0.085	0.74	1.000	3.41	0.009	19
GTCGATATGTCGAGTGGTAAAGGA	PT-343479*	0.22	1.000	1.01	0.003	1.23	0.010	25
TCCGTTGTAGTCTAGCTGG	PT-425415*	0.09	1.000	2.42	0.560	2.60	0.013	19
GGTGAAAGTTCGATCGCGCC	Sin identificar	-0.94	0.009	-0.19	1.000	0.97	0.016	22
CCTTGGGCGAGATGACTAGGA	Sin identificar	-1.75	0.066	-3.98	0.000	-1.87	0.018	24

GTTGATATGGCCGAGTTGG	PT-395295*	0.24	1.000	0.77	1.000	1.28	0.018	19
CATGCTAACTCTCTGTATCGTT	Sin identificar	-0.19	1.000	0.30	1.000	0.86	0.019	24
GACTCCGTGGCCCAATGGA	PT-166237*	1.85	0.818	1.26	1.000	1.44	0.025	19
CCGACGCGGATTACGGTGGC	Sin identificar	-0.27	1.000	-0.22	1.000	0.79	0.034	20
TTTCGGGTTTATCACTTTGTT	Sin identificar	0.14	1.000	0.48	0.546	0.78	0.035	22
TGACAAAGTTTTGGCTGTGTTT	Sin identificar	-1.25	0.006	-1.36	0.024	-1.33	0.045	22
GTGCGAGAGGTCCCGAGTTCCG	Sin identificar	0.20	1.000	1.21	1.000	2.99	0.047	21
AAGACAGGAAACCGTGCACTCT	Sin identificar	2.07	0.129	2.22	1.000	2.69	0.048	22
TGGATCTGCTCAACCTCTGGTTA	Sin identificar	-0.45	1.000	-0.63	0.671	-0.87	0.050	23
TGAGATCTTCTCTATGATGGGGC	Sin identificar	4.48	0.027	5.02	0.081	4.28	0.069	24
TCCGAGACCGAGTTCACTCCG	Sin identificar	2.08	0.045	2.45	0.098	2.65	0.087	21
TGGTCGACGGATCTCTATGGT	Sin identificar	-0.35	1.000	1.77	0.000	1.90	0.225	21
TTGCGTATACAAGTGCTCA	Sin identificar	3.48	0.003			3.91	0.228	19
AATCCTGAGGTGCGAGGATTC	Sin identificar	-0.68	0.907	-1.48	0.058	-1.09	0.236	20
GACGAGTGGCCTAGGCTAGT	Sin identificar	4.98	0.020	2.28	0.814	4.20	0.279	20
AGGCAAGTGAACGAGAAATGTC	Sin identificar	1.07	0.030	1.29	0.003	0.94	0.297	23
GTAAGAAGAAAGAAAATGATGGAGT	Sin identificar	0.98	0.006	0.65	0.996	0.84	0.385	25
TACCGATGATGATTTAGTAAACT	Sin identificar	1.34	0.001	1.09	0.024	0.74	0.485	25
TATGGTGAATGATCAAGAGT	Sin identificar	1.16	0.022	-0.08	1.000	1.51	0.506	20
AAGGCTCCATTTTTATCGA	Sin identificar	1.15	0.006	-0.49	1.000	1.00	0.506	19
TACTAAAGAATACCGTGTGCTCTCC	Sin identificar	-1.21	0.002	-2.30	0.000	-0.78	0.693	25
ATAGATTGGACTATGTATATT	iso-miR860	0.83	0.020	0.73	0.548	0.82	0.693	21
TGGCCAATGATTTAATCAAAA	Sin identificar	1.21	0.011	0.34	1.000	1.15	0.693	21
TCTGAAAGTTCGCGTGTTC	Sin identificar	-0.76	1.000	-2.80	0.004	-0.97	0.709	18
TGGTATGATCTCGCTTTG	Sin identificar	-2.67	0.000	-2.07	1.000	-1.01	0.894	19
AGATCACTCCATTGGAAAGTATC	Sin identificar	-1.05	0.022	-1.01	0.092	-0.68	0.941	23
AACGAGTGCATCATGGTGTAAAG	Sin identificar	-0.91	0.009	-0.83	0.139	-0.58	0.970	24
TTTCTACTGAGTAAACGGTCAATA	Sin identificar	-1.13	0.008	-0.94	0.617	-0.68	0.970	23
ACAAAAAGGCAAAAGTGGCTGGGT	Sin identificar	-0.76	0.288	-1.87	0.000	-0.44	1.000	24
GCTGGAGTAGCTCAGTTGGT	PT-247946*	0.00	1.000	-1.53	0.000	-0.67	1.000	20
CCGATGTCGTCCAGCGGTTAGGAT	Sin identificar	-0.91	0.030	-0.88	0.001	0.41	1.000	24
TACACTTGATATGAGCCCT	Sin identificar	-0.42	1.000	-2.61	0.002	-1.06	1.000	19
TCCATAGCTTAACTCTTGACT	Sin identificar	-0.50	0.939	-1.39	0.011	-0.31	1.000	21
AAAAGTCAAAAATTTGGGTCGACA	Sin identificar	-0.33	0.967	-0.83	0.015	-0.45	1.000	24
AAGGCAATTCGACTCCAAAACAC	Sin identificar	0.16	1.000	1.11	0.016	0.12	1.000	24
GTTGGCTGAAAGGATTACAGTTT	Sin identificar	-0.58	0.357	-0.82	0.019	-0.19	1.000	24
AACGACCTGTGTCCCGCTGGAAAG	Sin identificar	0.52	0.953	1.02	0.021	0.36	1.000	24
ATTAATCCCGGTGTTTGTGCC	Sin identificar	-1.50	0.000	-0.90	0.024	-0.15	1.000	21
AGACTCGACACAATGGCAAACTCT	Sin identificar	0.60	0.999	1.17	0.030	0.15	1.000	24
ATATCACTATAAGCATGCTCTA	Sin identificar	-0.82	0.811	-1.38	0.032	-0.61	1.000	23
CCTCCGGGAAATGCTTCGTG	Sin identificar	-1.82	0.062	-3.26	0.036	-1.48	1.000	20
TTTTAGCCGTGAGGCCAAACTTA	Sin identificar	-0.08	1.000	-0.64	0.037	-0.13	1.000	23
AAAACGCAACGCACTATGAGATTT	Sin identificar	0.12	1.000	0.69	0.058	0.21	1.000	24
TGATGCGATCAATACCAGCACT	Sin identificar	-1.97	0.000	-1.41	0.071	0.33	1.000	21
GCCAGATTAGTCTGCTGGTACCA	Sin identificar	1.08	0.001	0.69	0.075	0.32	1.000	24
GAGTATCGATTAATCCCGTGTCTA	Sin identificar	-1.41	0.001	-0.91	0.125	-0.36	1.000	23
GTGGCCGTGATTTCTTCCAATCGT	Sin identificar	-1.67	0.000	-2.20	0.135	-1.17	1.000	24
TGAAAAGGTGGGAAGATCT	Sin identificar	-2.45	0.007	-4.68	0.154	-1.47	1.000	19
GTGGCCGTGATTTCTTCCAATCG	Sin identificar	-1.51	0.013	-1.86	0.258	-0.94	1.000	23
AGAGTTCTGACTGATATGGCGTA	Sin identificar	-0.95	0.028	-0.88	0.492	-0.74	1.000	23
AGGCTGCTAAAACGTTATTTATATT	Sin identificar	0.84	0.044	0.76	0.573	0.47	1.000	24
AAGTCTGATACATGCCAGGATGTG	Sin identificar	-0.97	0.007	-0.65	0.606	-0.39	1.000	24
TACCGATGATGATTTAGGAAAAT	Sin identificar	1.68	0.000	1.26	0.752	0.22	1.000	25
AGAGTTGATATGAGGATCCTTG	Sin identificar	-0.82	0.010	-0.43	0.925	-0.42	1.000	24
ATTGTATCAATTAACATTTCTTTAT	Sin identificar	0.99	0.001	0.50	0.947	0.33	1.000	25
ATGGCCGATCCAAAATGGTTCGTT	Sin identificar	2.61	0.000	-0.44	1.000	1.38	1.000	24
TGGATTGATTGGATAATCG	Sin identificar	1.63	0.000	-0.29	1.000	0.20	1.000	21
AAAATATAGAGTTGGCAATTTG	Sin identificar	2.18	0.000	1.06	1.000	0.86	1.000	22
TTAATGAAATGATACATGAGTT	Sin identificar	1.54	0.000	0.62	1.000	0.32	1.000	21
GACGCGGTCTGACAGGT	Sin identificar	1.39	0.000	-0.60	1.000	-0.68	1.000	19

AGGGAAACCAAGGCTTTTAAATATA	Sin identificar	1.30	0.000	0.68	1.000	0.31	1.000	24
TATTATCAGAGTAGTTATGAT	TAS1b_majorRNA**	0.97	0.000	0.19	1.000	0.17	1.000	21
AACACTCTACCCATCGTCGCCGGT	Sin identificar	-1.41	0.001	-0.19	1.000	-0.11	1.000	24
ATGGATTTTACTGAGGCTT	Sin identificar	0.97	0.004	0.03	1.000	-0.09	1.000	20
ATAAGAAAGACTACCAATTAGAGTA	Sin identificar	0.81	0.014	0.04	1.000	-0.04	1.000	24
AGGGCTCCCATAACTTGTCTCGGA	Sin identificar	-1.13	0.034	0.39	1.000	-0.23	1.000	24
GGTTCTATGGTGATGG	PT-321536*	0.96	0.036	1.11	1.000	1.83	1.000	18
TTCACATAATGATACGACTTTGTAG	Sin identificar	1.00	0.038	0.48	1.000	0.34	1.000	24
AATAAAAAGCACACTGAAATAGTTC	Sin identificar	1.11	0.044	0.35	1.000	-0.50	1.000	24
TGGCAGTGATGACTCGGAAAT	Sin identificar	0.95	0.044	0.29	1.000	0.74	1.000	21
AGAAAATGAGGAGAAAACGTTGTG	Sin identificar	-0.97	0.053	-0.46	1.000	-0.43	1.000	24
TTACCTTGGCATACAAAT	Sin identificar	4.63	0.000	3.47	1.000			18
CCCAAGCAGCCTCAGACATAT	Sin identificar	3.34	0.031	-0.38				21
AATCTGGTAGCGACTTTT	Sin identificar	6.79	0.000					18
TCACITCAAGCCTTCTG	Sin identificar	5.93	0.004					18
ATCTTGGTCCTTTTTTTT	Sin identificar	5.81	0.006					18
GGCTAGGCTCAAGGAGTTC	Sin identificar	4.41	0.044					19
TTGAATAAAGTGCGATGA	Sin identificar	3.68	0.054					19

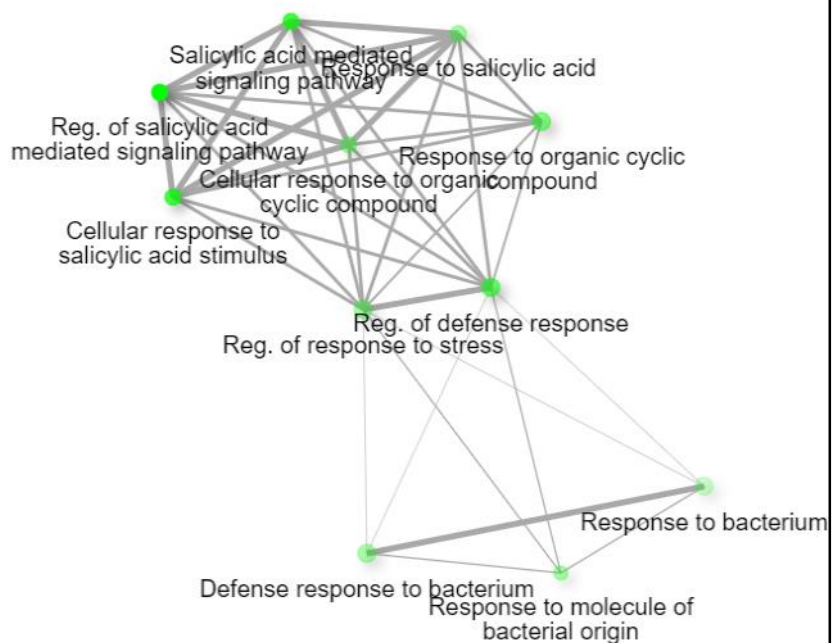
*Anotación de tRFs

**Anotación de PhasiRNAs

Los números en rojo indican un p valor ≤ 0.05

11.17. Go Biological Process

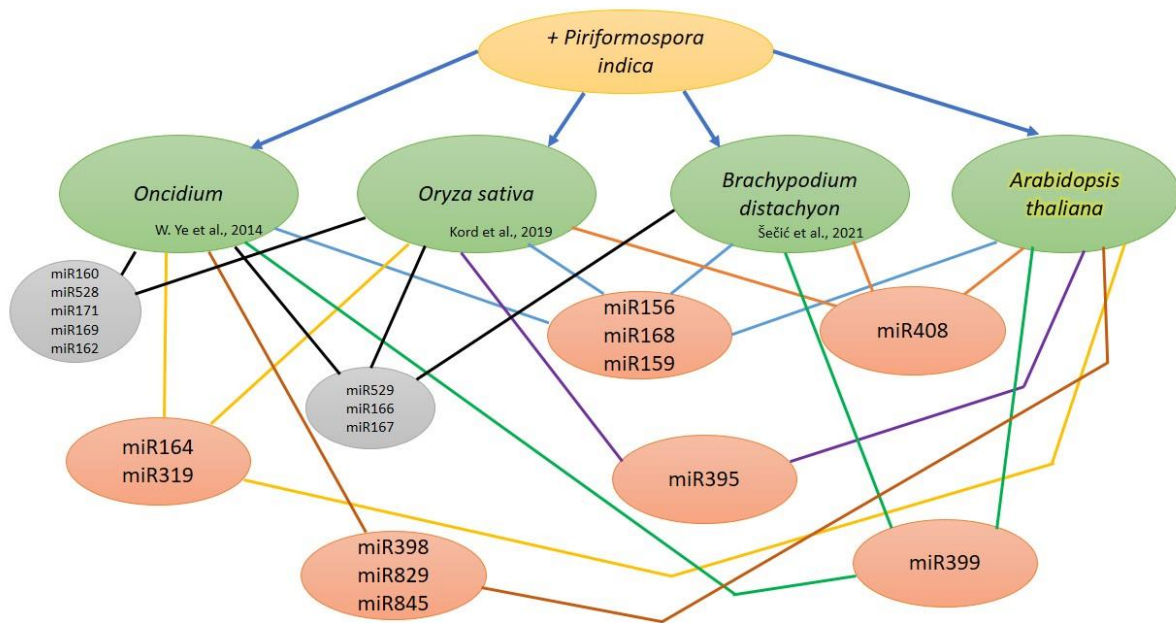
De la lista de genes putativos de la **tabla 9**, se realizó el análisis de Go Biological Process en ShinyGo. <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>



Lista de blancos putativos (Tabla9b)

AT1G22880
 AT1G73360
 AT2G24420
 AT1G18160
 AT4G03480
 AT1G13260
 AT4G22710
 AT1G53560
 AT3G07870
 AT5G42950
 AT5G04720
 AT1G51810
 AT3G56060
 AT3G11080
 AT4G31170
 AT3G03960
 AT5G38940
 AT1G26190
 AT2G23410
 AT4G21380
 AT5G48460
 AT4G03470
 AT4G22690
 AT5G38930
 AT3G23190
 AT3G22060

11.18. Familias de microARN diferencialmente expresadas en las simbiosis entre plantas de orquídea, arroz, pasto y *A. thaliana* durante la simbiosis con *P. indica*.



12. LITERATURA CITADA

- Akum, F. N., Steinbrenner, J., Biedenkopf, D., Imani, J., & Kogel, K. H. (2015). The piriformospora indica effector PIIN_08944 promotes the mutualistic Sebacinales symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00906>
- Baldrich, P., Kakar, K., Siré, C., Moreno, A. B., Berger, A., García-Chapa, M., López-Moya, J. J., Riechmann, J. L., & San Segundo, B. (2014). Small RNA profiling reveals regulation of Arabidopsis miR168 and heterochromatic siRNA415 in response to fungal elicitors. *BMC Genomics*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1083>
- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K. H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., & Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte Piriformospora indica is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, 180(2), 501–510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x>
- Banhara, A., Ding, Y., Kühner, R., Zuccaro, A., & Parniske, M. (2015). Colonization of root cells and plant growth promotion by Piriformospora indica occurs independently of plant common symbiosis genes. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00667>
- Bari, R., Pant, B. D., & Stitt, M. (2006). Phosphate-Signaling Pathway in Plants 1 [W][OA]. *Society*, 141(July), 988–999. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079707.988>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant - Fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12), 727–741. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Brosseau, C., & Moffett, P. (2015). Functional and genetic analysis identify a role for arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell*, 27(6), 1742–1754. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00264>
- Cely, M. V. T., de Oliveira, A. G., de Freitas, V. F., de Luca, M. B., Barazetti, A. R., dos Santos, I. M. O., Gionco, B., Garcia, G. V., Prete, C. E. C., & Andrade, G. (2016). Inoculant of arbuscular mycorrhizal fungi (Rhizophagus clarus) increase yield of soybean and cotton under field conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00720>
- Christiansen, K. M., Gu, Y., Rodibaugh, N., & Innes, R. W. (2011). Negative regulation of defence

- signalling pathways by the EDR1 protein kinase. *Molecular Plant Pathology*, 12(8), 746–758. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00708.x>
- Dai, X., & Zhao, P. X. (2011). PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 155–159. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr319>
- Dimijian, G. G. (2000). Evolving Together: The Biology of Symbiosis, Part 1. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 13(3), 217a – 226. <https://doi.org/10.1080/08998280.2000.11927678>
- Fang, X., Shi, Y., Lu, X., Chen, Z., & Qi, Y. (2015). CMA33/XCT Regulates Small RNA Production through Modulating the Transcription of Dicer-Like Genes in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 8(8), 1227–1236. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.002>
- Fang, Y., Zheng, Y., Lu, W., Li, J., Duan, Y., Zhang, S., & Wang, Y. (2021). Roles of miR319-regulated TCPs in plant development and response to abiotic stress. *Crop Journal*, 9(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.07.007>
- FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2020. In *El estado mundial de la agricultura y la alimentación*. <https://doi.org/10.4060/cb1447es>
- Feijen, F. A. A., Vos, R. A., Nuytinck, J., & Merckx, V. S. F. T. (2018). Evolutionary dynamics of mycorrhizal symbiosis in land plant diversification. *Scientific Reports*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28920-x>
- Gaddam, S. R., Bhatia, C., Sharma, A., Badola, P. K., Saxena, G., & Trivedi, P. K. (2021). miR775 integrates light, sucrose and auxin associated pathways to regulate root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Science*, 313(November), 111073. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111073>
- Ghabooli, M. (2014). Effect of Piriformospora indica inoculation on some physiological traits of barley (*Hordeum vulgare*) under salt stress. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(6), 1082–1087. <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1164-9>
- Hou, Y., Zhai, Y., Feng, L., Karimi, H. Z., Rutter, B. D., Zeng, L., Choi, D. S., Zhang, B., Gu, W., Chen, X., Ye, W., Innes, R. W., Zhai, J., & Ma, W. (2019). A Phytophthora Effector Suppresses Trans-Kingdom RNAi to Promote Disease Susceptibility. *Cell Host and Microbe*, 25(1), 153-165.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.007>
- Hu, J. Y., Zhou, Y., He, F., Dong, X., Liu, L. Y., Coupland, G., Turck, F., & de Meaux, J. (2014). miR824-regulated AGAMOUS-LIKE16 contributes to flowering time repression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 26(5), 2024–2037. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124685>

- Initiative, T. A. G. (2000). Analysis of the genome sequence of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(December), 796–815.
- Isidra-Arellano, M. C., Delaux, P. M., & Valdés-López, O. (2021). The Phosphate Starvation Response System: Its Role in the Regulation of Plant–Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*, 62(3), 392–400. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab016>
- Jacobs, S., Zechmann, B., Molitor, A., Trujillo, M., Petutschnig, E., Likpa, V., Koge, K. H., & Schäfer, P. (2011). Broad-spectrum suppression of innate immunity is required for colonization of *Arabidopsis* roots by the fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiology*, 156(2), 726–740. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176446>
- Jogawat, A., Saha, S., Bakshi, M., Dayaman, V., & Kumar, M. (2013). *Jogawat et al. - 2013 - Piriformospora indica rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress*. 1–6.
- Johnson, J. M., Sherameti, I., Ludwig, A., Nongbri, P. L., Sun, C., Lou, B., & Varma, A. (2011). co-cultivation – A model system to study plant beneficial traits. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 21, 101–113.
- Kariman, K., Barker, S. J., & Tibbett, M. (2018). Structural plasticity in root-fungal symbioses: Diverse interactions lead to improved plant fitness. *PeerJ*, 2018(12), 1–38. <https://doi.org/10.7717/peerj.6030>
- Kim, J. I., Murphy, A. S., Baek, D., Lee, S. W., Yun, D. J., Bressan, R. A., & Narasimhan, M. L. (2011). YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3981–3992. <https://doi.org/10.1093/jxb/err094>
- Kord, H., Fakheri, B., Ghabooli, M., Solouki, M., Emamjomeh, A., Khatabi, B., Sepehri, M., Salekdeh, G. H., & Ghaffari, M. R. (2019). Salinity-associated microRNAs and their potential roles in mediating salt tolerance in rice colonized by the endophytic root fungus *Piriformospora indica*. *Functional and Integrative Genomics*, 659–672. <https://doi.org/10.1007/s10142-019-00671-6>
- Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., & Johri, A. K. (2009). Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology*, 155(3), 780–790. <https://doi.org/10.1099/mic.0.019869-0>
- Lachowiec, J., Shen, X., Queitsch, C., & Carlborg, Ö. (2015). A Genome-Wide Association Analysis Reveals Epistatic Cancellation of Additive Genetic Variance for Root Length in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 11(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005541>
- Lahrmann, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M. R., Döhlemann, S., Von Wirén, N.,

- Parniske, M., & Zuccaro, A. (2013). Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(34), 13965–13970. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301653110>
- Lee, M. H., Jeon, H. S., Kim, H. G., & Park, O. K. (2017). An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. *New Phytologist*, *214*(1), 343–360. <https://doi.org/10.1111/nph.14371>
- Lelandais-Brière, C., Moreau, J., Hartmann, C., & Crespi, M. (2016). Noncoding RNAs, emerging regulators in root endosymbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*(3), 170–180. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0240-FI>
- Li, J., Song, Q., Zuo, Z. F., & Liu, L. (2022). MicroRNA398: A Master Regulator of Plant Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810803>
- Li, W., Cui, X., Meng, Z., Huang, X., Xie, Q., Wu, H., Jin, H., Zhang, D., & Liang, W. (2012). Transcriptional regulation of arabidopsis MIR168a and ARGONAUTE1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology*, *158*(3), 1279–1292. <https://doi.org/10.1104/pp.111.188789>
- Liu, T. Y., Huang, T. K., Tseng, C. Y., Lai, Y. S., Lin, S. I., Lin, W. Y., Chen, J. W., & Chioua, T. J. (2012). PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, *24*(5), 2168–2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096636>
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., & Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(4), 3315–3335. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8104-0>
- Opitz, M. W., Daneshkhan, R., Lorenz, C., Ludwig, R., Steinkellner, S., & Wiczorek, K. (2021). Serendipita indica changes host sugar and defense status in Arabidopsis thaliana: cooperation or exploitation? *Planta*, *253*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03587-3>
- Peskan-Berghöfer, T., Vilches-Barro, A., Müller, T. M., Glawischnig, E., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Rausch, T. (2015). Sustained exposure to abscisic acid enhances the colonization potential of the mutualist fungus Piriformospora indica on Arabidopsis thaliana roots. *New Phytologist*, *208*(3), 873–886. <https://doi.org/10.1111/nph.13504>
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*(April), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>

- Pirttilä, A. M., Tabas, H. M. P., Baruah, N., & Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040817>
- Rai, M., Acharya, D., Singh, A., & Varma, A. (2001). Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza*, 11(3), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s005720100115>
- Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician - ProQuest Agriculture Journals - ProQuest. *Science*, 289(5486), 1920–1921. <http://0-search.proquest.com.oasis.unisa.ac.za/agriculturejournals/docview/213584004/E737965684B4771PQ/1?accountid=14648>
- Reyero-Saavedra, M. del R., Qiao, Z., Sánchez-Correa, M. del S., Díaz-Pineda, M. E., Reyes, J. L., Covarrubias, A. A., Libault, M., & Valdés-López, O. (2017). Gene silencing of argonaute5 negatively affects the establishment of the legume-rhizobia symbiosis. *Genes*, 8(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/genes8120352>
- Rouached, H., Arpat, A. B., & Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: Signaling players and cross-talks. *Molecular Plant*, 3(2), 288–299. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp120>
- Šečić, E., Zanini, S., Wibberg, D., Jelonek, L., Busche, T., Kalinowski, J., Nasfi, S., Thielmann, J., Imani, J., Steinbrenner, J., & Kogel, K. H. (2021). A novel plant-fungal association reveals fundamental sRNA and gene expression reprogramming at the onset of symbiosis. *BMC Biology*, 19(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01104-2>
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A., & Oelmüller, R. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26241–26247. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500447200>
- Sherameti, I., Venus, Y., Drzewiecki, C., Tripathi, S., Dan, V. M., Nitz, I., Varma, A., Grundler, F. M., & Oelmüller, R. (2008). PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant Journal*, 54(3), 428–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03424.x>
- Shukla, V., Lombardi, L., Iacopino, S., Pencik, A., Novak, O., Perata, P., Giuntoli, B., & Licausi, F. (2019). Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 12(4), 538–551.

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.007>

- Smriti, S., & Ajit, V. (2014). From Piriformospora indica to Rootonic: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(32), 2984–2992. <https://doi.org/10.5897/ajmr2014.6928>
- Song, Z., Zhang, L., Wang, Y., Li, H., Li, S., Zhao, H., & Zhang, H. (2018). Constitutive expression of mir408 improves biomass and seed yield in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02114>
- Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Erratum: Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance (Plant Cell (2006) 18 (2051-2065)). *Plant Cell*, 18(9), 2415. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.180960>
- Thürich, J., Meichsner, D., Furch, A. C. U., Pfalz, J., Krüger, T., Kniemeyer, O., Brakhage, A., & Oelmüller, R. (2018). Arabidopsis thaliana responds to colonisation of Piriformospora indica by secretion of symbiosis-specific proteins. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209658>
- Tian, L., Lin, X., Tian, J., Ji, L., Chen, Y., Tran, L. S. P., & Tian, C. (2020). Research advances of beneficial microbiota associated with crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21051792>
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Varma, A., Bakshi, M., Lou, B., Hartmann, A., & Oelmueller, R. (2012). Piriformospora indica: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. *Agricultural Research*, 1(2), 117–131. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0019-5>
- Varma, A., Kost, G., & Oelmüller, R. (2013). *Piriformospora indica* (A. Varma, G. Kost, & R. Oelmüller (eds.); Vol. 33). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33802-1>
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütehorn, B., & Franken, P. (1999). Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2741–2744. <https://doi.org/10.1128/aem.65.6.2741-2744.1999>
- Venkateshwaran, M., Volkening, J. D., Sussman, M. R., & Ané, J. M. (2013). Symbiosis and the social network of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(1), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.11.007>

- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Bütchorn, B., Franken, P., Bütchorn, B., & Franken, P. (1998). Mycological Society of America Piriformospora indica, gen. et sp. nov., a New Root-Colonizing Fungus Piriformospora indica, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Source: Mycologia*, *90*(5), 896–903.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., Von Wettstein, D., Franken, P., & Kogel, K. H. (2005). The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(38), 13386–13391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504423102>
- Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, *10*(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- Wang, X., Ren, M., Liu, D., Zhang, D., Zhang, C., Lang, Z., Macho, A. P., Zhang, M., & Zhu, J. K. (2020). Large-scale identification of expression quantitative trait loci in Arabidopsis reveals novel candidate regulators of immune responses and other processes. *Journal of Integrative Plant Biology*, *62*(10), 1469–1484. <https://doi.org/10.1111/jipb.12930>
- Wang, Y., Wang, L., Zou, Y., Cai, Z., Zhang, S., Zhang, S., Zhao, F., Tian, Y., Jiang, Q., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M., & Li, X. (2014). Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate ENOD40 expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, *26*(12), 4782–4801. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.131607>
- Weiβ, M., Sýkorová, Z., Garnica, S., Riess, K., Martos, F., Krause, C., Oberwinkler, F., Bauer, R., & Redecker, D. (2011). Sebaciniales everywhere: Previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS ONE*, *6*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016793>
- Weiβ, M., Waller, F., Zuccaro, A., & Selosse, M. A. (2016). Sebaciniales - one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist*, *211*(1), 20–40. <https://doi.org/10.1111/nph.13977>
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in bloom: A primer on the Arabidopsis thaliana model system. *Genetics*, *208*(4), 1337–1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
- Wu, P., Wu, Y., Liu, C. C., Liu, L. W., Ma, F. F., Wu, X. Y., Wu, M., Hang, Y. Y., Chen, J. Q., Shao, Z. Q., & Wang, B. (2016). Identification of arbuscular mycorrhiza (AM)-responsive microRNAs in tomato. *Frontiers in Plant Science*, *7*(MAR2016), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00429>
- Xu, Y., Zhu, S., Liu, F., Wang, W., Wang, X., Han, G., & Cheng, B. (2018). Identification of arbuscular mycorrhiza fungi responsive microRNAs and their regulatory network in maize.

International Journal of Molecular Sciences, 19(10), 1–13.

<https://doi.org/10.3390/ijms19103201>

- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li, J., Zou, Z., & Cao, K. (2020). Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56954-2>
- Ye, W., Jiang, J., Lin, Y., Yeh, K. W., Lai, Z., Xu, X., & Oelmüller, R. (2019). Colonisation of *Oncidium* orchid roots by the endophyte *Piriformospora indica* restricts *Erwinia chrysanthemi* infection, stimulates accumulation of NBS-LRR resistance gene transcripts and represses their targeting micro-RNAs in leaves. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2105-3>
- Ye, W., Shen, C. H., Lin, Y., Chen, P. J., Xu, X., Oelmüller, R., Yeh, K. W., & Lai, Z. (2014). Growth promotion-related miRNAs in *oncidium* orchid roots colonized by the endophytic fungus *piriformospora indica*. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084920>
- Zhang, H., & Li, L. (2013). SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 74(1), 98–109. <https://doi.org/10.1111/tpj.12107>
- Zhao, H., Wu, D., Kong, F., Lin, K., Zhang, H., & Li, G. (2017). The *Arabidopsis thaliana* nuclear factor Y transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, 7(January), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02045>
- Zhao, P. X., Zhang, J., Chen, S. Y., Wu, J., Xia, J. Q., Sun, L. Q., Ma, S. S., & Xiang, C. Bin. (2021). *Arabidopsis* MADS-box factor AGL16 is a negative regulator of plant response to salt stress by downregulating salt-responsive genes. *New Phytologist*, 232(6), 2418–2439. <https://doi.org/10.1111/nph.17760>
- Zheng, C., Ye, M., Sang, M., & Wu, R. (2019). A regulatory network for mir156-spl module in *arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24). <https://doi.org/10.3390/ijms20246166>
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Güldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F., & Kogel, K. H. (2011). Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLoS Pathogens*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002290>

DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Caracterización de las parejas microARN/blancos involucradas en la simbiosis entre *Arabidopsis thaliana* y *Piriformospora indica***, que presenta la alumna **Ana Karen Ávila Sandoval (10033408)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Mario Alberto Serrano Ortega CCG-UNAM	APROBADO	
Dr. Ramón Suárez Rodríguez CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Damien Jean René Formey de Saint Louvent CCG-UNAM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA | Fecha:2022-11-07 10:27:48 | Firmante

E4XJxP9dYnDMNWa99q2mfvEXtD+oba8yXen6cnXuNqSDs5fG13/3jqE/z0HAKsLz2SErWMrJpVtKjbpz+/tiYuUHTQ2a2E8K7Inr8+1Ah2fnMt/kdS5Q4N8dyE0JEnLD7widgTXV0/0/zq4oz3yFo8sUSL6pJH5vOr3PaY/IF8VqrS05ky34XW1OIdAc+AlwAwRiKvR8ch2vnOLgvOBhcHjStbHL5KF7QDDqjPJRLxGZrQIOBudoFvTfbf8XhhgLY/e4emXcoqNLZggMyQH/WJX7B1+r1rYehOGH/MFvqD7+CG+PBWW1iAgaHtKLUYBY6OhONri6elQDXidfwAA==

DAMIEN JEAN RENÉ FORMEY DE SAINT LOUVENT | Fecha:2022-11-07 10:31:59 | Firmante

F9yqZntmiAcr3aASWO1mJpWRAQFZuPZ5m0gol7Zs7vUM5Z1IW3IMjSteWcCh0mgS1DfTdkQyZttwgEdjSa/f0yEQU2tr4MG9ZCIR7E2MM0xnyG5emtMksCvLdrHSwC0zErUaRgid34ztQHx9f8USHT3EAJf9KGYczPmwepysEay60dnSY3yK6t2fET7m/Bt2sOQPkK3uhq25B1WUF6XITFouxj0dDohQk0O9SxwVDUHs/taa+ytQ7AQAC2BIAC1F/mk4k8HRkbi9V8jNRAM+9Q1ax2H4dRzF63jFKrblRi3EnEcre6+6BZ3PFTY7TLMx9s8+0cAP9c+B4XaXOG/A==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-11-07 11:15:31 | Firmante

qmD3Hjffx8bd4nKacvgMsAmSXUJ3P7y0dXpVpfZF6dOcmHBZfRfAV4dyUoqx6oXsqf1XfUyY7oHoesfTR/6KN2wZR7Sjw1dcicJKrZErJymfjOCF4zcRcervkdf5zp886nDxspnps6NrxefRetlgh46vubSRrJ7JPYHHVWOUFY5vDa0+ksGfaOZgtkuxo2GRY0YX4XJOXeeWD9Q6W19P8dNj9lzOeFaeYg+APDDx8jkLZ25qafXfjtpS2wbZQeDZRR08lj2LEqxGBsDwLhJqzDZMHhO3YacHqZGvncB9BkXko584qDlqePnF7AM+oTdMnEzjL4EmNcDgsxrTXA==

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-11-08 06:07:34 | Firmante

Wn8eKa/xioIAP5WfZB0R+PXI6AnG+USygbK0rDzRqW0oX0j52HskBafFV7I60ORwclr42F4YNJIRRAKUQmqn+Yi1ThFgQLVud9HdeMdUHUUtMAeAebHsYnmF6VXHgQRKi q4KHB6j7YANB2rqJl49ZpHJIAJu3DhPKhCFX55bzMTDMVTkG3oDbe+bjkG/fV7Z+0/Uuc7fZVbFPpimF8MpJ38v5NOQHtpKV2tYIZM5afXfjtpS2wbZQeDZRR08lj2LEqxGBsDw Af16k0N/oBz0RJoAmykPOYhhlhFJOaXo/xuAFilcTI7OAArIes4THnTeXXROkbimGRFJEQR3Elg==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2022-11-12 19:07:23 | Firmante

w3FkaL+PZI7T8a9ve7wRyA7W7K2HtkiqKX5KUppCCR+5PBVfuGt29W8imaJk9EvGvDdt5QDrydhC2LN1/TjOfX5mMIUZtUH84acWHfmWKBv+ejbgMzVB3ZxJAbjdZPSbipW1EBS FbcFAK0jWpQJyzl4haUajb4z3OTFhuoTmDFeXO/h4NubmEkWllvEpQsiyzkvnsvRoqf7HchpmlsaanZ9ggZH4/oUiUoCBJ+o8CkM1ZXLSEhcAYqWyKZrNSS/vHhK8hHXFQcWuB VVZkMkWNDElbwsur/T2F3306BEvv2dJFmcWM3kFelWGLd8W6vlrNDLPmIFeMveEgKOj+d9VJA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FKwLISvym

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Xk1MsaraK8V8nKma3hVME3MkaaUo2CM9>

